

レンチウイルスベクターを用いた網羅的ノックアウトマウスライブラリーの構築

●伊川 正人 ◆蓮輪 英毅

大阪大学微生物病研究所

＜研究の目的と進め方＞

ゲノムプロジェクトによりゲノム配列が次々と明らかにされた21世紀には、それら遺伝子が持つ生理機能を個体レベルで明らかにしていくことが生命科学研究の大きな命題の一つとなるであろう。しかし哺乳類の遺伝子数は2～3万と言われているため、それらの遺伝子一つ一つについて、ターゲティングベクターを構築してノックアウトマウスを作製することは不可能に近い。

本研究では、効率よく網羅的にノックアウトマウスを作製することを目的として、レンチウイルスベクターを受精卵に感染させる方法によるジーントラップ法を開発した。さらにcre/loxPシステムを応用して染色体の一部を欠損・転座させる染色体工学を組み合わせ、ゲノム機能をマクロレベルで解析するためのモデルマウス開発を目指した。

＜研究開始時の研究計画＞

- A) 透明帯を除去した受精卵にレンチウイルスベクターを感染させれば、非常に効率良く多数の遺伝子座にGFP発現遺伝子を組み込むことができる。代表者が留学中に開発した本方法について、国内での再現実験を行うとともに改良を試みた。さらにレンチウイルスベクターを用いることが、目的遺伝子の発現様式や機能に影響を及ぼす影響を調べた。
- B) レンチウイルスベクターは感染した細胞のゲノムにランダムに挿入される。またウイルスベクターの濃度を調節すればゲノムの複数個所に同時に挿入させることもできる。この利点を活かして、EGFPをレポーターとして利用することで、ジーントラップされたマウスが緑色蛍光を発する工夫をした。また多様なcre発現トランスジェニックマウスを作製する目的で、トラップした遺伝子プロモーターの制御下にcreを発現するようなトラップベクターを構築した。
- C) 緑色蛍光を指標に選別したトラップマウスでは、内在性の遺伝子が破壊されている。そこでプラスミドレスキューやRACE法により、ウイルスベクターの組み込まれた部位やトラップした遺伝子を同定する系の確立を目指した。また破壊遺伝子を同定できたマウス系統については凍結保存を行うとともに、一部、表現型の解析を試みた。

＜研究期間の成果＞

- A) EGFP発現カセットを組み込んだレンチウイルスベクターを調整し、2回超遠心による濃縮を行うことで高タイター化を実現した。得られたレンチウイルスベクターを透明帯除去した受精卵に感染させることで、産子の約70%がトランスジェニックマウスになる条件を確立した。またCMVプロモーターに比較してCAGプロモーターを用いた場合の方が、安定した遺伝子発現が観察された。その際、レンチウイルスベクターはレトロウイルスベクターと異なり、メチル化等による遺伝子不活化を受けることが殆どないことを確認した！。

また共同研究として、レンチウイルスベクターを用いて多様なトランスジェニックマウスを作製し、レンチウイルスベクターが目的遺伝子の発現様式や機能に影響を及ぼさないこと①、固体レベルでのRNAiに有用であること⑦、疾患モデル動物を作製できることなど⑩、を確認した。

- B) polyA trapによりEGFPを発現するトラップ用レンチウイルスベクターを作製した。受精卵への感染によりトランスジェニックマウスを作製したところ、得られた産子に緑色蛍光が見られたことから、トラップが機能していることが予想された。またpolyA trapによりEGFPを発現し、同時にpromoter trapによりcre リコンビナーゼを発現するトラップベクターを構築した。In vitroでは機能することを確認したが、残念ながらin vivo（トランスジェニックマウス）ではpromoterをトラップしていない場合でもcreの発現が見られ、利用することができなかった。またcre発現TGマウスの応用を予定して、creを発現した組織でのみEGFPを発現するレポーターマウスや、creを発現した組織でのみDTAを発現して死滅する組織特異的欠損モデルマウスの作製に成功した⑩。
- C) 破壊された遺伝子つまりウイルスベクターが組み込まれた場所を、RT-PCR法により決定する系を確立した。作製したトランスジェニックマウス系統について、順次、遺伝子導入部位の決定を進めており、これまでに100を超える導入部位の同定に成功した。特に導入されやすい遺伝子座や染色体があるわけではなく、おしなべて殆どすべての染色体に遺伝子導入されていることが確認できており、ランダムな挿入であることが確認された。次に、これらのマウスについては、受精卵や精子による凍結保存を行った。また共同研究により多くの遺伝子欠損マウス作製や解析を行った②-⑥⑨）。

＜国内外での成果の位置づけ＞

個々の遺伝子を破壊したノックアウトマウスライブラリーを構築することは、ポストゲノムプロジェクトの一環として生命科学研究を大きく推進するために必要不可欠であり、4,000を超える遺伝性疾患の原因解明や治療法開発にも貢献することができる。

網羅的にノックアウトマウスを作製する方法として、変異原であるENUを雄マウスに投与して精子ゲノムに点変異を誘起し、得られる子孫の表現型解析を行う国家的プロジェクトがアメリカやドイツ、日本で開始されている。ヒトの遺伝性疾患の多くは点変異であることを考えると理想的な実験系ではあるが、表現型の原因となる1塩基の変異を30億塩基の中から見つけ出すことは容易ではない。本研究はトラップした遺伝子を同定してから表現型を解析できる点で優れており、また遺伝子群の欠損や転座など染色体レベルでのゲノム機能解析が可能なることから、ENUプロジェクトと並行して行うことにより世界をリードした研究を展開できるであろう。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

レンチウイルスベクターを用いた遺伝子組換え効率率は70%と高率であったために、ウイルス濃度や感染方法の改善を行ったが、さらなる効率化は困難であった。具体的には、卵の透明帯があるとウイルスが感染できないので現在は酸性タイロッド処理しているが、卵へのダメージが大きいために発生能が低下してしまう。そこでガラスキャピラリーを用いたマイクロインジェクション法を試した。特に顕著な効率化は認められなかったが、胚へのダメージが低く、必要なウイルス量を減らすことが可能となった。

またレンチウイルスベクターの組み込み位置の同定法確立も困難であった。多くの個体では複数個所にウイルスベクターが組み込まれる。しかしPCR等を用いた方法では特定箇所のシグナルのみが増幅され易いために、多くのケースで単一遺伝子座の挿入しか検討できなかった。このためゲノムDNAからのアプローチよりも、簡便なRT-PCRによりトラップ遺伝子を同定するケースが多くなったが、その場合には挿入部位を塩基レベルで同定することはできなかった。

C re/loxPシステムを個体レベルで応用して、creの発現組織を追跡できるレポーターマウス系統を確立できた。しかしトラップ遺伝子座にloxPを組み込んだマウス系統は樹立できたものの、交配に係る時間的制約等のため、交配により同一染色体座にloxPを2つ有するマウス系統の樹立には至らなかった。そのため染色体欠損や転座などのモデル開発が滞ってしまった。

〈今後の課題〉

これまでに作製したトラップベクターでは、promoterのリークの問題などがあり、大規模スクリーニングには使えない。プロモーターの改善やmRNA不安定化シグナル等の導入により、最適なトラップベクターの構築を行う必要がある。

導入遺伝子座の決定方法についても、さらなる改善を必要としており、複数コピー導入された個体ゲノムからでもすべての挿入遺伝子座を決定できるようなLAN-PCR法やプラスミドレスキュー法の開発が必須である。RT-PCR法と上手く組み合わせた、より効率的な手法の開発が課題である。

マウス個体レベルで網羅的なジーントラップを少人数で行うことは労力的な面で非常に困難であったが、レンチウイルスベクターを用いたジーントラップの基本系を構築できた。今後は改良を加えると共に、網羅的なノックアウトマウスライブラリー構築への応用が課題となる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 0403261615
Ikawa, M., Tanaka, N., Kao, W.W., and Verma, I.M. Generation of transgenic mice using lentiviral vectors: a novel preclinical assessment of lentiviral vectors for gene therapy. *Mol Ther*, 8(4), 666-73 (2003)
- 2) 0403262140
Inoue, N., Ikawa, M., Nakanishi, T., Matsumoto, M., Nomura, M., Seya, T., and Okabe, M. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol Cell Biol*, 23(7), 2614-22 (2003)
- 3) 0403261723
Kimura, T., Ito, C., Watanabe, S., Takahashi, T., Ikawa, M., Yomogida, K., Fujita, Y., Ikeuchi, M., Asada, N.,

- Matsumiya, K., Okuyama, A., Okabe, M., Toshimori, K., and Nakano, T. Mouse germ cell-less as an essential component for nuclear integrity. *Mol Cell Biol*, 23(4), 1304-15 (2003)
- 4) 0403262146
Kuramochi-Miyagawa, S., Kimura, T., Ijiri, T.W., Isobe, T., Asada, N., Fujita, Y., Ikawa, M., Iwai, N., Okabe, M., Deng, W., Lin, H., Matsuda, Y., and Nakano, T. Mili, a mammalian member of piwi family gene, is essential for spermatogenesis. *Development*, 131(4), 839-49 (2004)
 - 5) 0408131100
Shiomi, N., Kito, S., Oyama, M., Matsunaga, T., Harada, Y.N., Ikawa, M., Okabe, M., and Shiomi, T. Identification of the XPG region that causes the onset of Cockayne syndrome by using Xpg mutant mice generated by the cDNA-mediated knock-in method. *Mol Cell Biol*, 24(9), 3712-9 (2004)
 - 6) 0408131118
Mori, T., Yuxing, Z., Takaki, H., Takeuchi, M., Iseki, K., Hagino, S., Kitanaka, J., Takemura, M., Misawa, H., Ikawa, M., Okabe, M., and Wanaka, A. The LIM homeobox gene, L3/Lhx8, is necessary for proper development of basal forebrain cholinergic neurons. *Eur J Neurosci*, 19(12), 3129-41 (2004)
 - 7) 0408131126
Tiscornia, G., Singer, O., Ikawa, M., Verma, I.M. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(4), 1844-8 (2003)
 - 8) 0408131153
Tergaonkar, V., Bottero, V., Ikawa, M., Li, Q., Verma, I.M. IkappaB kinase-independent IkappaBalpha degradation pathway: functional NF-kappaB activity and implications for cancer therapy. *Mol Cell Biol*, 23(22), 8070-83 (2003)
 - 9) 0601301005
Nakanishi, T., Isotani, A., Yamaguchi, R., Ikawa, M., Baba, T., Suarez, S.S., and Okabe, M. Selective passage through the uterotubal junction of sperm from a mixed population produced by chimeras of calmegin-knockout and wild-type male mice. *Biol Reprod*, 71(3), 959-65 (2004)
 - 10) 0601301010
Matsumura, H., Hasuwa, H., Inoue, N., Ikawa, M., and Okabe, M. Lineage-specific cell disruption in living mice by Cre-mediated expression of diphtheria toxin A chain. *Biochem Biophys Res Commun*, 321(2), 275-9 (2004)
 - 11) In press,
Tanaka, N., Ikawa, M., Mata, N.L., and Verma, I.M. Choroidal neovascularization in transgenic mice expressing prokineticin 1: an animal model for age-related macular degeneration. *Mol Ther*