

トランスポゾンを用いた網羅的変異マウス作製によるゲノム機能の解析

●堀江 恭二

大阪大学大学院医学系研究科環境・生体機能学

<研究の目的と進め方>

哺乳動物のゲノム機能を個体レベルで理解する上で、変異マウスは極めて有用な研究材料である。我々はこれまで、新規のトランスポゾンである Sleeping Beauty トランスポゾンを生殖細胞で転移させて、変異マウスを迅速かつ大量に作製する方法を開発してきた。さらに2005年度の本領域の支援により、変異マウスのデータベースの構築と表現型解析を進めた。しかしこの過程で、表現型解析を網羅的に行うためには、ホモマウス作製のための膨大な施設と人力を要すことを経験し、新たな手法を開発する必要性を痛感した。そこで昨年度からは、ホモマウスを作製せずに個体レベルで表現型を解析する方法の確立を目指して、体細胞において両アレルへ変異を導入する方法の開発を試みている。具体的には、(1)Sleeping Beauty トランスポゾンによる体細胞での効率良い変異導入、(2)Bloom 遺伝子の一過性発現抑制による両アレルへの変異導入、の2つの方法を開発する。(2)は、Bloom 遺伝子の発現抑制に伴う相同染色体間組換え効率の上昇を利用した方法であり、我々は既に、テトラサイクリンシステムを用いることにより、ES細胞レベルで原理の証明に成功している。劣性の表現型のモデルケースとして癌に着目し、両アレルへの変異導入による癌の誘発と、変異部位の同定による癌抑制遺伝子のスクリーニングを試みる。

<2007年度の研究の当初計画>

本研究の遂行にあたり、これまでに以下の3系統のマウスを作製してきた。

(1)すべての組織で外来性遺伝子を高発現できると期待される ROSA26 遺伝子座へトランスポゼース遺伝子をノックインしたマウス。

(2)変異導入に必要な最小ユニットであるスプライスアクセプターとポリA付加シグナルのみを有すトランスポゾンベクターを導入したマウス。トランスポゾン領域の長さは、これまでの8分の1となり、転移効率の向上が期待できる。

(3)テトラサイクリンシステムによる発現制御が可能のように Bloom 遺伝子を改変したマウス。発現抑制の効率が高まるように、我々が開発したテトラサイクリン依存性転写抑制因子を導入した。

2007年度は、上述の3系統のマウスを互いに交配し、改変型 Bloom 遺伝子座がホモで、トランスポゼースとトランスポゾンを持つマウスを樹立することを計画した。これにより、マウスの体細胞でトランスポゾン転移させて遺伝子変異を導入し、かつ、ドキシサイクリン投与で Bloom 遺伝子の発現を低下させて相同染色体間の組換えを誘発し、変異を両アレルへ導入する。表現型としては発癌に着目し、癌組織におけるトランスポゾン挿入部位を決定することで、癌抑制遺伝子をスクリーニングする。

<2007年度の成果>

前項の研究計画で記載のマウスについて、トランスポゾンの転移効率の評価を行なった。ROSA26 遺伝子座へのトランスポゼース遺伝子のノックインについては、既に転移能が確認されている、我々が過去に用いて来たトランスポゾンベクターを有すマウスと交配し、PCR法にて種々の組織における転移効率を定量した。その結果、従来用いていた CAG プロモーターからのトランスポゼースの発現に比べて、これまで調べたすべての組織において、トランスポゾンの転移頻度が同等以上であった。これより、従来のマウス系統に比べて、より高い効率の遺伝子変異導入を期待できると考えられた。

今回新たに作製したトランスポゾンベクターを有すマウスについては、上記の ROSA26-トランスポゼース系統との交配後に、上記と同様に PCR 法にて転移を確認し、本ベクターが機能することを証明した。

さらに、研究計画で記載の交配を行なうことで、改変型 Bloom 遺伝子座がホモで、かつ、トランスポゼースとトランスポゾンを持つマウスを得た。このマウスに対して、ドキシサイクリンを投与し、発癌の有無を調べるための経過観察を行なっている。

<国内外での成果の位置づけ>

両アレル変異を導入するために Bloom 遺伝子を改変する方法は、世界的には、いくつかの研究グループが試みている。しかし、Bloom 遺伝子の完全なノックアウトは致死性との報告もあり、容易では無い状況である。このような中で、テトラサイクリンシステムを用いた我々のシステムは、致死性を回避しながら効率かつ可逆的に Bloom 遺伝子の発現低下を誘導できる可能性があり、より汎用性の高い方法になりうると考えている。

現在、すべての遺伝子に対するノックアウト ES 細胞を樹立しようとの国際プロジェクトが大々的に進行しているが、ES 細胞から表現型解析に至るまでのプロセスについては、従来の発生工学的手法を用いざるをえないため、表現型解析を迅速化するための初期段階を改善するに留まるのが現状である。我々の手法は、個体レベルでの表現型解析における迅速化を図っている点で、ES 細胞の国際プロジェクトとは異なる方向から網羅的遺伝子機能解析に寄与できると考えている。

ラットにおいては、ES 細胞が存在しないために、変異体を作製するための手段として、トランスポゾンシステムが注目されている。我々は過去に、我々が従来開発してきた生殖細胞系列でのトランスポゾン変異導入法がラットへも応用できることを報告してきた (Nat Methods 4:131,2006)。本研究課題の体細胞での変異導入法も、ラットをはじめとした他のモデル動物へも広く応用可能と考えられ、将来への展開が期待される。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本研究では、最終的に表現型解析を行なうには、改変 Bloom 遺伝子座がホモで、かつ、トランスポゾンとトランスポゼースの両者を有すマウスを得る必要がある。しかし、これまでの交配では、この遺伝型のマウスの数が、メンデルの法則による予想数よりも低く、表現型解析に用いるマウスの大量作出が進みにくい状況である。このような遺伝型のマウスで adult に達したものは得られていることから、決してこの遺伝型が致死的なものではないと考えている。可能性のひとつとして、マウスの遺伝的背景が、C57BL/6J への backcross によって均一化してきたために、生存力が低下してきていることが考えられる。今後は、生存力をより高めるために、一旦、異なる系統のマウスへ交配して遺伝的背景を heterogeneous にした上で、再度、必要なマウスを得るための交配を行なうことを考えている。

本研究で作製してきたマウスは、トランスポゾンの転移や Bloom 遺伝子の発現制御の面で機能性を認めたものの、現時点では発癌は認めていない。発癌にはある程度の時間を要するため、さらなる経過観察が必要というのが、可能性のひとつである。しかし、それ以外に、発癌に至るには、複数の遺伝子変異が必要であり、単にトランスポゾンで遺伝子を破壊するのみでは不十分という可能性もあり、次項で述べるように、今後の課題のひとつである。

<今後の課題>

マウスへのドキシサイクリン投与による Bloom 遺伝子発現制御の効果は、Bloom 遺伝子の機能抑制を調べる指標として広く用いられている「姉妹染色分体間組換え頻度」によって、証明済みである。一方、本研究で最終的に必要なのは、マウス体内での「ホモ変異細胞の出現頻度」であり、姉妹染色分体間組換えの頻度は、あくまで間接的な指標と考えねばならない。しかし、「ホモ変異細胞の出現頻度」頻度をマウス生体内で定量するのは、既存の技術では困難であり、我々のマウスにおいても調べられていない。このため、実験結果の正確な評価や、厳密な実験計画の立案が不可能な状況である。そこで、ホモ変異体とヘテロ変異体の区別を容易に行うためのマーカーを開発することが極めて重要と考え、現在、開発を試みている。そのようなマーカーが開発できれば、ホモ変異体の細胞のみに着目した表現型解析も可能になるので、発癌以外の種々の生命現象に対しても我々のシステムを応用できると期待される。

今回用いたトランスポゾンで導入できる変異は、遺伝子の不活化であるが、発癌に至るには、癌遺伝子の活性化も同時に行なわれる必要があるかもしれない。よって、挿入部位の周辺の遺伝子の発現を誘発するタイプのトランスポゾンベクターの開発も考慮する必要がある。または、特定の発癌遺伝子を、トランスジーンとして強制発現する方法も考えられる。

ドキシサイクリンの投与は、現在のところは、出生後に行なっている。しかし、我々の両アレル変異導入法が細胞複製後の相同染色体間組換えに依存することを考えれば、細胞分裂が活発な胎児期からドキシサイクリンを投与する方が、両アレル変異導入の効率は高まると予想される。過去の報告から、ドキシサイクリンの胎児への投与は、母体への投与によって効率的になされることが知られている。Bloom 遺伝子を完全にノックアウトすると胎生致死になるという報告もあるので、注意深い実験条件の検討が必要ではあるが、本システムの効率化のためには重要な項目と考え

ている。

<成果公表リスト>

1) 論文

1. 0705071031

Horie K, Saito ES, Keng VW, Ikeda R, Ishihara H, Takeda J. Retrotransposons influence the mouse transcriptome: implication for the divergence of genetic traits. *Genetics* 176: 815-827, 2007.

2. 0705071015

Ikeda R, Kokubu C, Yusa K, Keng VW, Horie K, Takeda J. Sleeping Beauty transposase has an affinity for heterochromatin conformation. *Mol Cell Biol* 27: 1665-1676, 2007.

2) 総説

1. 0801251803

Takeda J, Keng VW, Horie K. Germline mutagenesis mediated by Sleeping Beauty transposon system in mice. *Genome Biol* 8 Suppl 1:S14, 2007.