

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>

ゲノム機能を個体レベルで理解する上で、変異体は極めて有用な研究材料である。しかし、大腸菌、酵母、ショウジョウバエ、線虫などのモデル生物に比べて、マウスをはじめとする哺乳動物では、変異体の網羅的な作製に多大な労力と時間を要す。この問題点を解決するため、我々は、新規のトランスポゾンである Sleeping Beauty トランスポゾンを用いることにより、多数の変異マウスを迅速に作製する方法を開発してきた。本研究では、この技術をゲノム機能の理解へ向けてさらに発展させるため、初年度には、以下の項目の達成を目指した。

- (1) Sleeping Beauty トランスポゾンを用いて作製した多数の変異マウスについてホモマウスを作製して表現型を解析し、本法の有用性を検証する。
- (2) 変異マウスの解析を包括的に行うために、変異遺伝子の情報を種々の公共データベースと関連づけた、独自のデータベースを構築する。
- (3) Sleeping Beauty トランスポゾンは転移前の部位の近傍へ転移する傾向がある。そこで、より広汎にゲノム上を転移すると期待されるレトロトランスポゾンを利用した変異導入法を開発する。
さらに、研究の進展に伴い、次年度以降は、我々が独自に開発してきた Bloom 遺伝子の一過性抑制に伴う両アレル変異導入法を、トランスポゾンシステムと融合させることを試みた。これにより、ホモ変異体マウスを作製せずとも、表現型解析を可能にすることを期待した。具体的には、以下の目標を設定した。
- (4) マウス生体内の体細胞において、トランスポゾンでの変異導入を行う。さらに、マウス生体内で Bloom 遺伝子の発現を一過性に抑制することで、マウス間の交配を介さずに、ホモ変異体細胞を誘発する。
- (5) 上記のホモ変異体を可視化する技術を開発する。
- (6) ホモ変異体 ES 細胞の分化誘導により、個体実験を模した表現型解析を行う。

<研究開始時の研究計画>

以下は、初年度（2005年度）の研究計画であり、2006年度以降の計画については、<研究期間の成果>に含めて記載する。

- (1) Sleeping Beauty トランスポゾンを用いて作製した変異マウスにおける、ホモ変異体の作製と表現型の解析
研究開始時において、我々は、遺伝子破壊に適したエレメントを導入した Sleeping Beauty トランスポゾンを開発し、100個以上の遺伝子について、ヘテロ変異体を作製していた。2005年度は、これらの中から数十個の系統についてホモ変異体を作製し、本手法による遺伝子機能解析の有用性を検証することを計画した。従来の遺伝子破壊法によりホモ変異体の表現型が報告されている遺伝子についてもホモ変異体を作製し、同様の表現型が得られるかどうかを調べ、ベクターの変異原性を検証することを計画した。
- (2) トランスポゾン変異マウスのデータベースの構築
変異マウスに関して我々自身が実験的に得てきた情報を、種々

のゲノムデータベース（NCBI, UCSC, Ensembl の web site 等）と有機的に関連づけたデータベースを構築し、変異マウスを包括的に解析する体制を確立することを計画した。変異マウスの精子の凍結保存も併せて行うこととした。

(3) レトロトランスポゾンを用いた変異導入法の開発

レトロトランスポゾンのひとつである intracisternal A particle (IAP) エレメントを用いる。IAP エレメントはマウスのゲノム上に 1000 コピー存在するにもかかわらず、転移活性のあるものは不明であった。我々は、転移活性のある IAP エレメントを同定し、GFP を転移の検出のためのマーカーに用いたトランスジェニックマウスを既に作製していた。そこで、このトランスジェニックマウスにおいて、種々の組織での転移活性を検定することを計画した。

<研究期間の成果>

(1) Sleeping Beauty 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

Sleeping Beauty トランスポゾンによる変異体の中で、既にホモ変異体の表現型が報告されている Sox5 および Bmpr1b についてホモマウスを作製したところ、過去の報告と同一の表現型が得られた。これより、本トランスポゾンベクターの変異原性の高さが証明された。さらに、過去にホモ変異体が報告されていない遺伝子についても解析を進め、胎生期または生後の致死、多動などの表現型が得られた。胎生期致死の代表例として Arpc3 遺伝子を取り上げ、trophoblast の outgrowth が低下することを示した。同時に、トランスポゾンによる変異が、通常のジーンターゲット法と同一の表現型を示すことも証明した。多動のマウスについては、ヒト疾患との関連性を調べるために、各種の薬剤に対する反応性を解析し、ヒト疾患のモデルとしての可能性を示唆する結果を得ている。

また、多くの変異体を解析する過程で、Sleeping Beauty の転移は転移前の在位の近傍の約 4Mb に集積する傾向があることがわかった。この性質を利用して、ゲノムの特定の領域に、網羅的に変異を導入できることを証明した。また、約 2 割の転移は他の染色体に広汎に起きることもわかり、ゲノムワイドな変異導入も可能であることが証明された。

転移前の在位の近傍へ転移が集積するという性質を利用して、ゲノムの特定の領域に対して、エンハンサートラップや、Cre/loxP システムによる deletion を誘発することにも成功した。

(2) 変異マウスに関するデータベースの作製

発表論文 (Keng et. al., Nature Methods, 2005) に付随する形で、公開した。変異マウスの精子の凍結保存も進め、約 200 系統のマウスの精子凍結を終えた。この中の一部は、理研バイオリソースセンターへも寄託し、受精卵として凍結している。既に、国内外の研究者からの寄託依頼も受けている。

(3) IAP ベクターを有すトランスジェニックマウス

マウス生体内での転移は検出できなかった。これより、IAP エ

レメントの転移機構自体について、解明する必要があると考え、マウス生体内で高頻度に転移する Id1 型の IAP エレメントがコードするタンパクの、新規の機能を明らかにした。

*以降は、2006年度以降の成果であり、前項の<研究開始時の計画>には記載が無い。

(4)マウス生体内の体細胞における変異導入法の開発

我々が生殖細胞系譜での変異導入に用いてきたトランスジェニックマウス系統では、体細胞でのトランスポゾンの転移効率は、生殖細胞の10分の1未満と低かった。体細胞で効率良く転移を誘発するために、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系統を樹立した。この結果、従来用いていた系統と比べて、調べたすべての組織において、同等以上の転移頻度を確認できた。また、トランスポゾンの転移効率はトランスポゾンの長さに逆相関することも知られている。そこで、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有すマウス系統を樹立し、転移を確認した。

Bloom 遺伝子改変マウスについては、ES細胞において Bloom 遺伝子座へ、テトラサイクリン依存性の転写因子、抑制因子、およびテトラサイクリン応答性プロモーターを導入後、Bloom 遺伝子の発現制御の改善を ES 細胞レベルで確認した上で、マウス個体を作製して系統を樹立した。テトラサイクリン依存性の抑制因子は、我々が独自に開発したものであり、標的遺伝子の leak を抑制できると期待された。これらのマウスを交配し、改変 Bloom 遺伝子座がホモのマウスを作製し、Bloom 遺伝子の活性低下の指標として広く用いられている姉妹染色分体間の組換え (SCE) を調べたところ、ドキシサイクリンの投与によって、SCE 頻度の明らかな上昇を認めた。この頻度は、以前に作製した、テトラサイクリン依存性転写抑制因子を導入していないマウスに比べて高かった。これより、マウス個体レベルにおける Bloom 遺伝子の発現制御の改善に成功したものと考えられた。

上記の3系統のマウスを互いに交配し、改変 Bloom 遺伝子座がホモで、トランスポゾンとトランスポゼースを共に有すマウスを作製した。しかし、改変 Bloom 遺伝子座がホモのマウスの出生率が低いという問題に遭遇した。これについては、マウスの遺伝的背景が影響していることが示唆される結果を得た。遺伝的背景の均一化を避けることで、産仔を安定的に得ることに成功したが、表現型を同定するには至っていない。この点については、本マウスを他の研究者へも提供することを通じて、研究を継続している。

(5)ホモ変異体細胞の可視化

蛍光タンパク分断化し、かつ、互いに相互作用するドメインに融合させた2つの遺伝子断片を用い、ホモ変異体のみにおいて、2つの遺伝子断片が発現して、蛍光タンパクが再構成され、蛍光を発するように、実験をデザインした。マウス個体実験を行う前に、培養細胞レベルで、この原理を調べたところ、transientに plasmid を導入した条件では、蛍光タンパクの再構成を容易に認めたが、ベクターをゲノムへ導入して stable に発現させた状態では、検出感度が極めて低かった。また、transient の発現時に、細胞毒性を認めた。これらの問題を解決するために、複数の蛍光タンパクを用いたが、十分な感度は得られなかった。

(6)ES細胞レベルでの表現型解析

マウス個体レベルでのホモ変異体の誘導・解析は容易でないため、Bloom システムを利用してホモ変異体 ES 細胞を単離し、in vitro の分化系により、個体実験を模した表現型解析を試みた。その結果、神経系への分化が障害された変異体を同定できた。このような培養細胞レベルでの表現型解析は、変異マウスを作製す

るための候補となる変異 ES 細胞を選定するために有用と考えられた。

<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。我々が開発してきた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。

Sleeping Beauty トランスポゾンを用いた変異マウス作製は、我々とミネソタ大学のグループが世界に先駆けて行っているが、変異マウスの作製数では我々が凌駕している。また、我々が提唱した、ゲノムの特定の領域に対する網羅的な変異導入は、他の変異導入法に無い特徴といえる。Sleeping Beauty トランスポゾンの成功が契機となって、他のトランスポゾンシステム (piggyBac, Minos 等) をマウス個体レベルで用いる試みもなされており、我々の研究が、それらのプロトタイプとして位置づけられると考えている。

我々は、Sleeping Beauty が local に転移するとの特徴を利用して、ゲノムの特定の在位におけるエンハンサートラップやゲノムの deletion の誘発を行ったが、これは、本法ならではのユニークな手法として注目され、「Faculty of 1000 Biology」にも選ばれた。

Bloom 遺伝子座に変異を導入したマウスは、これまで複数のグループから致死性か否かという点で、相反する報告がなされている。また、レトロウイルスによる挿入変異と組み合わせることで、癌抑制遺伝子のスクリーニングを行った報告もなされている。これまでの報告を総合すると、Bloom 遺伝子が完全にノックアウトされるとマウスは致死の可能性が高く、癌抑制遺伝子のスクリーニングに用いられた系統には Bloom 遺伝子の発現にリークがあったために致死性が回避されたと考えるのが、一般的な解釈の一つと思われる。よって、我々が開発した手法を用いて、テトラサイクリンシステムによって胎性期には Bloom 遺伝子の発現を保ち、致死性の表現型を回避したのちに Bloom 遺伝子の発現を止めることにより、さらに有効な癌抑制遺伝子のスクリーニング法を樹立できると期待できる。また、Bloom 遺伝子の発現抑制とトランスポゾンによる変異導入を組み合わせた成功例は報告が無い。レトロウイルスでの変異導入と比べて、トランスポゾンによる変異導入法は、トランスポゾン内部の配列を変えることによって、変異原性や変異に伴い発現させる遺伝子 (レポーター遺伝子等) を改変できる。さらに、トランスポゼースを組織特異的なものにすることで、組織特異的な変異導入を行うことができる。このように、レトロウイルスにはない汎用性を備えており、将来的な発展が期待できる。尚、本研究で開発したテトラサイクリン依存性転写抑制因子は、Bloom 遺伝子以外の遺伝子研究を行っている国外研究者からのリクエストが複数来ており、本手法の一般性の高さを示している。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

(1) トランスポゾンを用いた変異体作製技術

多数の変異体を迅速に作製してデータベースを構築するための基盤技術は確立できたが、その一方で、表現型の解析を網羅的に行うことの困難さを痛感した。我々は、数十系統の変異マウスについて併行して表現型解析を進めたのだが、ホモ変異体を作製するための交配に要す飼育スペースと、マウスの管理に要する労力は膨大なものあり、ひとつの研究室で行うには限界がある。この経験をもとに、ES細胞レベルでのホモ変異体単離と、*in vitro* 分化誘導系を利用した表現型解析システムの構築にも力を入れることにした。細胞レベルの実験であれば、一つの研究室でも、網羅的解析が可能と考えたためである。

IAP エlementについては、培養細胞レベルでは転移を認めたのに対して、マウス生体内で転移を認められなかったのは予想外であった。Sleeping Beauty トランスポゾンがサカナ由来であるのに対して、IAP エlementはマウス自体が有す内在性のトランスポゾンであるので、マウス生体内に、転移を抑制する機構が存在し、そのために転移を検出できなかった可能性が考えられる。

(2) Bloom 遺伝子改変マウス

Bloom 遺伝子改変マウスを用いて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、特定のマウス系統への 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。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が、どのような遺伝的背景が適するかを、明確にする必要がある。

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、当初から期待していた「癌抑制遺伝子の両アレル破壊による発癌」という表現型は認めていない。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、今後の課題のひとつである。

(3) ホモ変異体細胞の可視化技術

ホモ変異体の可視化については、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時の細胞毒性が障害となった。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、などが考えられた。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、野性型と比べて、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。

<今後の課題、展望>

(1) ホモ変異体 ES 細胞を用いた網羅的表現型解析

マウス個体レベルでの網羅的な表現型解析を行うのは、極めて困難なことを、本研究を通じて痛感した。一方、本研究期間中に、

iPS 細胞の樹立が報告されたことを期に、細胞レベルでの様々な分化誘導実験が、世界的に大きく進展しはじめた。このような背景のもとに、我々は、マウス個体レベルのみならず、ES 細胞の *in vitro* 分化系を利用した表現型解析も開始した。今後は、現在急速に進展しつつある分化実験系を積極的に取り入れながら、細胞レベルでの表現型を自在に行える体制を整えたい。細胞レベルの実験は、個体レベルに比べて、単に簡便というのみならず、さらに他の遺伝子を過剰発現したり、他の遺伝子の機能阻害を重ねたりといったような、個体レベルでは困難な実験も可能となり、新たな局面を切り開くことができると考えている。また、近年、すべての遺伝子を破壊したヘテロ ES 細胞を樹立しようという国際プロジェクトも進展していることから、それらのプロジェクトとの差別化を明確にするためにも、ホモ変異体を用いた表現型解析法の確立は重要と考えている。

(2) 網羅的変異導入を可能にするためのベクターの開発

ES 細胞での変異導入用ベクターとして、これまで、レトロウイルスと Tol2 トランスポゾンを用いたが、この過程で、両者のゲノムへの挿入分布に差があることがわかった。さらに、本研究期間中に、piggyBac トランスポゾンの哺乳動物細胞への応用も報告され、急速に広がりつつある。また、他のグループから、Sleeping Beauty と piggyBac で、ゲノムへの挿入部位の分布が異なることも報告された。このような状況を踏まえると、ゲノム全体へ網羅的な変異導入を行うには、様々なベクターを併用することが必須と考えられる。そのための基礎的なデータとして、これらのベクターの挿入部位の分布の違いを、我々自身の手で、系統的に比較する必要があると考えている。

ベクター自体の構造についても、改良の余地がある。遺伝子内への挿入を同定する手段として、我々は、プロモータートラップ法を用いているが、現在のベクターでは、挿入部位の遺伝子とベクター内のレポーター遺伝子が、融合タンパクとして発現する。このため、融合に際してレポーター遺伝子の活性が消失することが十分に予想される。一方、最近報告された 2A ペプチド配列を用いると、レポーター遺伝子が、融合せずに、単独で発現するため、挿入に際する活性の消失を避けられ、さらに、変異の網羅性を高められると考えられる。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

- 0911291141
Kokubu, C., Horie, K., Abe, K., Ikeda, R., Mizuno, S., Uno, Y., Ogiwara, S., Ohtsuka, M., Isotani, A., Okabe, M., Imai, K. and Takeda, J.: A transposon-based chromosomal engineering method to survey a large cis-regulatory landscape in mice, *Nature Genetics*, 41, 946-952, (2009).
- 0805181948
Saito, E.S., Keng, V.W., Takeda, J., Horie, K.: Translation from nonautonomous type IAP retrotransposon is a critical determinant of transposition activity: Implication for retrotransposon-mediated genome evolution, *Genome Res*, 18, 859-868 (2008).
- 0801251803
Takeda, J., Keng, V.W., Horie, K.: Germline mutagenesis mediated by Sleeping Beauty transposon system in mice, *Genome Biol*, 8, Suppl 1:S14 (2007).
- 0705071031
Horie, K., Saito, E.S., Keng, V.W., Ikeda, R., Ishihara, H., Takeda, J.: Retrotransposons influence the mouse

transcriptome: implication for the divergence of genetic traits, *Genetics*, 176, 815-827 (2007).

5. 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.

6. 0608071857

Yae, K., Keng, V.W., Koike, M., Yusa, K., Kouno, M., Uno, Y., Kondoh, G., Gotow, T., Uchiyama, Y., Horie, K. and Takeda, J.: Sleeping Beauty transposon-based phenotypic analysis of mice: lack of *arpc3* results in defective trophoblast outgrowth, *Mol Cell Biol*, 26, 6185-6196 (2006).

7. 0606181154

Hayakawa, T., Yusa, K., Kouno, M., Takeda, J. and Horie, K.: Bloom's syndrome gene-deficient phenotype in mouse primary cells induced by a modified tetracycline-controlled transilencer, *Gene*, 369, 80-89 (2006).

8. 0601301047

Keng, V.W., Yae, K., Hayakawa, T., Mizuno, S., Uno, Y., Yusa, K., Kokubu, C., Kinoshita, T., Akagi, K., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., Horie, K. and Takeda, J.: Region-specific saturated mutagenesis in mice using the Sleeping Beauty transposon system, *Nature Methods*, 2, 763-769 (2005).

2) 学会発表

- 堀江恭二. IAP レトロトランスポゾンの転移機構とゲノム進化への示唆 第 81 回日本遺伝学会 2009.9.17. 松本
- 堀江恭二, 齋藤映介, Vincent Keng, 池田龍史, 石原弘, 竹田潤二. レトロトランスポゾンの転移がマウスのトランスクリプトームへ与える影響 第 28 回日本分子生物学会年会 2005.12.7. 福岡.
- Horie, K., Saito, E.S., Keng, V.W., Ikeda, R. and Takeda, J.: Retrotransposition assay of the IAP element in cultured cells and mice: possible experimental system for the study of transposon-silencing by small RNAs, *RNAi Meeting*, 2005.9.28., Cold Spring Harbor, USA.

3) 図書

無し

4) データベース/ソフトウェア

0601301102

Sleeping Beauty トランスポゾンを用いて作製した変異マウスのデータベースを、下記の URL にて公開

<http://www25.casi.osaka-u.ac.jp/japanese/database/index.html>

5) 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

無し

6) 新聞発表、その他顕著なもの

日経産業新聞 2009.7.28. 論文リストの 1 の文献を紹介。