

平成 23 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19200034

研究課題名（和文） トランスポゾンシステムを利用した C57BL/6 マウスにおける
ミュータゲネーシス

研究課題名（英文） Mutagenesis using transposon system in C57BL/6 mice

研究代表者

竹田 潤二（TAKEDA JUNJI）

大阪大学・先端科学イノベーションセンター・教授

研究者番号：50163407

研究成果の概要（和文）：Sleeping Beauty トランスポゾンシステムを利用しての変異マウスの作製には、以前より成功していた。本研究では、多くの研究者が汎用している C57BL/6 マウスにおいて、Sleeping Beauty トランスポゾンシステムを構築することを目標とした。そのシステムの構築のためには安定したトランスポーゼースを発現させる必要があるため、C57BL/6 マウス由来 ES 細胞の Rosa26 遺伝子座にトランスポーゼースを挿入させたクローンを獲得し、いつでも供給出来る体制を整えた。

研究成果の概要（英文）：We have succeeded generation of mutant mice with Sleeping Beauty transposon system. In this project, we established such system in C57BL/6 mice. To stably express SB transposase, we targeted the transposase gene into Rosa26 locus using C57BL/6 ES cells. We are able to distribute the ES cell line.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2008 年度	11,000,000	3,300,000	14,300,000
2009 年度	14,600,000	4,380,000	18,980,000
年度			
年度			
総計	35,300,000	10,590,000	45,890,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：トランスポゾンシステム、ミュータゲネーシス、C57BL/6 マウス、表現型解析、病態モデル

1. 研究開始当初の背景

これまでに多くの遺伝子破壊マウスが

ES 細胞を利用して作製され、個体における
遺伝子の機能を解析する手段の非常に有

用なものとして汎用されている。ただ、これまでには個々の研究者がそれぞれに遺伝子破壊マウス作製してきたので、その他の多くの研究者がそれら作製済みの遺伝子破壊マウスを利用して研究を推し進めようと思っても利用できないとか、利用するまでに多大な時間を浪費していた。そこで遺伝子破壊マウスを共通なツールとして利用していこうという国家レベルの動きがある。そのために ES 細胞を利用してトラップクローン、あるいは、ノックマウスクローンを網羅的に取得供給する試みが始まっている。

アメリカでは全ての遺伝子について null-allele をマウス個体で作製するプロジェクトが立ち上がり (The Comprehensive Knockout Mouse Project Consortium, The Knockout Mouse Project, Nat Genet. 36; 921-924, 2004)、一方、ヨーロッパでは ES 細胞においてコンディショナルアレルの導入を網羅的に行おうとしている (The European Mouse Mutagenesis Consortium, The European dimension for the mouse genome mutagenesis program, Nat Genet. 36; 925-927, 2004)。さらに 2006 年 9 月にアメリカ NIH は、B6 バックグラウンドで網羅的に遺伝子破壊マウスを作製するために ES 細胞でノックアウトクローンを取得するプロジェクトを採択した。

我々は、これまでサケ由来の新規トランスポゾン、Sleeping Beauty トランスポゾンを利用することが遺伝子破壊マウス作製に有効であることを報告してきた。すなわち、世界に先駆けて報告した生殖細胞におけるトランスポゾンの効率のよい転移 (Horie K., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98; 9191-9196, 2001)、

トランスポゾンシステムの網羅的遺伝子破壊マウス作製の可能性、(Horie K., et al., *Mol. Cell. Biol.* 23; 9189-9207, 2003)、ゲノム領域に限定した網羅的遺伝子破壊マウス作製 (Keng V.W. et al., *Nat Methods*. 2; 763-769, 2005) である。さらに表現型解析も通常の ES 細胞を利用するものと同様にできることを報告した (Yae K., et al, *Mol. Cell. Biol.* 26, 6185-6196, 2006)。本研究では、この ES 細胞を利用しないトランスポゾンシステムを B6 マウスに応用し、網羅的に遺伝子破壊マウスを作製しようとするものである。

2. 研究の目的

(1) これまで行っていた生殖細胞系列でのトランスポゾン転移の実験は、mixedバックグラウンドだった。同様のシステムをB6バックグラウンドで再構築する。すなわち転移の駆動力になるトランスポゼース発現トランスジェニックマウス (SBマウス) と、トランスポゼース認識配列を有するトランスジェニックマウス (GFPマウス) をそれぞれB6バックグラウンドで樹立する。SBマウスは駆動力の高いマウスを1ライン選択する。GFPラインに関しては、できるだけ多くのラインを選択する。両者を交配し、生殖細胞系列で転移が起こったマウスの頻度を解析し、B6バックグラウンドでの遺伝子破壊マウス作製効率を算定する。この解析結果から全ての遺伝子を破壊したマウスを作製するためには、どれくらいの規模が必要かを算出し、より大規模なプロジェクトの基盤とする。

(2) B6バックグラウンドで遺伝子破壊マウスを網羅的に作製しようと思うと、

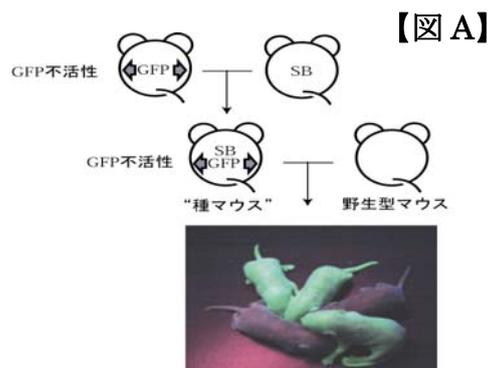
まずB6由来のES細胞を用意し、トラップベクターを用いて内在性遺伝子（主にES細胞で発現している遺伝子）を破壊する。内在性遺伝子が破壊されているES細胞クローンを胚盤胞に打ち込みキメラマウスを取得する。次にキメラマウスが germ line transmission するかどうかを確認する。一般にB6由来のES細胞は129由来のES細胞に比べ不安定でgerm line transmission する率が低いとされている。つまり、網羅的にB6バックグラウンドで遺伝子破壊マウスを作製するためには、ES細胞の維持管理が重要なファクターとなっている。しかも、これら国家レベルのプロジェクトも実際には全てのES細胞クローンからマウスを作製するわけではない。

我々が今回提案する戦略は、ES細胞を利用しない全く新しいものである。つまりマウス個体内、特に生殖系列で遺伝子をジャンプさせ、内在性遺伝子を破壊するものである。この手法を用いるとマウスを交配するだけで多くの遺伝子破壊マウスを直接作製することが出来、ES細胞の維持管理などの煩雑なステップがない。その上、マウス作製費は従来のES細胞を利用するものに比べ 1/10~1/100 と考えられ、コストの面でも優位な点が多い。

3. 研究の方法

まず、研究目的を達成するためのスキームを説明する。

遺伝子破壊マウスを作製するためには、2回の交配が必要である。1回目はトランスポゼース発現マウス（SB）とトランスポゾンをもつマウス（GFP）の交配である。両者を有するダブルトランスジェニックマウス（種マウス）の生殖系列で遺伝子転移が起こるので次世代で多くの遺伝子破壊マ



トランスポゾンの転位に伴うGFPの発現

ウスが誕生するわけである。これまでは、mixed バックグラウンドのマウスで行っていたが、これを B6 バックグラウンドにして、同様のスキームを構築する。

（1）マウス系統樹立

①

B6 バックグラウンドで 2 種類のトランスポゼース発現

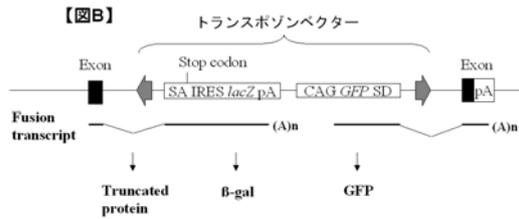
トランスジェニックマウスの樹立（【図 A】で SB マウスに相当）

（①-A） CAG-SB11 トランスジェニックマウスの作製；

強力で広範囲に発現を誘導する CAG プロモーターの下流に SB11 トランスポゼース遺伝子（これまでは SB10 といわれるトランスポゼース遺伝子を使用していたが、SB11の方が活性が高い）をつないだものを B6 由来の受精卵に打ち込み、トランスジェニックマウスを作製する。

（①-B） 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の作製；

全身でしかも安定してトランスポゼース遺伝子を発現させるために ROSA26 遺伝子座へトランスポゼース遺伝子（SB11）をノックインする。このとき、B6 バックグラウンドにしなければいけないので B6 由来の ES 細胞でノックインを行う。



②B6 バックグラウンドでトランスポズンを有する2種類のトランスジェニックマウスの樹立 (【図A】でGFPマウスに相当)

(②-A) ジーントラップ型トランスポズンを有するトランスジェニックマウスの作製

これまで遺伝子破壊マウス作製に使用してきた SA-IRES-LacZpA-CAGGFP-SD プラスミド (Horie K., et al., *Mol. Cell. Biol.* 23; 9189-9207, 2003, Keng V.W. et al., *Nat Methods*. 2; 763-769, 2005, 【図B】トランスポズンベクターに相当) をB6由来の受精卵に打ち込み、トランスジェニックマウスを作製する。

(②-B) 改良型ジーントラップ型トランスポズンを有するトランスジェニックマウスの作製

これまで使用してきたコンストラクトの中で、GFP-SDはポリAをトラップするユニットである。ポリAトラップは、多くの研究者から効率が非常に悪いことが指摘されてきた経緯がある。最近になり、その理由がNMD (nonsense-mediated mRNA decay) という機構にあることが示唆された。NMDは停止コドンが最後のエクソンにない場合そのmRNAは不安定になる機構であり、GFP-SDが内在性のエクソンをトラップした場合GFP内に存在する停止コドンがトラップmRNAの不安定性を誘導すると考えられる。石田らは、IRES配列を挿入することでNMDを回避できると報告している (Shigeoka T., Kawaichi M., Ishida Y., Suppression of nonsense-mediated mRNA decay permits unbiased gene trapping in

mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 33 : e20, 2005)。我々はIRESをGFPとSDの間に挿入した改良型トランスベクターを用いたトランスジェニックマウスを作製する。

(2) 転移効率の検定

B6バックグラウンドのトランスポーゼース発現するマウスとトランスポズンを有するマウスの両者を交配し、ダブルトランスジェニックマウスを作製する。ダブルトランスジェニックマウスのtail DNAを調整し、転移効率を測定する。これまでのmixedバックグラウンドマウスでの効率と比較することによりB6バックグラウンドでの効率を評価する。

平成20年度以降は、B6バックグラウンドのダブルトランスジェニックマウスを作製して転移効率を測定して行く。その効率が低くて次世代で効率よく遺伝子破壊マウスが作製できない可能性があるなら、これまでmixedバックグラウンドで作製したトランスポーゼース発現マウス、あるいはトランスポズンを有するマウスをポジティブコントロールとして利用してどこに問題点があるか検討する。転移効率は、①トランスポーゼースの発現量、②トランスポズンのゲノム上の挿入部に依存することが考えられるので、①に関しては、ウェスタンブロットによりどのトランスジェニックマウスがトランスポーゼースの発現量が多いか検討する。②に関しては、多種類のトランスポズンを有するトランスジェニックマウスを作製し、転移効率が判明しているトランスポーゼース発現マウスと交配することにより転移効率の高いマウスを選択する。

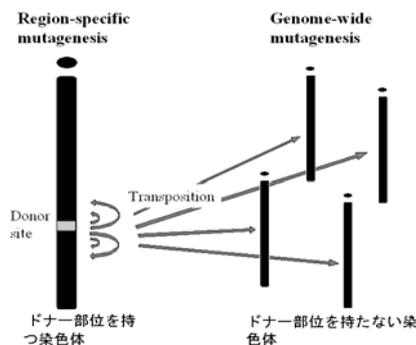
(3) B6 バックグラウンドのダブルトランスジェニックマウス (種マウス) と

B6 野生型マウスの交配による遺伝子破壊マウスの作製と転移効率の評価

【図 A】で見られるような交配をして、トランスポゾンの転移により GFP を発現するマウスが効率よく誕生するか検討する。GFP 発現したマウスから DNA を調整し挿入部位を決定する。RNA を調整し、破壊された遺伝子を同定し、次にデータベースを作製することにより、mixed バックグラウンドで得られた結果と比較評価する。

これまでの結果から ((Horie K., et al., *Mol. Cell. Biol.* 23; 9189-9207, 2003, Keng V.W. et al., *Nat Methods.* 2; 763-769, 2005)、トランスポゾンの転移はトランスポゾンがもともと挿入された場所 (ドナー部位) をもつ染色体によく起こる。 (【図 C】)

【図 C】



ただ、他の染色体にも転移が起こるので、トランスポゾンを有するトランスジェニックマウスにトランスポゼースが作用したときに、こういった分布で転移するか詳しく検討する。その結果から全遺伝子を破壊したマウスを作製するためには、どれくらいスケールアップする必要があるか検討し、次のビッグプロジェクトの基盤データとする。

4. 研究成果

(1) まず、B6 由来 ES 細胞を筑波大学生命科学動物資源センター 杉山文博博士より供与を受けた。それらの B6 由来 ES 細胞は生殖系列に入りやすいことが判明しているものである。その B6 由来 ES 細胞の ROSA26 遺伝子座に効率よくノックインできるターゲティングベクターを作製し、SBtransposase が ROSA26 遺伝子座に挿入された ES 細胞クローンを数種類得た。核型も正常だったので、マウス作製のリソースとしてストックした。

(2) 他のトランスポゾンシステムも構築するため、piggybag transposase も同時に ROSA26 遺伝子にノックインを行った。これらの細胞の核型も正常だったので、その細胞由来のマウスを作製するリソースとしてストックした。GFP マウスは共同研究で行っているオランダのグループのマウスがそれに相当する為、転移効率の良いものが選択できる体制が出来た。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

1. Okada I, Hamanoue H, Terada K, Tohma T, Megarbane A, Chouery E, Abou-Ghoch J, Jalkh N, Cogulu O, Ozkinay F, Horie K, Takeda J, Furuichi T, Ikegawa S, Nishiyama K, Miyatake S, Nishimura A, Mizuguchi T, Niikawa N, Hirahara F, Kaname T, Yoshiura K, Tsurusaki Y, Doi H, Miyake N, Furukawa T, Matsumoto N, Saito H. SMOC1 is essential for ocular and limb development in humans and mice. *Am J Hum Genet.* 2011 88:30-41. 査読有
2. Kakefuda K, Oyagi A, Ishisaka M, Tsuruma K, Shimazawa M, Yokota K, Shirai Y, Horie K, Saito N, Takeda J, Hara H. Diacylglycerol kinase β knockout mice exhibit lithium-sensitive behavioral abnormalities. *PLoS One.* 2010 5:e13447. 査読有
3. Horie K, Kokubu C, Takeda J. Functional genomics in the mouse using the

sleeping beauty transposon system. *Methods Enzymol.* 477:71-89, 2010 査読有

4. Shirai Y, Kouzuki T, Kakefuda K, Moriguchi S, Oyagi A, Horie K, Morita SY, Shimazawa M, Fukunaga K, Takeda J, Saito N, Hara H. Essential role of neuron-enriched diacylglycerol kinase (DGK), DGKbeta in neurite spine formation, contributing to cognitive function. *PLoS One.* Jul 15;5(7):2010 査読有
5. Yagita K, Horie K, Koinuma S, Nakamura W, Yamanaka I, Urasaki A, Shigeyoshi Y, Kawakami K, Shimada S, Takeda J, Uchiyama Y. Development of the circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb 23;107(8):3846-51. 2010 査読有
6. 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 the mouse genome. *Nature Genet.* 41:946-52. 2009 査読有
7. Kitada K, Keng VW, Takeda J, Horie K. Generating mutant rats using the Sleeping Beauty transposon system. *Methods.* 49(3):236-42 2009 査読有
8. Yusa K, Rad R, Takeda J, Bradley A. Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the piggyBac transposon. *Nat. Methods*, 6; 363-369, 2009 査読有
9. 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 Res.* Jun;18(6):859-68, 2008 査読有
10. Takeda J, Izsvák Z, Ivics Z. Insertional mutagenesis of the mouse germline with Sleeping Beauty transposition. *Methods Mol Biol. Chromosomal Mutagenesis*, Edited by Gregory D. Davis, Kevin J. Kayser ;435:109-25, 2008 査読有
11. Sasaki H, Suzuki N, Kent R Jr, Kawashima N, Takeda J, Stashenko P. T Cell Response Mediated by Myeloid Cell-Derived IL-12 Is

Responsible for Porphyromonas gingivalis-Induced Periodontitis in IL-10-Deficient Mice. *J Immunol.* 1;180:6193-8. 2008 査読有

12. Takeda J, VW. Keng, K Horie; Germline mutagenesis mediated by *Sleeping Beauty* transposon system in mice. *Genome Biol.*, 8(Suppl 1):S14(doi:10.1186/gb-2007-8-S1-S14), 2007 査読有

[学会発表] (計 2 件)

1. 吉田純子、國府 力、竹田 潤二、堀江 恭二、レトロウイルスおよびDNA型トランスポゾンベクターのゲノムワイドな挿入部位の比較解析、第 33 回日本分子生物学会年会、Dec. 8, 2010, Kobe, Japan
2. 吉田純子、國府 力、川上 浩一、竹田 潤二、堀江 恭二、To12 transposonを用いたマウスES細胞ゲノムへの変異導入、第 32 回日本分子生物学会年会、Dec. 11, 2009, Yokohama, Japan

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 異常行動を示す遺伝子改変非ヒト哺乳動物及びその作製方法

発明者: 竹田潤二、堀江恭二、八戸宏二郎、山田清文、田熊一徹

権利者: 財団法人大阪産業振興機構、国立大学法人大阪大学、国立大学法人金沢大学

種類: 特願

番号: 2007-197123

出願年月日: 2008.7.28

国内外の別: 国際特許

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/mr-envi/www/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 潤二 (TAKEDA JUNJI)

大阪大学・

先端科学イノベーションセンター・教授

研究者番号: 50163407

(2) 研究分担者

堀江 恭二 (HORIE KYOJI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号: 30333446

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: