

## 可変型遺伝子トラップクローンデータベース；EGTC

●荒木 正健<sup>1)</sup> ◆荒木 喜美<sup>2)</sup> ◆吉信 公美子<sup>1)</sup>

1) 熊本大学 生命資源研究・支援センター 2) 熊本大学 発生医学研究センター

### <研究の目的と進め方>

遺伝子改変マウスは、個体レベルでの遺伝子機能解析を行うための有力なツールである。我々は、部位特異的組換えシステムである Cre-lox システムを応用し、単なる遺伝子破壊型の変異を作り出すだけではなく『可変型遺伝子トラップ法』を開発し、様々な改良を加えてきた。本研究は、平成16年8月に公開を開始した可変型遺伝子トラップクローンのデータベース；

EGTC (Database for the Exchangeable Gene Trap clones) [<http://egtc.jp/>] を充実させ、さらにバージョンアップさせることを目的とする。

近年、ドイツの GSF、アメリカの Bay Genomics、イギリスの Sanger Institute など、既にいくつかのグループが国家レベルのプロジェクトとして遺伝子トラップ ES 細胞株を大量に産生しており、平成16年に発足した IGTC(International Gene Trap Consortium) 全体で約6,000 遺伝子 (45,000 クローン以上) が登録されている。EGTC は、日本を代表するジーントラップクローンデータベースとして、ひとつでも多くのトラップラインを樹立し、トラップした遺伝子の解析を行うことが求められている。

そこで、初年度 50 クローン、2 年目以降は年間 100 クローンを目標に、EGTC データベースを充実させる。5 年後には 500 種類の変型遺伝子トラップマウスラインが入手可能になる。それぞれのマウスラインにおいて、レポーター遺伝子を任意の遺伝子に交換する『post-insertional modification』が自由自在に行え、バイオリソースとして様々な分野での有効活用が期待される。

### <研究開始時の研究計画>

===2005年度の具体的な目標===

- (1) EGTCの登録データ数を100クローン以上に増加させる。
- (2) IGTCとの連携を強める。
- (3) B6由来ES細胞を実用化する。

===実験計画===

(1) 構築したトラップベクター；pU-21 等を用いて、遺伝子トラップ ES 細胞を作製する。この ES 細胞からキメラマウスを作製し、ジャームライントランスミッション確認後、受精卵及び精子凍結を行う。また、ES 細胞の DNA 及び RNA を用いて、トラップされた遺伝子の解析を行う。トラップベクターが1個だけ挿入されたクローンを選んで、キメラマウスを作製する。生殖系系列に入るのを確認したクローンに関して、5'-RACE を行い、トラップされた遺伝子が何であるのかを同定する。さらに RT-PCR を行い、トラップされた遺伝子とレポーター遺伝子 b-geo の fusion mRNA を確認する。RT-PCR が成功したクローンに関して、5'-RACE で得られた塩基配列情報を DDBJ に登録する。DDBJ 登録後、可変型遺伝子トラップクローンのデータベース EGTC への登録作業を行う。

(2) 第1回 IGTC Informatics Workshop (2005年4月) に参加し、EGTC データベースに関するプレゼンテーションを行い、IGTC の運営方針決定に関して議論する。IGTC members のメー

リングリストに参加し、リアルタイムで協議しながら、IGTC の新しい Website 構築に貢献する。

(3) 現在樹立中のフィーダーフリーの C57BL/6 由来 ES 細胞が、遺伝子トラップに使用可能かどうか、実際にトラップクローンを単離して、それらのキメラ形成能、Germline Transmission 率を確認する。

### <研究期間の成果>

(1) EGTC 登録データに関して

(a) トラップベクターの改良・・・これまで主に使用していた pU-21 の、lox71 の位置をよりスプライスアクセプターに接近させた「pU-21B」を構築した。このベクターを用いて得られたクローンは、トラップベクターが染色体にインテグレートする際に lox71 まで欠損するケースが少なくなり、プロジェクト全体の効率アップに貢献した。

また、pU-21B のスプライスアクセプターから beta-geo の翻訳開始コドンまでの 3 フレームすべてにストップコドンを導入した pU-21T を作製した。

(b) フィーダーフリー ES 細胞株の検討・・・日本におけるノックアウトマウス作製に一般的に使用されている TT2 ES 細胞株のフィーダーフリー化を行った。最初に実用化した KTPU10 は、キメラマウスの離乳後、ICR と交配して多数の系統で産仔を得たが 2 ヶ月を過ぎる頃に産仔数が減少し、その後産仔が無くなった。次に IVF を行うと精子の無い系統が見つかった。KTPU10 から得られたキメラマウスは出生後 4 ~ 5 ヶ月で精子形成が止まるケースが多いことが明らかとなった。そこで、やはり TT2 ES 細胞株をフィーダーフリー化した KTPU8 を用いてキメラマウスを作製した。KTPU8 は、KTPU10 と同様に高いキメラ作成能を示した。また、KTPU10 から作られたキメラマウスと異なり、KTPU8 キメラマウスは繁殖能力に問題はなかった。多くの子孫の Germline Transmission も確認されており、遺伝子トラップだけではなく通常のノックアウトマウス作製にも有用である。

(c) EGTC データベースのバージョンアップ・・・サーバーマシンを上位機種に変えるなどハード面の整備と、トラップされた遺伝子に関する情報を充実させるなどソフト面のリニューアルを並行して行った。特に、UCSC Genome Browser の BLAT Search Genome を用いて、5'-RACE 配列のマウスゲノムへのマッピングを行い、トラップベクターが遺伝子のどの部分に挿入されたかが一目で判るような図を添付することにした。また、Ensembl Contig View, UCSC Genome Browser, NCBI Entrez Gene, および MGI (Jackson Lab) へのリンクを張り、スムーズな情報収集が出来るように工夫した。さらに、可変型遺伝子トラップシステムの概要やプロトコルを説明するために、① The Exchangeable Gene Trap System, ② Trap Vector, ③ Exchangeable System, ④ ES Cell lines, ⑤ Isolation of Trap Clones, ⑥ Establishment of Trap

Mouse Lines & Registration in EGTC, ⑦ Deposition of trap lines in CARD, および⑧ Reference のページを作成し、公開している。

(d) データ登録件数について

2006年1月26日現在、72クローンをEGTCに登録、公開している。この他、ジャームライントランスミッションを確認し、5'-RACEによる解析を行っているクローンは20ほどあり、シングルコピーインテグレーションを確認しキメラマウスを作製中のクローンは30ほどあるので、今年度中に目標である100クローンをクリアできるのではないかと期待している。

(2) IGTCとの連携に関して

(a) 2005年4月14～15日にUCSF, San Franciscoで開催された第1回IGTC Informatics Workshopに参加した。1日目はIGTCの主要メンバーであるBaygenomics (アメリカ)、CMHD (カナダ)、Sanger (イギリス)、GGTC (ドイツ)、ESDB (カナダ)、に続いてEGTCデータベースに関するプレゼンテーションを行った。その後、NCBI、Ensembl、UC Santa Cruz、およびJackson Labがそれぞれのデータベースの紹介とGene Trap Communityへの対応についてプレゼンテーションを行った。2日目は、IGTC Informatics Projectの進め方、および新しいWeb siteのデザインや運営方針について協議した。2日間を通して、EGTCも大規模トラップグループと同列に扱ってもらった。IGTCの新しいWeb siteにはEGTCも組み込まれることが正式に決定した。EGTCはスモールスケールながら、ほぼすべてのクローンについてマウスラインを樹立していることを強調し、存在感を示すことが出来た。

(b) IGTC membersのメーリングリストに参加し、リアルタイムで協議しながら、IGTCの新しいWebsite構築に貢献した。IGTCの新しいWebsite[<http://www.genetrap.org/>]は、2005年8月に公開された。それまで6センターだったIGTC Membersに、EGTCとTIGEM (イタリア)が追加された。

(3) B6由来ES細胞の実用化に関して

マウスを用いた実験に最もよく用いられているC57BL/6 (B6) マウスから、17系統のFeeder Free ES細胞株を樹立した。そのうち7系統についてキメラマウス作製を試みた。キメリズムの良いものはICRマウスと交配して、Germline Transmissionするかどうかを検討した。Germline Transmissionし、かつ比較的細胞の形状が良かった2クローンにトラップベクターpU-21Tを導入し、G418耐性クローンを単離した。現在、このB6マウス由来のES細胞株を用いて得られたトラップクローンからキメラマウスを作製しているところである。

<国内外での成果の位置づけ>

我々は可変型遺伝子トラップ法を確立し、民間企業への技術移転も行った。しかしながら、(株)トランスジェニックを中心に進めている大規模遺伝子破壊プロジェクトで得られた情報は、パテント取得を目的としているため自由に公開することが出来ない。そこで、新たなトラップベクターpU-21などを用いて、自由に研究に使用できるクローンを改めてピックアップしているところである。

遺伝子トラップには、大きく分けて「プロモータートラップ」と「polyAトラップ」の2種類がある。先行していた民間企業；レキシコンの場合、「polyAトラップ」を採用したため、ラストエクソンの前のイントロンにベクターが挿入され、トラップされ

た遺伝子はnullになっていないケースが多い。我々は「プロモータートラップ」を採用し、さらに開始コドン周辺にベクターが挿入されやすくなる工夫を行っているため、トラップされた遺伝子はnullになっている確率が高い。

熊本大学は遺伝子改変マウスの産生に関しては国内トップレベルであり、胚及び精子の凍結保存に関しては、世界の3代拠点のひとつとなっている。また、Cre-変異loxシステムを用いた遺伝子置換に関しては世界をリードしている。2004年7月にイギリスのSanger Instituteで開催された『2004 Gene Trap Workshop』において、参加した研究グループのほとんどが、我々が提唱した可変型遺伝子トラップシステムの利用を実施もしくは計画していた。他のグループが公開しているのは、全てES細胞株についてのデータベースであり、必ずしもマウスラインが樹立できるとは限らない。しかしながら、EGTCの場合は遺伝子の解析より先にマウスラインを樹立しているため、利用する研究者にとってのメリットは非常に大きい。

[その後の進展について]

特定領域「ゲノム」によるEGTCへの支援は2005年度だけであったが、その後、熊本大学教育研究経費(2006年度)、理研BRC受託研究費(2007～2008年度)、科研費基盤研究(B)(2008～2010年度)等の支援を受けて、データベースEGTCの整備を進めている。2009年11月22日現在、ES細胞として790クローンを登録しており、そのうち254クローンについては既にマウスラインを樹立し、CARD R-BASEに寄託している。790クローン中、678クローン(85.8%)は既知遺伝子をトラップしており、ESTが55クローン(7.0%)、Newが57クローン(7.2%)であった。また666クローンに関して、UCSC Genome BLATを用いて、トラップベクターの挿入位置をマウスゲノム上にマップしている。560クローンはKEGG geneをトラップしており、134クローンについてはKEGG PATHWAY解析へのマッピングも行なっている。

さらに、EGTCに登録されたトラップクローンの情報は、DDBJを経由してIGTC, MGI, UCSC Genome Browser等に自動的に登録されるようになっている。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1.601272055

Miyata, K., Oike, Y., Hoshii, T., Maekawa, H., Ogawa, H., Suda, T., Araki, K., and Yamamura, K. Increase of smooth muscle cell migration and of intimal hyperplasia in mice lacking the alpha/beta hydrolase domain containing 2 gene. *Biochem Biophys Res Commun* 329:296-304, 2005.

2.601281439

Taniwaki, T., Haruna, K., Nakamura, H., Sekimoto, T., Oike, Y., Imaizumi, T., Saito, F., Muta, M., Soejima, Y., Utoh, A., Nakagata, N., Araki, M., Yamamura, K., and Araki, K. Characterization of an exchangeable gene trap using pU-17 carrying a stop codon-beta geo cassette. *Dev. Growth Differ.*, 47, 163-172 (2005).

3.601271856

Miura, K., Yoshinobu, K., Imaizumi, T., Haruna, K., Miyamoto, Y., Yoneda, Y., Nakagata, N., Araki, M., Miyakawa, T., Yamamura, K., and Araki, K. Impaired expression of Importin/karyopherin beta1 leads to post-implantation lethality. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 341, 132-138 (2006).

4.601281539

Semba, K., Araki, K., Li, Z., Matsumoto, K., Suzuki, M., Nakagata, N., Takagi, K., Takeya, M., Yoshinobu, K., Araki, M., Imai, K., Abe, K. and Yamamura, K. A novel murine gene, *Sickle tail (Skt)*, linked to the *Danforth's short tail (Sd)* locus, is required for normal development of the intervertebral disc.

Genetics, in press.

2) データベース/ソフトウェア

5.601271915

EGTC [<http://egtc.jp/>]

3) 特許など なし。

4) その他顕著なもの

6.601281600

Araki, K. Exchangeable gene trapping. in *Genetically Engineered Mice Handbook*. (eds Sundberg. J.P. & Ichiki T.) pp.131-143, CRC Press, Boca Raton, USA (2005).