

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06808

研究課題名(和文)新規の遺伝子発現制御マウスを用いたInv遺伝子の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of Inv gene functions by generation of novel transgenic mice.

研究代表者

渡邊 大介(Watanabe, Daisuke)

北里大学・理学部・講師

研究者番号：00260175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Inv遺伝子は動物の発生において左右軸の決定に関わる重要な遺伝子である。またヒトの家族性若年性ネフロン癆の原因遺伝子であることが解っている。本研究ではInv遺伝子の機能の解明を目的とし、任意の組織において特定の遺伝子の欠失誘導を可能とするコンディショナルレスキュー法を考案し、実際に組織特異的にInv遺伝子の欠失誘導が可能なコンディショナルレスキューマウスの作製に成功した。本研究で作製されたマウスは動物の左右軸の決定機構の解明やヒトの腎疾患の治療に活用されることが考えられる。また今回開発したコンディショナルレスキュー法は新規の遺伝子機能の解析手法として今後広く適用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The Inv gene is an important gene involved in the left/right axis determination in the development of animals. It is also known to be a causative gene of nephronophthisis type 2 (NPHP2) in human. In this study, to analyze the physiological function of the Inv gene, we devised a conditional rescue technic to induce specific genes inactivation in arbitrary tissues and we succeeded in making conditional rescue mice capable of Inv gene inactivation in tissue-dependent manner. The transgenic mice produced in this study will be used for elucidating the mechanism of the left/right axis determination of animals and the basic research for treating human kidney disease. In addition, the conditional rescue technic developed in this study is expected to be widely applied as a new analytical method of gene function in the future.

研究分野：分子発生学

キーワード：Inv遺伝子 左右軸形成 多発性嚢胞腎 コンディショナルノックアウト コンディショナルレスキュー  
トランスジェニックマウス

### 1. 研究開始当初の背景

Inv 遺伝子の変異をホモで有するマウスは、臓器の形状や位置関係がすべて左右逆転する完全内臓逆位 (situs inversus totalis)の表現型を表すとともに、腎臓に多数の水泡を形成する多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease) を発症する。また最近、乳児期において発症する家族性若年性ネフロン癆(NPHP2) はヒトの INV 遺伝子の変異が原因であることが明らかとなっている。しかし Inv 遺伝子の左右軸形成や腎臓における生理学的な機能は未だ明らかにされていない。

以前我々は Inv 遺伝子と GFP の融合遺伝子をマウス受精卵に導入することにより、Inv 遺伝子変異の表現型が完全にレスキューされたトランスジェニックマウスを作成し、その解析から Inv 蛋白質が細胞の繊毛内で機能していることを証明した (2003, *Development*)。また最近、Inv 遺伝子に対する shRNA を恒常的に発現する RNAi ノックダウントランスジェニックマウスの作成に成功し、そのマウスシステムの解析結果を報告した (2014, *PLoS ONE*)。この結果は *in vivo* においても機能的な分子を標的とした RNAi が可能であることを証明するとともに、この解析で用いた融合蛋白質の Tag 領域を標的とした RNAi トランスジェニックマウスの作成手法は、新規の遺伝子解析手法としての応用が期待されている。

作成された Inv ノックダウントランスジェニックマウスでは左右軸の形成は正常であるが成長にともない多発性嚢胞腎を発症することから、左右軸形成と腎臓形成では Inv 蛋白質の要求量が異なり、腎臓ではより多くの Inv 蛋白質が必要とされることが考えられた。またこのマウスでは *inv* ホモ変異マウスとは異なり生後致死とはならず、成長にともない脾臓の肥大化などの表現型が観察されることから、Inv 遺伝子の成体組織における新たな機能が示唆されるとともに作成された Inv ノックダウントランスジェニックマウスはヒト多発性嚢胞腎のモデルマウスとしての利用が考えられている。

Inv 遺伝子の組織特異的な機能を調べるにはコンディショナルノックアウトマウス法を用いた解析が有効であるが、完全内臓逆位などの表現型は FVB 系統マウス特異的であり、他の系統では左側相同等の異なった表現型が観察されるため (渡邊 未発表)、一般的なマウス系統由来の ES 細胞を用いた解析では正確な表現型の解析が期待できない。そこで従来の ES 細胞を必要とするコンディショナルノックアウトマウスの手法を用いずに、組織特異的に特定のレスキュー遺伝子を欠失させる新たな手法 (コンディショナルレスキュー法: 特願 2014-232689) を考案し、この手法により Inv 遺伝子の組織特異的な機能の解析を進めた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は Inv コンディショナルレスキュー法等の新規の研究手法を用いることより、Inv 遺伝子の左右軸形成や腎臓形成、さらにその変異が生後致死性のため解析が成されていなかった成体組織における生理学的な機能を明らかにすることである。これらの研究で得られる知見はヒトの INV 遺伝子変異疾患である家族性若年性ネフロン癆 (NPHP2) や多発性嚢胞腎の原因の解明や治療法の確立に寄与するものと考えられる。また本研究で開発したコンディショナルレスキュー法は遺伝子機能の新たな解析手法として今後広く応用されることが期待される。

### 3. 研究の方法

これまでの研究から EF1 遺伝子のプロモーター下に Inv と GFP の融合遺伝子を発現するベクターを受精卵に導入した場合、*inv* 変異マウスの表現型を完全にレスキューしたトランスジェニックマウスシステムが安定に得られることが解っている。そのため本研究においてもこのプロモーターをコンディショナルレスキューベクターのプロモーターとして用いる。この EF1 遺伝子のプロモーターの下流に lox 配列で挟まれた形で Inv と緑色蛍光蛋白質 (GFP) の融合遺伝子、または Inv 遺伝子と配列内リボソーム進入部位 (IRES) と GFP 遺伝子を連結した遺伝子をマウス受精卵に導入し、トランスジェニックマウスを作成する。これらのマウスでは EF1 遺伝子のプロモーター下に Inv ならびに GFP 蛋白質がすべての組織で安定的に発現されるため、Inv 遺伝子の変異によって生じた内蔵逆位等の表現型がレスキューされるとともに GFP の蛍光がレスキューされた組織において観察されることが期待される (図 1 A)。

またこれらの手法ではレスキュー遺伝子がゲノム上に導入されたトランスジェニックマウスの検出を出産直後の、新生児マウスの皮膚を直接、蛍光顕微鏡下で観察することにより、短時間かつ容易に判断することが可能となるため、成体マウスからのゲノム DNA の回収ならびにサザンブロットや PCR などの時間を要する解析を行う必要がなく、トランスジェニックマウスシステムの樹立や維持が飛躍的に簡便化される。この判別法の有効性に関してはこれまでに作成した Inv と GFP の融合遺伝子を発現するトランスジェニックマウスの研究で実証済みである。さらにこのベクター系を用いた場合、Cre 遺伝子の発現依存的な生体組織中または組織切片上での Inv 遺伝子の発現や欠失を、GFP の蛍光を指標として容易に判別することが可能となる。

また EF1 プロモーターの下流に lox 配列、Inv 遺伝子、IRES 配列、GFP 遺伝子、PolyA 配列、lox 配列、Ds-Red 遺伝子、PolyA 配列の順に連結したベクター系を用いた場合、Cre 遺伝子が活性化した組織では Inv 遺伝子が欠失すると同時に Ds-Red 遺伝子が発現す

るために、赤色の蛍光が観察され、反対に Inv 遺伝子が発現している組織では緑色の蛍光が継続的に観察される。そのため Inv 遺伝子が欠失した組織と正常な組織をそれぞれ異なった蛍光色で容易に識別することが可能となる(図1B)。

上記のベクターが導入されたコンディショナルレスキューマウスを作成した後は、P0-Cre マウス等の組織特異的に Cre 遺伝子を発現するマウス系統との間で交配を行い、目的とする組織において特異的に Inv レキュー遺伝子が欠失したマウスを作成し、その表現型から Inv 遺伝子の機能を解析する。さらに得られたマウスより初代培養細胞を作成し、Cre 遺伝子をトランスフェクションした細胞との間で比較することにより Inv 遺伝子の欠失がもたらす影響を *in vitro* において詳細に解析する。また並行して、Inv 遺伝子以外の遺伝子においても、コンディショナルレスキューマウスの作成をより効率的に進めることを目的とし、プロモーターならびに蛍光蛋白質等を改良した汎用性のベクター系の開発を進める。



図1. コンディショナルレスキューマウス作成ベクター

#### 4. 研究成果

コンディショナルレスキューマウスの作成を目的とし、先ず EF1 プロモーター下に Inv 遺伝子と GFP の融合遺伝子を恒常的に発現するコンストラクトの両端に loxP 配列を挿入することによって、Cre 遺伝子の発現依存的に Inv と GFP の融合遺伝子の発現が欠失するベクターを構築した。次に作成したベクターの有効性を調べるため、作成したベクターを Cre 遺伝子存在または非存在下で細胞にトランスフェクションを行った結果、ベクターのみの導入では確認された Inv 遺伝子と GFP の融合タンパク質が、ベクターとともに Cre 遺伝子が導入された細胞ではその発現が特異的に抑制されていることが抗体染色により確認された(図2)。

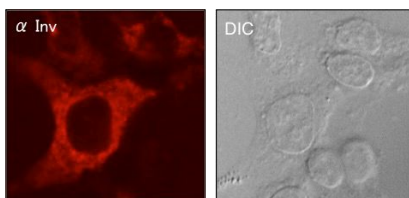


図2. コンディショナルレスキューマウス作成ベクターが導入された細胞における Inv 蛋白質の発現。

*in vitro* での実験において コンディショナルレスキューベクターの有効性が確認されたため、次に作成したベクターを用いてコンディショナルレスキューマウスの作成を行っ

た。FVB 系統マウスより得られた受精卵に上記のベクターDNA をマイクロインジェクション法により導入した結果、全4回の遺伝子導入により約60匹の新生児マウスを得た。得られたマウスよりゲノムDNAを回収し解析した結果、9匹のマウスにおいて導入したベクター遺伝子の存在が確認された。

次に遺伝子の導入が確認された各マウス系統を樹立し、それぞれ Inv 遺伝子変異マウスとの間で交配を行い、コンディショナルレスキュー遺伝子を発現し、かつ内在性の Inv 遺伝子が欠失した inv ホモ変異マウスを作成し、それらのマウスの表現型の解析を行った。その結果9系統のうち3系統においては肺や肝臓の分葉ならびに心臓 胃 脾臓 腎臓で認められる内臓逆位の表現型が完全にレスキューされ、正常化していることが確認された。この結果は導入されたコンディショナルレスキュー遺伝子が当初の研究計画どおりに生体内においても十分に機能していることを示す結果となった(図3)。

次に生体内に導入されたコンディショナルレスキュー遺伝子が本研究の目的どおりに Cre 遺伝子の存在下で特異的に欠失が誘導できるかについて調べるため、先ずコンディショナルレスキュー遺伝子を発現するトランスジェニックマウスより初代培養繊維芽細胞を樹立し、細胞に Cre 遺伝子をトランスフェクションした結果、Cre 遺伝子の発現依存的にコンディショナルレスキュー遺伝子の欠失が誘導されることが *in vitro* の解析において確認された。

さらに内臓逆位の表現型がレスキューされたコンディショナルレスキューマウス系統を用いて末梢神経特異的に Cre 遺伝子が活性される P0-Cre マウスとの間で交配を行い、本研究の目的とする組織特異的な Inv 遺伝子の欠失誘導が *in vivo* においても可能であるかについて解析を行った結果、三叉神経や挫骨神経など P0-Cre 遺伝子が発現している末梢神経特異的に Inv::GFP コンディショナルレスキュー遺伝子の欠失が誘導されていることが確認された(図4)。

またコンディショナルレスキュー遺伝子の発現と欠失の誘導を、2色の異なった蛍光蛋白質の発現の切り替わりでリアルタイムにモニターすることを可能とする改良型のベクターを構築し(図1B) その Cre 遺伝子の発現依存的なコンディショナルレスキュー遺伝子の欠失誘導と GFP から Ds-Red への蛍光蛋白質の切り替わりを細胞内で確認した。

本研究において我々はコンディショナルレスキューマウスの作成に必要なとされるベクター系を構築し、構築したベクターをマウス受精卵に導入することにより Inv 遺伝子変異によって生じる完全内臓逆位の表現型が完全にレスキューされた3系統のコンディショナルレスキューマウスを作成することに成功した。また得られたマウスより初代培

養細胞を樹立し、Cre 遺伝子の発現依存的にレスキュー遺伝子の欠失が誘導されることを *in vitro* において確認した。さらに神経組織特異的に Cre 遺伝子が活性される P0-Cre マウスとの間で交配した結果、本研究の目的どおりに末梢神経特異的に Inv レスキュー遺伝子の欠失が誘導されることを *in vivo* の研究においても明らかにした。

本研究により、我々が開発した組織または発生時期特異的に特定の遺伝子の欠失誘導を可能とするコンディショナルレスキュー法が有効に機能することが証明された。本手法は、コンディショナルノックアウトマウスの作成と比べ、短時間かつ低コストで目的とする遺伝子の組織特異的な欠失の誘導が可能となる新規の手法である。さらにこの手法は ES 細胞を必要としないため、ES 細胞が存在しないマウス系統やマウス以外の動物種にも適応可能な遺伝子発現制御動物の作成手法である。本手法は Inv 遺伝子の研究に限らず、今後多くの遺伝子の機能解析手法として広く適用されることが期待される。

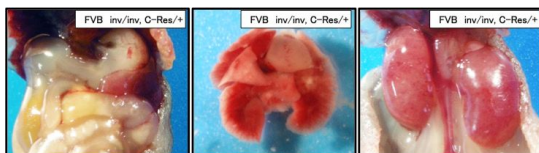


図 3. コンディショナルレスキュー遺伝子が導入された *inv* ホモ変異マウスにおける表現型 (内臓逆位) のレスキュー。

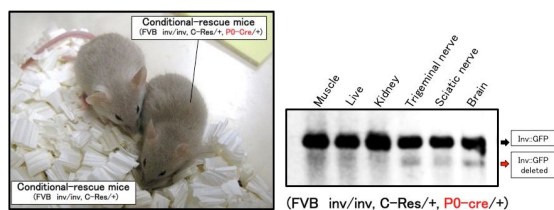


図 4. P0-Cre マウスとの交配で得られたコンディショナルレスキューマウスにおける末梢神経特異的なレスキュー遺伝子の欠失誘導。

#### 参考文献

Hamada, H., Meno, C., Watanabe, D., and Saijoh, Y. (2002). Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nature. Rev. Genet.* 3, 103-113.

Watanabe, D., Saijoh, Y., Nonaka, S., Sasaki, G., Ikawa, Y., Yokoyama, T., and Hamada, H. (2003). The left-right determinant Inversin is a component of node monocilia and other 9+0 cilia. *Development* 130, 1725-1734.

Kamijho Y., Shiozaki Y., Sakurai E., Hanaoka K. and Watanabe D. (2014) Multiple renal cyst development but not situs abnormalities in transgenic RNAi mice

against *Inv::GFP* rescue gene. *PLoS ONE* 9(2): e89652.

#### 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

Sakurai E., Fushimi T., Hanaoka K. and Watanabe D. Generation of conditional-rescue transgenic mice that can induce specific gene inactivation in tissue-dependent manner  
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)

Sakurai E., Fushimi T., Hanaoka K. and Watanabe D. Generation of conditional-rescue transgenic mice for tissue-specific expression of *Inv* genes.  
日本分子生物学会 2016 年度大会

Sakurai E., Fushimi T., Hanaoka K. and Watanabe D. Development of conditional-rescue technique that can analyze tissue-specific gene functions.  
日本分子生物学会 2015 年度大会

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 大介 (WATANABE Daisuke)

北里大学・理学部・講師

研究者番号: 00260175

(2) 研究協力者

目野 主税 (MENO Chikara)