

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>

モデル動物としてのマウスの重要性は、近年、益々高まっている。我々は、マウスにおける網羅的遺伝子機能解析を加速化するために、Sleeping Beauty という新規のトランスポゾンを用い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。また、テトラサイクリンシステムを用いた Bloom 遺伝子の一過性発現抑制により相同染色体間組換えを誘発して、マウス ES 細胞においてヘテロ変異体からホモ変異体を誘導する方法も開発した。さらに、この ES 細胞からマウス個体を作製し、トランスポゾンによる変異導入法と組み合わせ、マウス個体レベルで両アレルを破壊することも試みている。このような手法は、ショウジョウバエのモザイク解析に類似しているが、ショウジョウバエと比較すると、マウスにおいてはホモ変異体の細胞を可視化するマーカーが存在しないことが、応用性を妨げる一因となっている。そこで本研究では、ホモ変異体を可視化するためのレポーターを開発する。レポーターには、個体レベルでの検出を可能とするために、蛍光タンパクを用いる。

昨年度までの研究項目であった、トランスポゾンを用いて作製した変異マウスの表現型解析、および、マウス個体レベルでの Bloom 遺伝子発現制御法の開発についても継続する。

<2008 年度の研究の当初計画>

ホモ変異体を同定するための基本原理は、薬剤耐性遺伝子を用いることで、ES 細胞レベルで既に一定の成功を取っている。この手法では、ヘテロ変異体では変異導入用ベクターに配置された 2 種類の薬剤耐性遺伝子のうちの一方しか発現しないが、ホモ変異体では、一方のアレルの薬剤耐性遺伝子の配置が部位特異的組換え酵素により改変され、その結果として、1 つの細胞内で両方の薬剤耐性遺伝子が発現し、ホモ変異体の選択が可能となる。そこで、本研究では、2 種類の薬剤耐性遺伝子の代わりに、蛍光タンパクの N 末側断片と C 末側断片を配置する。各々の断片には、互いに相互作用するドメインが融合されている。よって、ホモ変異体において N 末側断片と C 末側断片の両方が発現すると、それらに融合された相互作用ドメインを介して蛍光タンパクの立体構造が再構成され、蛍光を発すると予想している。蛍光タンパクを分断化するシステム自体は、既に GFP (とその誘導体) や Kusabira-Green (mKG) で報告があるが、その多くは、transient expression による解析である。本研究では、各々のレポーター遺伝子がゲノムへ 1 コピーのみ挿入した状況でも十分な感度の蛍光を発する必要があるため、複数のレポーターシステムを構築して、強度を比較する。また、相互作用ドメインについても、細胞毒性を最小限に抑えるために、動物細胞の内在性タンパクとは相互作用をしないものを試みる。以下、具体的項目を (1) - (4) に記す。

(1) レポーター遺伝子について

既に他の研究者により報告されている、Venus または mKG を分断化した発現ユニットを用いる。

(2) 相互作用ドメインについて

上記レポーター遺伝子は、いずれも、動物細胞の内在性遺伝子の配列を、相互作用ドメインとして使用している。そこで、動物細胞に存在しない人工的な相互作用ドメインと置き換えて、蛍光強度を調べる。

(3) プロモーターについて

種々の細胞系譜で本手法を適用できるように、恒常的な発現に適した複数のプロモーターを比較検討する。

(4) 蛍光の評価手順

まず、培養細胞での transient transfection により、蛍光を評価する。蛍光の程度が強いものについては、トランスポゾンまたはレトロウイルスベクターを用いて、1 コピーのみのレポーター遺伝子を導入した stable cell line を作製し、蛍光の強さを検定する。

昨年度から継続の、マウス個体レベルでの表現型解析については、トランスポゾンシステムで得られた多動性マウスのヒト疾患モデルとしての可能性を薬理的に評価する。

テトラサイクリンシステムを用いた Bloom 遺伝子改変マウスでは、ホモ変異体の出生率が低いという問題点が明らかになったので、遺伝的背景を変えることによりホモ変異体の出生率を高めることを試みる。

<2008 年度の成果>

ホモ変異体の可視化については、モデル実験として、Hela 細胞への transient transfection を行なった。その結果、Venus と mKG のいずれにおいても、分断化タンパクの再構成によると思われる蛍光を確認している。しかし、蛍光タンパクの発現による細胞毒性も認められた。蛍光を発する部位は、細胞内で局在しており、かつ、明視野でも識別可能な構造体に一致していた。この構造体は、transfection を行っていない細胞、もしくは、蛍光タンパク全長を発現させた際には認めなかったため、蛍光タンパク自体が凝集塊を形成している可能性が示唆された。意外にも、相互作用ドメインを有さない分断化タンパクの導入でも、明らかな蛍光が認められた。次に、分断化タンパクの発現ベクターをゲノム上へ導入した stable cell line を作製したところ、野生型の蛍光タンパクに比べて、強度が弱いものの、検出可能な蛍光を認めた。

Bloom 遺伝子改変マウスについては、遺伝的背景を変えることで、出産率の改善を試みた。これまで C57BL/6 系統への戻し交配を行ってきたマウスを、他のマウス系統と交配させたところ、より安定的な産仔数を得られることを確認した。また、以前に比べてより多くのホモ変異体も得られるようになった。ホモ変

異体の出生率は、メンデルの法則で期待されるものよりは少ないので、胎生期での死亡が完全に回避されているわけではないが、今後も遺伝的背景を変えることで、さらなる改善の可能性があると考えられる。

多動性マウスについては、薬理的検査に向けてのマウスの作出を行なった。

<国内外での成果の位置づけ>

現在、欧米のグループが中心となって、すべての遺伝子に対する変異 ES 細胞を作製するための国際プロジェクトが進行中であり、近い将来には、目的の遺伝子に対する変異 ES 細胞を容易に入手できる時代が到来すると期待されている。しかし、遺伝子の機能解析を行なうためには、発生工学的手法を用いたキメラの作製と、その後の交配によるヘテロ、ホモ変異体の作製を経ねばならず、この過程に対しては、現段階では大きな技術革新は無いのが現状である。我々が試みているトランスポゾンを用いた変異導入法は、ヘテロ変異体の作製を効率化するものであり、また、Bloom 遺伝子の一過性発現抑制を利用した両アレル変異導入法は、ホモ変異体の作製を効率化するものである。よって、これらの技術開発により、変異マウスを用いた遺伝子機能解析法の進展に大きく寄与できると考えられる。実際、我々の作製した Bloom 遺伝子改変マウスは、国内外の研究者から分与の依頼を受けており、今後、様々な分野へ応用されるものと期待される。Bloom 遺伝子は、通常的手法で完全にノックアウトすると致死になるとの報告もあるので、我々が行なっているテトラサイクリンシステムによる制御系は、致死性を回避した解析を可能にするものと考えられる。

本年度に試みた「ホモ変異体の可視化」は、手法は異なるものの、ショウジョウバエでの遺伝学的解析において広く用いられており、その有用性は証明されている。よって、マウスにおいても可能になれば、遺伝子機能解析における一般的手法として、多くの分野へ応用されるものと期待される。

多動性マウスについては、ヒトの疾患である注意欠陥・多動性障害、または、統合失調症と共通した表現型を得ている。また、変異遺伝子は、これらの疾患の原因遺伝子としての報告は、これまでになされていない。よって、今後の解析で、本マウスがヒト疾患のモデルとして位置づけられることになれば、新規薬物の開発のための新たなターゲットを、広く世界に提供できると考えられる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

蛍光タンパク断片と相互作用ドメインとの融合タンパクの発現により、細胞への毒性が認められた。蛍光タンパク断片のみでは、顕著な毒性は無かった。毒性の生じた理由として、(1) 蛍光タンパク断片と相互作用ドメインの融合タンパクの folding の効率が低い、(2) 相互作用ドメイン自体が、細胞の内在性タンパクと相互作用して、その機能を阻害する、などが考えられ、今後の改善を要する。

また、蛍光タンパク断片の再構成時の蛍光強度は、transient expression では極めて高く、野生型の全長タンパクに迫るほどの強さであるが、stable cell line を作製した際には、野菜型と比べて、強度が大きく低下していた。よって、本法の汎用性を高めるには、より強いシグナルを得る必要があると考えられた。

行動異常のマウスの表現型解析については、マウスの繁殖に予

想外の遅れを取ったが、次年度には十分な解析を行なえると考えられる。

<今後の課題>

両アレル変異体の可視化については、前項で記載の細胞毒性の回避と蛍光強度の増強が必要と考えられる。具体的には、他の相互作用ドメインを利用することが、解決への方向性の1つと考えられる。

トランスポゾンを用いた遺伝子破壊については、これまで我々は、Sleeping Beauty に特化して行なってきた。しかし、近年では、Sleeping Beauty 以外にも、マウスで用いることの可能なトランスポゾンがいくつか報告されてきている。レトロウイルスにおいては、ゲノムへの挿入部位に大きな偏りがあることが知られているが、トランスポゾンにおいても、トランスポゾンの種類ごとに、ゲノムへの挿入部位の分布に違いが生じる可能性がある。よって、本研究の目的の1つである「ゲノム全体へ網羅的な変異導入」を達成するためには、今後は、Sleeping Beauty 以外のトランスポゾンについても検討を進める必要があると考えられる。この目的で、本ゲノム班の川上浩一博士より、Tol2 トランスポゾンを分与いただいております。マウス ES 細胞をモデルとして遺伝子破壊への応用を試みつつある。

<成果公表リスト>

論文/プロシーディング

0805181948

Saito ES, Keng VW, Takeda J, Horie K. Translation from nonautonomous type IAP retrotransposon is a critical determinant of transposition activity: Implication for retrotransposon-mediated genome evolution. *Genome Research* 18: 859-868, 2008.