

# 新たに発見された活性型L1トランスポゾンを利用した突然変異マウス作出と遺伝子同定

●森 政之

信州大学大学院医学研究科加齢適応医科学系専攻分子細胞学部門加齢生物学分野

## 〈研究の目的と進め方〉

哺乳動物ゲノムに内在するL1配列は自立的に高い頻度で宿主染色体上を転移して挿入突然変異を誘起し、その後の突然変異遺伝子のクローニングのためのタグともなりうる利点を有する。我々が新たに発見したラットのL1トランスポゾンを利用して、精細胞、あるいは体細胞でL1トランスポゾン強制発現するL1-トランスジェニックマウスを作製し、transposon-tagged mutagenesisを試みる。新たなマウス突然変異体作製法の確立、機能遺伝子の同定、疾患モデルマウスの確立を目指す。

## 〈研究開始時の研究計画〉

### 1. L1の特性解析

ラットのLyst遺伝子内に集積するL1配列に関して、レトロトランスポゾンとしての特性を解析する。哺乳動物発現ベクター-pcDNA4/TOにL1bとこれと逆方向にネオマイシン耐性遺伝子を連結した発現コンストラクトを作製する。レトロトランスポジションを経過してネオマイシン耐性遺伝子内のイントロンがsplice outされ、ネオマイシン耐性遺伝子のopen reading frameが回復され、染色体DNAに挿入された時にのみ細胞がネオマイシン耐性を獲得できる系を利用する。培養細胞を用いて転移効率、転移挿入部位の指向性に関して検討する。

### 2. 遺伝子ノックアウトES細胞バンクの構築

L1配列のES細胞での発現を企図して $\beta$ -アクチンプロモーターにL1を連結した発現コンストラクト、および精細胞特異的な発現を促進するマウスphosphoglycerate kinase 2遺伝子のプロモーターにL1を連結した発現コンストラクトを作製する。エレクトロポレーション法により発現コンストラクトをマウスES細胞に導入する。L1のレトロトランスポジションによりネオマイシン耐性遺伝子が染色体に転移挿入されれば、ES細胞はネオマイシン耐性を獲得することとなる。このようなネオマイシン耐性ES細胞クローンを数万個単位で樹立し、液体窒素中で凍結してバンク化する。各クローンより発現コンストラクトをタグとして転移挿入部位の染色体DNA配列を回収し、遺伝子データバンクと照合して、その遺伝子名を同定する。

また、受精卵へのマイクロインジェクション法によりL1-トランスジェニックマウスを作成する。

### 3. 突然変異マウス個体の作製

興味深い遺伝子への転移挿入が確認されたES細胞をマウス個体へと発生させる。転移挿入変異が構造遺伝子に生じた場合、突然変異は遺伝的に劣性な機能喪失型か、L1プロモーターによるドミナントな異常活性化であることが予測される。また、その他の領域に転移した場合でも体細胞で導入L1プロモーターからの転写が宿主DNAにまで及び、co-suppression現象によるドミナントネガティブ変異が生じることも期待される。劣性変異の検出のためにL1b-トランスジェニックマウスからF2マウスを作成する。

作出したマウス活動性、聴覚、視覚、筋力、重力走性

などの行動形質、学習記憶検査、各部形態、毛色などの形態形質、血液性状、血圧などの測定を行なう。さらに15ヶ月齢～自然寿命まで観察後、検査剖検を行ない、発がん特性、寿命などの老化プロファイルなども解析し、疾患モデルとして確立するとともに、破壊遺伝子の正常機能を解明する。

## 〈研究期間の成果〉

①ACI-beigeラットにおけるChediak-Higashi症候群様の症状の原因がLyst遺伝子内に存在する二つのL1間の組み換えに起因することを明らかとした(成果リスト1)。そのうちの一つであるL1bの全長をクローニングし、塩基配列の決定を行なった結果、二つのオープンリーディングフレーム(ORF1とORF2)とその5'上流域にSp1ボックスを含むプロモーター様配列、3'下流域にポリA配列、またその全長の上下流に短い反復配列が認められ、典型的なL1レトロトランスポゾン構造を有していることが明らかとなった。ORF2にコードされる蛋白質のアミノ酸配列は、これまでに報告されているヒトおよびマウスの活性型L1配列のものと同じ高相同性を示した。対照的にORF1にコードされる蛋白質のアミノ酸配列にはORF2ほどの高い相同性は認められず、種特異性が明らかとなった。同じLyst遺伝子内のL1間の組み換えを有するDA-beigeラットのL1bはORF2コード領域内に1塩基欠失を有し、レトロトランスポゾン活性を喪失していることが判明した。

②Lyst遺伝子はラット第17番染色体q腕末端近傍に位置することを明らかとした(成果リスト2)。ヒトおよびマウスのゲノム解析のデータより、染色体末端近傍はL1配列の多い場所の一つであることが明らかとされている。ラットのLyst遺伝子にL1配列が集積している一つの原因として、その位置が染色体末端近傍であることが推測された。また、突然変異型Lyst対立遺伝子と正常型対立遺伝子とを識別するためのPCR法を開発した(成果リスト3)。さらに、コンジェニック法により突然変異型Lyst遺伝子と胸腺とT細胞欠損の原因遺伝子であるFoxn1<sup>tm</sup>遺伝子を合わせもつ新たな先天性免疫複合不全モデルラットを確立した(成果リスト5)。

③L1bを哺乳動物発現ベクター-pCEP4中にクローニングし、培養HeLa細胞にトランスフェクトすることによりレトロトランスポゾン活性を証明した。

④L1bの下流にNeo耐性遺伝子を連結してHeLa細胞中で強制発現させると、Neo耐性遺伝子内のイントロンのスプライシングが著しく抑制されることを見出した。この現象は、L1のレトロトランスポジションによる新たな遺伝子機能抑制機構として注目される。

⑤Serial Analysis of Gene Expression (SAGE)法を用いて3ヶ月齢のマウス精巣でのL1配列の発現パターンを調査した。また、老化により精巣での染色体DNAのメチル化などに乱れが生じた場合に伴いL1の転写活性が変化する可能性を調査するために、29ヶ月齢のマウスを用いて同様に調査を行なった。その結果、マウス精巣中でのL1

の発現はいずれの月齢でも非常に低レベルであることが明らかとなった（成果リスト4）。

#### 〈国内外での成果の位置づけ〉

ヒトを含めた哺乳動物のゲノム解析には有用な突然変異マウスを網羅的に作製する試みとして、国内外で化学物質を変異源とするマウス飽和突然変異体作製プロジェクトが進行している。また、Sleeping Beautyなど魚類、ハエ、線虫に由来するトランスポゾンを利用したマウス突然変異体作製の試みも行なわれている。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

①L1発現コンストラクトは必然的にサイズが大きくなり、クローニング段階での意図外のミューテーションの導入や、大腸菌、哺乳動物培養細胞のトランスフォーメーション効率が極端に低下し、解析の遅れの原因となった。また、発現コンストラクト内でL1の下流に薬剤耐性マーカー遺伝子を挿入すると、予想外にそのイントロンのスプライシングが抑制され、薬剤耐性による選抜効率が極端に低下してしまった。

②さらにレトロトランスポジションが生じた培養細胞クローンから、3' RACE法により転移挿入部位（遺伝子）の同定を試みたところ、L1内部に存在する潜在的ポリAシグナルが使用されていることが判明し、転移挿入遺伝子の同定には至らなかった。L1bのORF内には、潜在的なポリAシグナル配列が17カ所ある。実際にmRNA転写の際にはそれらのうちのいくつかがポリAシグナルとして使用されるため、途中切断型のL1-mRNAが大量に転写され、完全長のL1-mRNAの比率が極めて低いことが明らかとなった。

③公表されたヒトおよびマウスのゲノム解析データによると、L1配列は染色体末端近傍や遺伝子密度が低い領域に集積していることが明らかとなった。L1 transposon-tagged mutagenesisの効率低下の原因となりうるものが予測された。

④精巣においてもL1は（おそらくは）メチル化により発現が抑制されていることが推察された。

#### 〈今後の課題〉

効率的なL1 transposon-tagged mutagenesis法を確立するためにはマウスES細胞内あるいはマウス精巣でのL1の転移効率を高めることが必須である。具体的には、潜在的ポリAシグナルの使用を回避するために、アミノ酸配列を変化させず、かつポリAシグナルが無くなるように人為的に塩基配列を巧みに改変する必要がある。プロモーターの選択を含め、マウス精巣でのL1の転写効率が最大限となるような発現コンストラクトの全面的改良が必須である。また、精巣ではメチル化による発現抑制を回避する方策の検討が必要である。Retrotranspositionに際して構造遺伝子をヒットする確立を高めるために、AT-richな配列を嗜好するL1のORF2のエンドヌクレアーゼをGC-richな部位を特異的に認識するように改変することも必要である。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0303191912

Mori, M., Yamasaki, K., Nakanishi, S., Kitada, K., Higuchi, K., Namiki, C., Hamada, S., and Serikawa, T., A new beige mutant rat ACI/N-Lyst<sup>tg-Kyo</sup>, *Experimental Animals*, 52 (1), 31-36 (2003) .

2. 0303200854

Masui, N., Nishikawa, T., Takagi, Y., Mori, M., Suzuki, T., and Sato, K., The rat lysosomal trafficking regulator (Lyst) gene is mapped on the telomeric region of chromosome 17, *Experimental Animals*, 52 (1), 89-91 (2003) .

3. 0403261414

Masui, N., Mori, M., Nishikawa, T., Takagi, Y., Asai, H., Yanabe, M., Yamasaki, K., Serikawa, T., and Sato, K., An allele-specific genotyping method for rat Lyst (lysosomal trafficking regulator) gene, *Experimental Animals*, 53 (1), 77-80 (2004) .

4.

Yao J., Chiba T., Sakai J., Hirose K., Yamamoto M., Hada A., Kuramoto K., Higuchi K., and Mori M., Mouse testis transcriptome revealed using serial analysis of gene expression, *Mammalian Genome*, 15 (6), 433-451 (2004) .

5.

Masui N., Nishikawa T., Takagi Y., Kimura H., Mori M., Yokose S., Asai H., Yanabe M., and Sato K., Establishment of a set of combined immunodeficient DA/Slc-Foxn1<sup>tm</sup> Lyst<sup>tg</sup> congenic rat strains, *Experimental Animals*, 53 (5), 399-407 (2004) .