

平成 21 年 6 月 26 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)

研究期間： 2007~2008

課題番号： 19590414

研究課題名 (和文)

コンディショナルノックアウトマウスによる RecQL5 ヘリケースの生体での機能解析

研究課題名 (英文)

The analysis of Recql5 function in conditional knockout mice

研究代表者

池田 美香 (IKEDA MIKA)

財団法人癌研究会・癌研究所細胞生物部・研究員

研究者番号： 70370153

研究成果の概要：本研究費によって、高等生物の生体組織における RecQL5 の機能を解析するため、RecQL5 コンディショナルノックアウトマウス(Q5-S)、ならびに新たなノックアウトアレル(Q5-D)のマウスを作製した。また、Q5-D ホモ接合体マウスは、大きな異常はなく出生して来ることがわかった。現在は引き続き長期観察し、Q5-D ホモ接合体マウスにおける発がんなどの経過を観察している。また、RecQL5 C 端側に設定したペプチドを用い、ウエスタンブロット、免疫染色等に使える抗マウス RecQL5 抗体を得ることができた。これらによって今後は他の RecQ ファミリー分子との機能的関連なども含め検討していく予定である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・実験病理学

キーワード：腫瘍

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物における RecQ ヘリケースは RecQ1、Blm、Wrn、RecQL4、RecQL5 の 5 種が同定されている。これらは RecQ ヘリケースドメインを共通に持つことからファミリーとされているが、その N 端、C 端領域はほとんど保存されていない。実際、Blm、Wrn、RecQL4 それぞれの遺伝子変異によって引き起こされる、ブルーム症候群、ウェルナー症候群、ロスモンド-トムソン症候群の各病態は著しく異なっている。このことから各分子は発現様式の相違だけではなく、ヘリケースドメイン以

外の部位に重要な分子特異的機能があることが予想される。RecQL5 は N 端領域をほとんど持たず、RecQ ヘリケースドメインに RecQL5 特異的な C 端領域が接続する比較的小さな分子である。また、今のところヒト遺伝性疾患との関連も報告されていない。

われわれの研究部では、RecQL5 を含むいくつかの RecQ ヘリケースメンバーの遺伝子改変マウスを作製し、解析を行ってきた。その結果、RecQL5 欠損(Q5-N)マウスのホモ接合体は早期胎生致死であり、その正確な死亡時期は胎胚期(プラストシスト)以前であることが

わかってきた。すなわち、RecQL5 は非常に初期の胚細胞の生存に必須の分子であることが示唆された。そこで、次に生体における RecQL5 の機能解析、とくに同じ RecQ ファミリー遺伝子の一つが B1m であることから、発がんへの関与を解析するため、コンディショナル欠失マウスの作製が必須となった。また、細胞内局在など細胞生物学的検討のため、よい抗体が必要であるが、これも市販されていないため、作製する必要があった。

2. 研究の目的

高等生物の生体組織における RecQL5 の機能を解析するため、RecQL5 コンディショナル欠失マウスを作製する。このマウスを適当な cre 発現マウス、あるいは誘導型 cre 発現マウスと掛け合わせ、組織、時期特異的 Q5 欠損マウスを作製する。

また特異性の高い抗 RecQL5 抗体を作製し、RecQL5 の細胞内局在を明らかにし、局在の仕方が細胞周期や DNA 障害によって変化するかどうかについても検討し、RecQL5 の作用場所と時期を特定し、機能解明の一助としたい。

3. 研究の方法

(1) Q5-S アレルベクターの構築

ベクター構築に必要なマウス Q5 ゲノム領域はファージスクリーニングにより準備した。ゲノムの機能配列を破壊しないよう考慮して、loxP 配列、マーカー遺伝子（ネオマイシン耐性遺伝子、neo^r）などを挿入した。

(2) Q5-S(neo⁺)/W ES 細胞の分離と Q5-S/W ES 細胞の作製

ターゲティングベクターをエレクトロポレーション法により、ES 細胞に導入、ネオマイシン耐性クローンを分離する。これらクローンのゲノム DNA をサザンブロット法で解析し、Q5-S(neo⁺)/W ES 細胞を得た。

この ES 細胞に cre-pac プラスミドを導入し、cre 組み替え酵素を一時的に発現させ、ピューロマイシンで 48 時間選別し、耐性クローンを得た。このなかからネオマイシン耐性遺伝子が抜けた Q5-S/W ES 細胞を PCR ならびにサザンブロット法による遺伝子型解析によって選別した。

(3) Q5-S/W マウスと Q5-D/W マウスの作製

(2) で得られた Q5-S/W ES 細胞を blastocyst に注入し、キメラマウスを作製した。これを B1/6 と交配し、ES 細胞由来の子孫で Q5-S アレルが継承されているものを得た。さらに Q5-S/W マウスを CAG-cre マウスと交配し、子孫から Q5-D/W を得た。

(4) 抗 Q5-C 端抗体の作製

RecQ ヘリケースファミリー間で保存されて

いる N 端を避けて、C 端二種の合成ペプチドを選定した。それぞれ 2 羽ずつのウサギに 2 週間毎 10 回投与し、血清を得た。この血清をウエスタンブロット法、免疫染色法に用い、特異性、感受性などを評価した。

4. 研究成果

(1) ES 細胞遺伝子改変のためのベクター構築

Q5 分子には特異的 N 端領域は殆どなく、エクソン 2 からヘリケースドメインをコードしている。そこでコンディショナル KO アレルは 122(3N+2)塩基長のエクソン 2 を欠失できるものにした。またイントロン 1、2 内で転写因子結合配列など特別な塩基配列をもたない領域を検索し、loxP または loxP-neo 耐性遺伝子-loxP を挿入した。最終的に、組み替え領域-イントロン 1 (loxP 挿入あり)-エクソン 2-イントロン 2 (loxP-neo 耐性-loxP 挿入あり)-組み替え領域、をもつターゲティングベクターを構築した。

(2) 相同組換え ES 細胞クローンの分離

ベクターを ES 細胞に導入、ネオマイシンによる選別とサザンブロット法による遺伝子型の確認により 6 個のクローンを得た。これら ES 細胞クローンにおける Q5 発現を RT-PCR で調べたところ、neo 耐性遺伝子挿入による発現低下などの作用はみられなかった。発現低下変異アレルではないので、このアレルのマウスは必要ないと判断した。そこで、次にこれらのクローンに cre リコンビネースを一時的に発現させ、neo 耐性遺伝子のみを欠失したサイレント(S)アレルの ES 細胞クローンを選別した (図 1)。

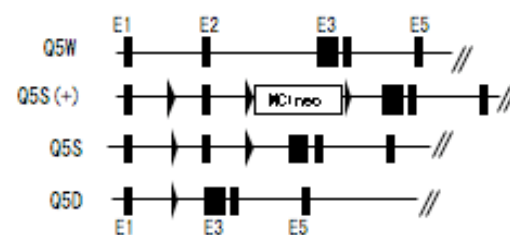


図 1 Q5 変異アレル

その結果、Q5-S/W ES 細胞を 2 クローン得た。この 2 クローンを胚操作グループの助けを借り、blastocyst へのインジェクションを行い、キメラマウスを作製した。ES 細胞寄与率の高いキメラマウスを B6 マウスと交配し、S アレルをもつマウスラインを得た。その後、CAG-cre マウスとの交配をおこない、エクソン 2 がなくなった D アレルをもつマウスを作製した。さらに D/W マウスどうしの交配をおこない、Q-5D ホモ接合体がえられるか

どうかを調べた。Q5-N ホモ接合体はブラストシス (E3.5) までに死亡するため、今回の D アレルもホモ接合体では胎生致死であることを予測していた。しかし、Q5-D ホモ接合体は予想に反し、ほぼメンデル側にそって生まれてくることがわかった (表 1)。

表 1 Q5-D/W マウス間の交配結果

	W	E	0	Total
L112 (ES#107)	7	22	7	36
L16 (ES#20)	2	8	3	13

この結果は、Luo G. らのエクソン 4 を欠失させた M3 アレルとよく一致している (文献 1)。また、M3 ホモ変異マウスは生後 1 年半以上たつと、がんの発症率が高くなると報告されている (文献 2)。現在、Q5-D ホモ接合体は 7 ヶ月齢であるが、腫瘍発生などの異常は見つかっていない。今後も継続して観察を続けていく予定である。

(3) 変異アレルからの転写産物の検出

Luo G. らの M3 アレルの転写産物は、欠失したエクソン 4 が (3N+1)bp であるため、エクソン 3 からエクソン 5 へのスプライシングのあと、フレームがずれる。そのためスプライシング後はアラニンが 2 つ続きストップコドンとなる。しかしナンセンスデケイは起こらず、エクソン 4 が抜けた産物として検出された (文献 1)。われわれの D アレルにおいても、エクソン 2 は (3N+2)bp であるため、エクソン 1 からエクソン 3 へのスプライシングのあとフレームがずれ、14 アミノ酸のあとストップコドンとなる。しかし、RT-PCR によって調べたところ、やはりナンセンスデケイは起こっておらず、エクソン 2 が抜けた転写産物が検出された。

(4) 今後の課題

今後、さらに 2. で得られた抗 Q5 抗体を用い、変異アレルから産生するタンパクの同定をおこなう予定である。変異アレルからの転写産物が存在することから、エクソン 3 以降のどこかに IRES 様の配列があるなどして、ヘリケースドメインの後半から C 端側の短縮された Q5 タンパクが産生されている可能性が考えられる。この場合、この変異タンパクが十分に Q5 の機能を果たしうることを示唆しており、Q5 の機能ドメインを同定する上で重要な知見となる。また、変異アレルからの最終産物が検出されない場合、Q5 の欠損は高等生物には必須のタンパクではないと結論される。この場合、以前より解析を進めていた Q5-N アレルは Q5 以外の他の遺伝子発現に影響し、胎生致死となっている可能性が高くなる。Q5 との機能的関連もふくめ、その遺伝子を同定していく必要があると考える。

2. 抗 Q5 抗体の作製

マウス Q5 の C 端 2 カ所にそれぞれ 17aa、20aa の合成ペプチドを設定し、これを 2 羽ずつのウサギに免疫し、4 種類の抗血清を得た。この抗体のチェックのため、Q5 発現ベクターを作製した。C 端部分のみのもを大腸菌で発現させたものと、全長の N 端、または C 端にタグをつけ動物細胞で発現するものをそれぞれ作製した。

4 種類の抗 Q5 C 端ペプチド抗血清は免疫に用いたペプチドによるアフィニティ精製をおこなった。タグ付き発現ベクターを培養細胞に導入し、タグに対する抗体と得られた抗血清とを、まずウエスタンブロットで比較したところ、同一のバンドが 4 種類全ての抗血清により検出された。また、そのうちの 2 種類については、シングルバンドであり認識の特異性が高いと考えられた。また、免疫染色についてもタグに対する抗体と比較した。その結果、抗血清による染色とタグに対する抗体による染色が完全に一致した。このことも、得られた抗血清が Q5 を特異的に認識していることを示唆している。

文献

1. Hu Y, Lu X, Barnes E, Yan M, Lou H, Luo G., Recq15 and Blm RecQ DNA helicases have nonredundant roles in suppressing crossovers., *Mol Cell Biol.* 2005 May;25(9):3431-42.
2. Hu Y, Raynard S, Sehorn MG, Lu X, Bussen W, Zheng L, Stark JM, Barnes EL, Chi P, Janscak P, Jasin M, Vogel H, Sung P, Luo G., RECQL5/Recq15 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments., *Genes Dev.* 2007 Dec 1;21(23):3073-84.

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池田美香（IKEDA MIKA）

財団法人癌研究会・癌研究所細胞生物部・
研究員

研究者番号：70370153

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者