

平成 23 年 5 月 2 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2007 ～ 2009

課題番号：19300146

研究課題名 (和文) 両アレル変異 ES 細胞バンクの作製

研究課題名 (英文)

Construction of a homozygous mutant embryonic stem cell bank

研究代表者

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

研究成果の概要 (和文)：遺伝子機能解析を行う上で、マウス ES 細胞における遺伝子破壊は有用な方法である。ES 細胞の分化誘導実験系は急速に進展しているため、今後、遺伝子破壊株を用いた細胞レベルの実験は、益々盛んになると考えられる。しかし、哺乳動物細胞では遺伝子が 2 コピー存在するため、遺伝子破壊の際には、その両方を破壊する必要があり、容易ではない。本研究課題では、2 コピーある遺伝子の両方を迅速に破壊する方法を開発し、細胞レベルでの遺伝子機能解析の加速化を目指す。

研究成果の概要 (英文)：Mutagenesis of mouse embryonic stem (ES) cells provides a powerful resource for functional analyses of genes. Emerging cell culture techniques for directed differentiation of ES cells will further accelerate this trend. The diploid nature of the mammalian genome often hampers this process because both alleles need to be mutated for each gene. In the present study, we develop a novel method to rapidly mutate diploid genome of mouse ES cells and generate homozygous mutants. This method will facilitate gene function study in tissue culture systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008 年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2009 年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：ES 細胞、マウス、トランスポゾン、レトロウイルス、遺伝子、Bloom、変異体、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

- (1) 変異体解析に関する国際的潮流
ヒトのモデルとしてのマウスの重要性は

益々高まっており、アメリカとヨーロッパで全ての遺伝子を破壊したマウス ES 細胞株を作製するプロジェクトが進行しているこ

とは広く知られている (*Science* 312: 1862, 2006; *Nature Genetics* 36: 921, 2004)。これにより数年後には、研究者自身がジーンターゲットングを行わずとも、目的の変異ES細胞がバンクから直ちに供給される時代が到来する。しかし、遺伝子機能解析を行うには、各々の変異ES細胞からマウス個体を作製し、それらを互いに交配させてホモ変異体を得ねばならない。この過程にはジーンターゲットング法の開発当初から大きな技術革新は無いいため、いかに変異ES細胞バンクが整っても、ひとりの研究者が解析できる遺伝子数に飛躍的な増大は望めない。実際、我々は過去に、トランスポゾンマウス生殖細胞で転移させることで、ES細胞を用いずに変異マウスを作製する方法を開発してきた (*Proc Natl Acad Sci USA* 98:9191, 2001; *Mol Cell Biol* 23:9189, 2003; *Nature Methods* 2:763, 2005)。これにより年間ひとりあたり100系統程度の変異マウスを得ることが可能になり、それ自体は大きな進歩であったが、その一方で、ホモ変異体マウスの作製に要す労力、時間、経費のために、表現型の解析に至るのは、ひとりあたり年間で10系統程度が限界であった。この経験から、遺伝子機能解析を網羅的に行うには、変異ES細胞取得後の「ホモ変異体作製の過程」にこそ革新的技術が必要であると痛感するに至った。

(2) 我々の過去の研究との関連

そこで我々は、Bloom遺伝子の発現をテトラサイクリンシステムを利用して一時的に低下させることにより、相同染色体間の組換え効率を高めて、交配過程を用いずヘテロ変異体からホモ変異体を得る手法を開発した (*Nature* 429:896, 2004: 図1: <http://www.casi.osaka-u.ac.jp/25/japanese/research/index.html>にて動画による説明あり)。この手法は、これまで動物細胞では困難だった「劣性表現型の網羅的解析」を可能にする技術として広く紹介さ

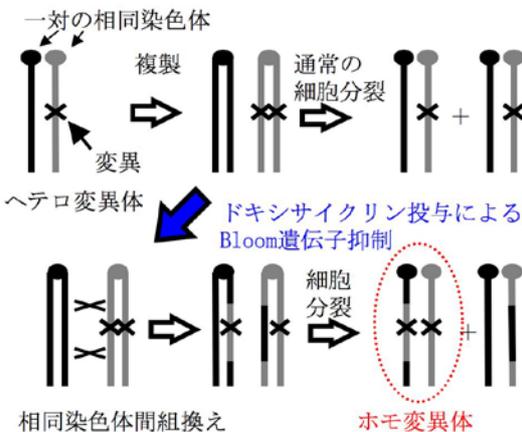


図1 両アレル変異体 (ホモ変異体) の誘導法

れている (*Nature Review Genetics* 5: 566, 2004)。しかし、Bloom遺伝子抑制時のホモ変異体の出現頻度は、数千個の細胞あたり1個と低いため、特定の表現型解析にしか適用できなかった。本研究では、出現したホモ変異体を効率的に単離する方法を開発し、ホモ変異体の凍結細胞バンクを構築する。

2. 研究の目的

ゲノムプロジェクトで得られた塩基配列情報を網羅的な遺伝子機能解析へ利用するために、遺伝子の両アレルを破壊したマウスES細胞バンクを構築する。これは、前項で記載のように、我々が以前に報告した「テトラサイクリンシステムによる Bloom 遺伝子の一過性発現低下に伴う両アレル変異体の誘導」の手法を、さらに発展させたものである。具体的には、遺伝子トラップベクターで遺伝子の片アレルを破壊 (ヘテロ変異体) したのちに、テトラサイクリンシステムを用いて Bloom 遺伝子の発現を一時的に抑制して両アレル変異体 (ホモ変異体) を誘導し、それを単離してバンク化する。これにより、変異体解析の律速段階である「ホモ変異体の単離」を high-throughput 化できる。近年は ES 細胞を様々な細胞系譜へ分化させる研究が盛んに行われている。よって、両アレルに変異を有す ES 細胞があれば、様々な細胞系譜へ分化させることにより、培養細胞レベルでの表現型解析を行える。培養細胞レベルで表現型を認めたのちは、ES 細胞からマウスを作製して個体レベルでの表現型解析も可能である。これにより、はじめから特定の遺伝子に絞って変異マウスを作製する場合と異なり、多くの遺伝子から興味深い遺伝子を表現型レベルで絞った上で個体実験を行うことができる。現在の技術では、ひとりの研究者が行える変異マウス解析は、ホモマウス作製に要す労力や経費のために、対象にできる遺伝子数に限界がある。このため、興味深い表現型を得られるかどうかは、はじめに遺伝子を選ぶ際の「運」に左右されやすい。今回の提案のように培養細胞レベルでの表現型解析の high-throughput 化が可能になれば、遺伝子機能解析の効率化へ大きく貢献すると考えられる。また、Web 上で他の研究者も閲覧できるフォーマットのデータベースを構築することにより、多くの研究者へのリソースとすることができる。

3. 研究の方法

既に樹立済みの Bloom 遺伝子改変 ES 細胞に、レトロウイルスやトランスポゾン backbone としての遺伝子トラップベクターを導入し、薬剤耐性細胞を単離・凍結保存し、ヘテロ変異体 ES 細胞バンクを作製する。ウ

イルスの挿入部位を、ligation-mediated PCR法を用いて決定することで、変異した遺伝子を同定し、データベース化する。興味深い遺伝子、もしくは、機能が未知の遺伝子を選定して、ヘテロ変異体をバンクから解凍後、ホモ変異体細胞を誘導する。新たに開発した薬剤選択システムを用いて、ホモ変異体 ES 細胞を単離・凍結し、細胞バンクを作製する。ホモ変異体の代表例について、実際に遺伝子発現が破壊されたか否かを検証する。さらに、ES 細胞の分化誘導系を導入することで、培養細胞レベルでホモ変異体の表現型解析を行い、本手法の有用性を実証する。データベースを通じて、広く一般の研究者に知らしめることで、有用なリソースを構築する。

4. 研究成果

(1) 遺伝子トラップ型ベクターの開発

従来の遺伝子トラップ実験においては、レトロウイルスベクターが主に用いられてきた。本研究では、To12、piggyBac 等のトランスポゾンを用いた遺伝子トラップベクターも作製した。本ベクターでは、splice acceptor と薬剤耐性遺伝子からなる、従来の遺伝子トラップ用ユニットに加えて、ホモ変異体を効率的に選択するために新たに開発した薬剤耐性マーカーも導入している。遺伝子トラップ時に、異なる reading frame のエクソンもトラップできるように、splice acceptor と薬剤耐性遺伝子の間に塩基を挿入したベクターも構築した。

(2) ヘテロ変異体 ES 細胞バンクの構築

上記トラップベクターを、Bloom 遺伝子改変 ES 細胞へ導入し、遺伝子をトラップした株を単離・凍結した。さらに、ベクター挿入部位を同定し、Web フォーマットでのデータベースを構築した。変異株の数は、計 2,000 株に達した。データベースの解析から、各ベクター間で、挿入部位の分布が異なることがわかり、異なるベクターを組み合わせる有用性を証明した。

(3) ホモ変異体 ES 細胞バンクの構築

上記のヘテロ変異体から、positive control として、過去の文献から、ホモ変異体の表現型を予想できる遺伝子を選定し、ドキシサイクリン投与による Bloom 遺伝子の発現抑制と、(1) で記載の新たな薬剤耐性マーカーを用いたホモ変異体の単離を行った。さらに、機能が報告されていない遺伝子について、同様にホモ変異体の単離を行った。ホモ変異が導入されているか否かは、各ベクターの挿入部位における PCR により確認した。

(4) 表現型解析によるシステムの検証

① 遺伝子破壊効果の検証

遺伝子破壊効果を検証するために、まず、表現型が知られている既知遺伝子について、ホモ変異体の Western blot 解析を行った。

その結果、解析した 3 つのホモ変異体 ES 細胞すべてについて、タンパクの発現を検出できず、遺伝子破壊が効率的に行われていることを証明できた。

さらに、表現型が知られている 1 つの既知遺伝子について、RNA の発現をマイクロアレイで解析した。その結果、本遺伝子の機能と対応した RNA の発現変化を認めた。

② ベクターの削除による表現型の消失

ホモ変異体 ES 細胞へ FLP recombinase を発現させ、あらかじめベクター内部へ配置した FRT 配列間で組換えを誘発して、ベクター配列の大部分を削除した。この結果、ホモ変異体の表現型が消失し、ベクター挿入部位が表現型の原因であることを証明できた。

上記の手法では、FRT 配列の外側に位置するベクター配列を除去できないため、残存したベクター配列が遺伝子発現を阻害する可能性も残る。そこで、To12 トランスポゾンベクターで作製したホモ変異体について、To12 トランスポゼースの発現によって、ベクター配列全体の削除を試みた。FLP/FRT 間の組換えに比べて効率は低いものの、少なくとも 1 つの遺伝子については、ベクター配列の削除に成功し、それに伴う表現型の消失も確認できた。今後、トランスポゼースによる削除を効率化するためのプロトコールの改善が必要と考えている。

③ 新規表現型の探索

過去に報告例のないホモ変異体について、分化誘導実験を行い、表現型を呈す細胞を同定した。さらに、②の手法によって、ベクターの削除に伴う表現型の消失も確認し、本システムによる新規遺伝子機能の探索が可能であることを証明した。

(4) 本研究の国内外における位置付けとインパクト

① 研究リソースとしての意義

本研究成果は、現在、英文学術雑誌へ投稿中である。また、研究室のホームページを通じて、本システムの紹介に務めている (<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/mr-envi/www/japanese/homo/index.html>)。さらに、本研究で得られたホモ変異体 ES 細胞株について、現在、International Gene Trap Consortium (IGTC) への寄託の準備を進めている。IGTC に登録された細胞株の情報は、医学・生物学の様々なデータベースからリンクされている。これにより、我々が作製した変異 ES 細胞株が、全世界の研究者の目に留まることになると考えられ、リソースとしての利用度が飛躍的に高まると期待される。

② ヒト ES 細胞/iPS 細胞への応用

本手法は、原理的にはヒト ES 細胞/iPS 細胞へも適用できる。よって、再生医療への応用を指向した遺伝子機能解析へも寄与できると期待される。ヒト ES 細胞/iPS 細胞では、

マウスの場合のように変異細胞から個体を作製して交配によりホモ変異体を得ることは不可能である。また、従来のジーンターゲティング法による遺伝子改変は、効率が低いことが問題となっており、効率の良い遺伝子改変法が望まれている。このような状況の中で、本法のようにホモ変異体を培養細胞レベルで作製する技術の有用性は高いと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計2件)

① 堀江恭二、國府力、吉田純子、竹田潤二：
両アレル変異導入法を用いた ES 細胞の未分化性制御機構の解析 2011. 3. 2 東京

② Kyoji Horie, Chikara Kokubu, Junko Yoshida, Junji Takeda: A homozygous mutant mouse embryonic stem cell bank readily applicable for phenotype-driven genetic screening. International Society for Stem Cell Research (ISSCR) 8th Annual Meeting, 2010. 6. 17., San Francisco, USA.

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し