

ジーントラップ・マイクロアレイによるマウス・ゲノムの網羅的な機能解析

●石田 靖雅 ◆松田 永照

奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科

〈研究の目的と進め方〉

近年、ヒトやマウスのゲノム・プロジェクトの進展により、おびただしい数の遺伝子が見出されつつあるが、いかにして効率良く、迅速にそれぞれの遺伝子の機能を解明して行くかが、我々に残された今後の大きな課題となっている。

本研究では、この問題を解決するために、まずゲノム機能の新しい解析システムとして「ジーントラップDNAアレイ法」を確立し、研究者一般に広く提供することを目指す。このシステムを利用することにより、「DNAアレイ上で興味深い発現パターンの遺伝子を発見すると同時に、その遺伝子をノックアウトしたES細胞のクローンを手に入れることが出来る」、という状況が作り出されるため、遺伝子の発見からノックアウト・マウスの作製までを完全に直結させることが可能となる。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) マウスのES細胞へRETジーントラップ・ベクターを導入し、G418 selectionのあと、新たに約2000個のES細胞コロニーをピックアップし、一部を凍結保存した後、残った細胞からRNAを抽出する。抽出したRNAから3' RACE (RT-PCR) 法を用いてトラップされた遺伝子のcDNA断片を回収し、direct sequencingによりその塩基配列を決定する。
- 2) 3' RACEにより得られたcDNAを鋳型とし、さらに高純度のPCR断片を合成し、ナイロン・メンブレン上にDNAアレイを作製する。
- 3) 作製したDNAアレイを利用し、ES細胞中でランダムにトラップされた遺伝子群のマウス体内における発現パターンを網羅的に解析する。
- 4) 興味深い発現パターンを示す遺伝子があれば、直ちにその遺伝子がトラップされたES細胞クローンからノックアウト・マウスを作製し、その表現型を解析する。

〈研究期間の成果〉

- 1) マウスES細胞中でランダムにトラップした280の遺伝子を選び、高純度のPCR断片を合成した上で、ナイロン・メンブレン上にDNAアレイを作製した。
- 2) マウスのいくつかの臓器から抽出したmRNAを用い、ラジオアイソトープで標識したターゲットcDNAを合成し、上記のメンブレン・アレイをスクリーニングしたところ、いくつかの「脳特異的」遺伝子が同定された。
- 3) そのうちのひとつ#2e-22に関し、マウス体内における発現パターンをノーザン・ブロットングで解析したところ、「脳特異的」であるというアレイ・データが正

しいことが再確認された。この遺伝子は、マウスでは未同定の新規遺伝子であり、米国NCBIのマウス関係のどのデータベースにもクローンの登録は見出されなかった。しかし、ラットのデータベースにはホモログが存在したため、この遺伝子はGABA受容体の新しいサブユニットrho-3（機能未知）をコードしていることが強く示唆された。この遺伝子の生理機能を解明するため、同遺伝子がトラップされたES細胞クローンを用いて直ちにノックアウト・マウスが作製された。その解析により、このマウスでは、ジーントラップ・ベクターの挿入部位よりも下流に位置する遺伝子#2e-22の後半部分は、完全にノックアウトされていることが判明した。現在、このノックアウト・マウスの表現型を詳細に解析中である。

- 4) 上記のDNAアレイには、機能的であることが未確認の、いわゆる“unknown”遺伝子が数多く含まれているが、そのうちのいくつかについては、少なくともRNAレベルでは、マウスの体内で発現されていることが確認された。これらは、いわゆる「機能性RNA」をコードしている可能性があり、それらがトラップされたES細胞クローンを利用し、次々にノックアウト・マウスが作製されることが待たれる。
- 5) 我々のグループは、ジーントラップ法とDNAアレイ技術の機能的な融合により、マウス個体を用いた遺伝子機能の解析を迅速に進展させることが可能であることを示した。しかしながら、我々が最初に作製したDNAアレイは非常に原始的なものであり（ジーントラップにより捕捉された遺伝子のcDNA断片をナイロン・メンブレン上に配列させた、いわゆる「マクロ」アレイ）、いくつかの問題点が明らかになった。例えば、
 - (i) 捕捉された遺伝子のcDNA断片をPCRによって増幅させるためには約200塩基対の長さが必要だが、遺伝子によっては、反復配列 (repetitive sequences) を完全に排除した上でそれだけの長さを確保することが難しい、
 - (ii) アレイ上のプローブが二重鎖cDNA断片の場合、特に未知の新規遺伝子に関しては、どちらのDNAストランドが発現されているのか、判別困難な場合がある、

などである。そこで我々は、ES細胞中でランダムにトラップされた遺伝子（あるいはその候補）のうち、機能が未知のもの（約500）を選び、それぞれにつき反復配列を完全に排除した合成DNA (70mer) のプローブを用意し、スライドガラス上に標準的なマイクロアレイを作製した。このマイクロアレイを利用しスクリーニング実験を行ったところ、興味深い発現パターンを示すいくつかの新規遺伝子を見出すことができた。

6) 3個のエクソンより構成される新規遺伝子 08v3-033 は、マウス胸腺中の (i) CD4-CD8-細胞、(ii) CD4+CD8+細胞、それに (iii) CD4-CD8+細胞の一部のサブセット、に局限して発現されている。胸腺の CD4+CD8-細胞や抹消リンパ組織（脾臓など）のT細胞（CD4 or CD8）では発現されていない。ラットのホモログを利用した塩基配列の解析などに基づき、我々は目下のところ、この遺伝子からは non-coding RNA が転写されていると考えている。ジーントラップによりこの遺伝子（の片方のallele）が破壊されたES細胞クローンを利用し、現在この遺伝子に関するノックアウト・マウスの作製を進めている。

7) マウス ES 細胞中で発現していない遺伝子をも解析対象にするべく、poly A トラップ型のジーントラップを実行すると、トラップベクターは遺伝子の最後のイントロンに大きく偏って挿入されることが判明した。また、この偏りの基盤となる分子メカニズムは、mRNA サーベランス機構のひとつ、nonsense-mediated mRNA decay (NMD) であることが見出された。

8) NMD を抑制することにより、トラップした遺伝子の上流のイントロンにも好んで挿入される poly A トラップ型のジーントラップ・ベクター UPATrapの開発に成功した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ジーントラップ法と DNA アレイ技術を結び付けた研究を実施しているのは、我々のグループと、Phil Soriano のグループ（米国シアトル、フレッドハッチンソン癌研究所）の二つのみである。

2004年9月、国際的な共同研究計画「The Knockout Mouse Project」がNature Genetics誌に発表され、遺伝子トラップと遺伝子ターゲティングの手法を組み合わせることにより、今後5年間でマウス ES 細胞中の全遺伝子を破壊することが世界中の研究者に呼びかけられた。それによれば、まずはランダムな遺伝子トラップの手法を用い、迅速にできるだけ多くの遺伝子を ES 細胞中で破壊する。ランダムな遺伝子トラップ法で破壊できなかった遺伝子に関しては、次のステップで、遺伝子ターゲティングの技術により一つ一つ手間ひまかけて破壊して行く。

ランダムな遺伝子トラップは、その原理に基づき、promoter trap 法と poly-A trap 法の二つに大別される。このうち、前者についてはその有効性も既に十分認知されており、さまざまな分野の研究に広く応用されているが、同法には「標的細胞中で発現されていない遺伝子をトラップすることができない」という致命的な欠点が存在する。

これに対し、poly-A trap 法には「標的細胞中での発現の有無にかかわらず、どのような遺伝子でも捕捉することができる」という大きなメリットが備わっているが、我々は、poly-A trap 法ではベクターが遺伝子の最末3'側の（最後の）イントロンに挿入された細胞クローンばかりが選択的に単離されてしまう、という事実を見出した。

我々は、ベクターの挿入部位に関するこの驚くべき

「偏り」は、poly-A trap のために用いられる選択マーカーの mRNA が nonsense-mediated mRNA decay (NMD) と呼ばれる mRNA のサーベランス機構によって分解されてしまうために引き起こされる、という証拠を得た。

さらに、理想的な遺伝子トラップ技術の確立を目指し、我々は、選択マーカーの mRNA に対する NMD の影響を完全に排除した新しい poly-A trap 法、「UPATrap」を開発した。この新しい遺伝子トラップ法の創出により、標的細胞中で転写活性を持たない遺伝子を、ベクターの挿入部位に関する「偏り」が皆無の状態で捕捉することが初めて可能となった。このことは、国際的な共同研究計画「The Knockout Mouse Project」の遂行にとり、大きな障害となっていたステップのひとつが解消されたことを意味する。

2004年9月に発表された国際的共同研究計画「The Knockout Mouse Project」の牽引役を自認するカナダでは、国家的プロジェクトGenomeCanadaの一環として、ES細胞を用いた大規模な遺伝子トラップが実施されている（<http://www.cmhd.ca/genetrap/index.html>）。このカナダのナショナル・チームは、ES細胞で発現していない遺伝子群をジーントラップにより、ランダムかつ完全に不活性化するために、我々が開発したUPATrap法を採用した（上記URLを開くと、奈良先端大”NAIST”のロゴマークが現れる！）。この例からも分かるように、UPATrap法の開発は、マウス・ゲノムプロジェクトの推進のため、非常に大きな役割を果たしていると言うことができる。このUPATrap法は、純粋に我が国で開発された手法であり、カナダに「いいとこ取り」されるのを防止するためにも、我が国の内部で大きく発展させることが望ましい。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

遺伝子がトラップされたES細胞クローンの数を増やす計画が、予定通りには進行しなかった。これは、計画の途中で遺伝子トラップの手法そのものに致命的な欠陥があることに気づき、その問題点を克服するべく、時間とエネルギーを投入したためである（前項参照）。

しかし、その甲斐があり、NMD抑制型の新しい遺伝子トラップの手法 UPATrap を開発することに成功した。

〈今後の課題〉

1) ジーントラップ ES 細胞クローンの数をさらに迅速に増加させる。

2) 新しい遺伝子トラップの手法 UPATrap では、薬剤選択マーカー遺伝子（NEO）の停止コドンの下流にEMCV由来のinternal ribosome entry site (IRES) 配列を挿入することにより、融合型NEO mRNAのNMDによる分解を抑制しているが、その分子メカニズムを解明する。

3) IRES配列を用いず、NMDを抑制する手法を考案することにより、UPATrapの原法よりもさらに洗練された遺伝子トラップ法を開発する。

4) 現在は、129-C57BL/6 F1マウス由来のES細胞株を用い

て遺伝子トラップを行っているが、これを純粋に C57BL/6マウス由来のES細胞株を用いた研究へと転換させる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

原著論文とデータベース

1. 0403262037

Matsuda, E., Shigeoka, T., Iida, R., Yamanaka, S., Kawaichi, M., and Ishida, Y. Expression profiling with arrays of randomly disrupted genes in mouse embryonic stem cells leads to in vivo functional analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (12), 4170-4174 (2004).

2. 0505081841

Shigeoka, T., Kawaichi, M., and Ishida, Y. Suppression of nonsense-mediated mRNA decay permits unbiased gene trapping in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.*, 33 (2), e20 (2005).

3. 211261606

Iida, R., Shigeoka, T., Tamura, M., Matsuda, E., Kawaichi, M., and Ishida, Y. The NAISTrap database (<http://bsw3.naist.jp/kawaichi/naistrap.html>) (2002).

日本語総説

テクノトレンド「NMD経路の抑制による新しい遺伝子トラップシステムの構築」

重岡稔章、石田靖雅.

バイオテクノロジージャーナル（羊土社）5, 464-466 (2005).

スペシャルレビュー「NMD経路の抑制による理想的な遺伝子トラップシステムの構築」

重岡稔章、石田靖雅.

細胞工学（秀潤社）24, 729-733 (2005).

工業所有権等

特許出願（特願2002-310334、特開2004-141074）

「ノックアウト動物の簡便作製方法」

発明者：石田靖雅、出願日：平成14年10月24日.