

平成 21 年 6 月 5 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19700375

研究課題名（和文） レンチウイルスベクターを用いたジーントラップ法の開発

研究課題名（英文） Development of the lentiviral vector mediated gene trapping

研究代表者 氏 名（アルファベット） 山口 智之（Tomoyuki Yamaguchi）

所属機関・所属部局名・職名 東京大学・医科学研究所・客員研究員

研究者番号 80392158

研究成果の概要：ジーントラップ法は遺伝子の機能解析法の一つであり、染色体にランダムに DNA を挿入し遺伝子を破壊する方法である。本研究ではその DNA 挿入効率と挿入部位の指向性をレトロウイルスベクターとレンチウイルスベクターの間で比較検討した。その結果、DNA が挿入される効率はレトロウイルスベクターのほうが5倍高かったが、擬陽性が多く、破壊された遺伝子も重複が多かった。この結果は大規模解析を行う際にはレンチウイルスベクターの方が適しているということを示している。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,700,000	0	1,700,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,200,000	480,000	3,780,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：Gene、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、Integration site、トラップ効率

1. 研究開始当初の背景

21 世紀に入りヒトゲノムの解析が終わったことで本格的にポストゲノム時代を迎えた。約 2 万 2 千個の遺伝子の存在が明らかとなったが、そのほとんどは機能が分かっていない。現在広く行われている遺伝子の機能解析の方法はノックアウトマウスの作製であるが、この方法は時間と労力と費用のかかることが大きな欠点である。そのため今後は迅速な遺伝子機能解明のための技術開発が必要と

なる。

2. 研究の目的

迅速な遺伝子解析を行うには GeneTrap 法が最も適している。現在 Gene Trap Vector の細胞への導入はレトロウイルスベクターが広く用いられているが、最近の報告でレトロウイルスベクターよりもレンチウイルスベクターのほうが遺伝子内に挿入されやすいという結果が得られている。そこで本研究ではレトロウイルスベクターとレンチウイ

ルスベクターをベースとした Gene Trap Vector の遺伝子トラップの効率と挿入部位の指向性の違いをマウス Embryonic Stem Cell (ES) 細胞において検討した。

3. 研究の方法

(1) ジーントラップベクターの構築

レンチウイルスベクターおよびレトロウイルスベクターそれぞれにジーントラップに必要なトラップカセットを導入した。トラップカセットは、マウス EN2 遺伝子のスプライシングドナー、緑色蛍光タンパク質である Venus とプラスサイジン耐性遺伝子の融合遺伝子、internal ribosomal entry site (IRES) としてマウス Bcl2 遺伝子のスプライシングアクセプターを順に連結した。レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターは共に自己複製不可能なベクターを用い、その内部にトラップカセットを 3' から 5' の向きに導入し、ジーントラップベクターを構築した。このベクターは染色体上のプロモーターの下流に挿入された時のみ緑色蛍光を発しプラスサイジン耐性になる。(図1)

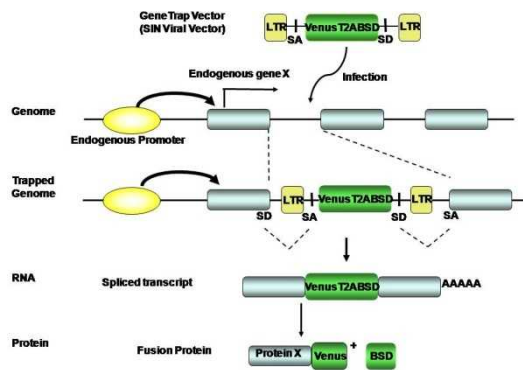


図1、トラップベクターの構造とトラップの機構

1月 2月 3月 4月

(2) ベクター挿入部位の解析

トラップベクターを標的細胞に感染させプラスサイジン耐性コロニーよりゲノム DNA を単離する。このゲノム DNA を利用し、インバース PCR 法にて挿入部位を特定した。また、5' RACE 法によって挿入部位からの RNA 発現も確認した。塩基配列の解析は NCBI Blast search および FANTOM consortium データベースを利用し行った。

4. 研究成果

(1) HeLa 細胞におけるレトロウイルストラップベクターとレンチウイルストラップベクターの染色体挿入部位の解析

HeLa 細胞にそれぞれのトラップベクターを 0.5 copy/cell で感染させトラップ効率 (Venus 陽性率) を測定したところ、レトロウイルスベクターが 28.8%、レンチウイルスベクターが 15.6% となりレトロウイルスベク

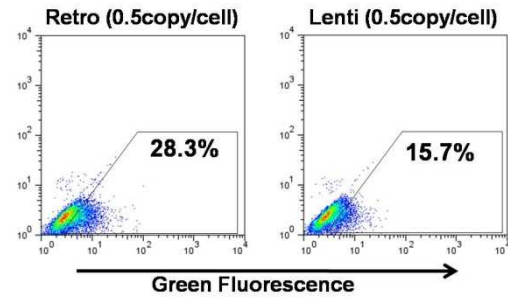


図2、HeLa細胞におけるトラップ効率の比較

ターの方が高効率であった。(図2)

次に HeLa 細胞にそれぞれのベクターを 0.05 copy/cell で感染させ、プラスサイジン耐性コロニー45個ずつからゲノム DNA を抽出し、ウイルスのインテグレーションサイトを解析した。その結果、5' UTR とコーディングシークエンスの最初の 20% の位置にインテグレーションしていた割合はレトロウイルスベクターでは 55%、レンチウイルスベクターでは 28.1% であった。一方で、非翻訳領域にインテグレーションする割合はレトロウイルスベクターが 55.6% で、レンチウイルスベクターが 28.9% であった。したがってレンチウイルスベクターの方が遺伝子内部にトラップされやすい傾向にあることが示唆された。(図3)

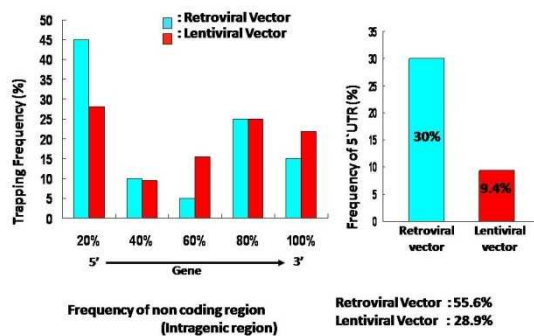


図3、HeLa細胞におけるインテグレーションサイトの解析

(2) マウス ES 細胞におけるレトロウイルストラップベクターとレンチウイルストラップベクターの染色体挿入部位の解析

マウス ES 細胞にレトロウイルスベクターを 0.66 copy/cell、レンチウイルスベクターを 0.5 copy/cell で感染させ HeLa 細胞と同様にトラップ効率を測定した。その結果、レトロウイルスベクターが 18.7%、レンチウイルスベクターが 3.7% とレトロウイルスベクターの方が約 5 倍高効率であった。これは HeLa 細胞感染時と同様の結果であり、これまでの

報告 (293T 細胞感染時) と一致する。(図 4)

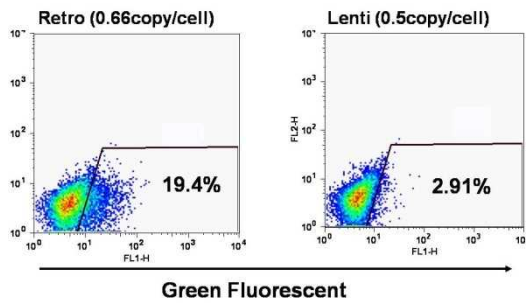


図4、マウスES細胞におけるトラップ効率の比較

次にマウス ES 細胞にそれぞれのベクターを 0.05 copy/cell で感染させ、レトロウイルスベクターは 176 個、レンチウイルスベクターは 182 個のプラスミジン耐性コロニーゲノム DNA を抽出し、ウイルスのインテグレーションサイトを解析した。その結果、5' UTR とコーディングシーケンスの最初の 10% の位置にインテグレーションしていた割合はレトロウイルスベクターでは 78.3%、レンチウイルスベクターでは 22.8% であった。一方で、非翻訳領域にインテグレーションする割合はレトロウイルスベクターが 31.8% で、レンチウイルスベクターが 6% であった。したがって HeLa 細胞と同様にレンチウイルスベクターの方が遺伝子内部にトラップされやすい傾向にあることが示唆された。さらに、挿入された遺伝子の重複を調べた結果、レトロウイルスでは 176 クロンの内 100 クロン (57%)、レンチウイルスでは 182 クロンの内 146 クロン (80%) が異なる遺伝子内に挿入されていた。以上の結果から、レトロウイルストラップベクターはこれまでのレトロウイルスでの報告と同様に遺伝子の 5' 端に非常に効率よく挿入されることが分かった。この特徴はジントラップを行う上で非常に重要であるが、一方でレトロウイルスはレンチウイルスと比較して非翻訳領域に挿入される確率が高く、重複した遺伝子内に挿入されやすい傾向が明らかになった。(図 5 - 1、5 - 2)

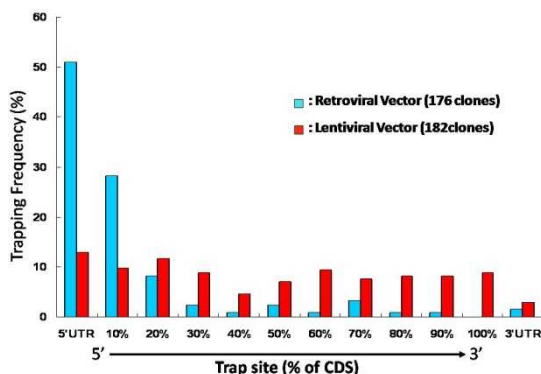


図5-1、マウスES細胞におけるインテグレーションサイトの解析

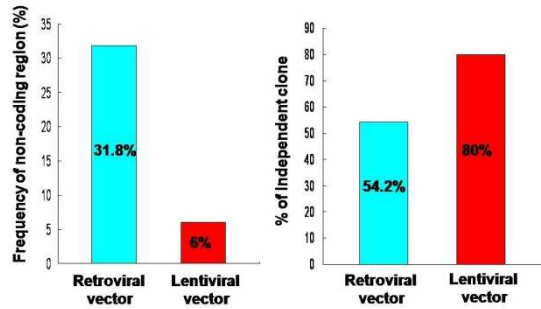


図5-2、マウスES細胞におけるインテグレーションサイトの解析

(3) 非翻訳領域に挿入されたクローンの mRNA の解析

トラップされたクローンのウイルス挿入部位を NCBI Blast サーチで詳しく解析した結果、レトロウイルスベクターでは 56 クロン、レンチウイルスベクターでは 11 クロンが非翻訳領域に挿入されていた。近年 FANTOM consortium がより詳細にマウスの転写産物の解析をした結果を報告している。このデータベースを利用し非翻訳領域に挿入されていたクロンを解析すると、レトロウイルスベクターでは 12 クロン (21.4%)、レンチウイルスベクターでは 1 クロン (9.1%) が FANTOM データベースに登録されたクロンであった。また、レトロウイルスベクターでは 9 クロン (16.1%)、レンチウイルスベクターでは 3 クロン (27.3%) がどちらのデータベースにも登録されておらず新規の遺伝子である可能性が示唆された。さらに、レトロウイルスベクターでは 35 クロン (62.5%)、レンチウイルスベクターでは 3 クロン (27.3%) は転写が LTR 内部から始まっており、遺伝子をトラップしていなかった。以上の結果からすべてのクローンの内、レトロウイルスベクターでは 80.1%、レンチウイルスベクターでは 98.4% が遺伝子内に挿入され遺伝子をトラップしていることが明らかになった。また、レトロウイルスベクターではレンチウイルスベクターと比較して偽陽性が出やすい傾向があることが示唆された。(表 1)

表 1、5'RACE法を利用したmRNAの解析

	Transcription start inside the vector	FANTOM Clone	Novel Transcript
Retroviral vector	35/56 (62.5%)	12/56 (21.4%)	9/56 (16.1%)
Lentiviral vector	3/11 (27.3%)	1/11 (9.1%)	7/11 (63.6%)

(4) ウイルスベクター挿入部位の染色体上でのマッピング

レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクターそれぞれの挿入部位を染色体上にプロットしたところ5番染色体と6番染色体では両ウイルスが挿入された割合に大きな違いが観られた。理論上トラップベクターは遺伝子のイントロン内にランダムに挿入されるためそれぞれの染色体の挿入部位の数はイントロンの長さには比例するはずである。5、6番染色体上のイントロンの長さは全染色体上のイントロンの長さのそれぞれ5.6%、6.3%である。レンチウイルスベクターの5、6番染色体への挿入の割合はそれぞれ2.8%、6.1%であり理論上の値と有意差は無い。しかし、レトロウイルスベクターの5、6番染色体への挿入の割合はそれぞれ13.6%、18.6%と明らかに理論値との相違が観られた。この結果はレトロウイルスベクターの挿入部位にはホットスポットがあり、一定の部位に挿入されやすい傾向があることを示唆している。(図6)

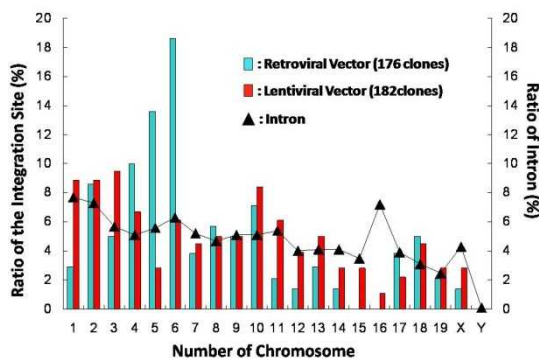


図6、染色体上でのウイルス挿入部位の割合

(5) 結論

本研究ではレトロウイルスベクターとレンチウイルスベクターを用いたジーントラップの効率を比較した。その結果、レトロウイルスベクターは遺伝子の5'端に挿入されやすいという特徴をもち遺伝子をトラップするには非常に有効であることが分かった。一方で、非翻訳領域に挿入される確率、重複した遺伝子に挿入される確率、ウイルスベクター内部から転写される確率(偽陽性が出る確率)のいずれもレンチウイルスベクターと比較して高いことが明らかになった。これはジーントラップのような大規模スクリーニングを行う際には障害になる可能性があり、レンチウイルスベクターを用いる方が効率よくスクリーニングを行うことができることを示唆している。(図7)

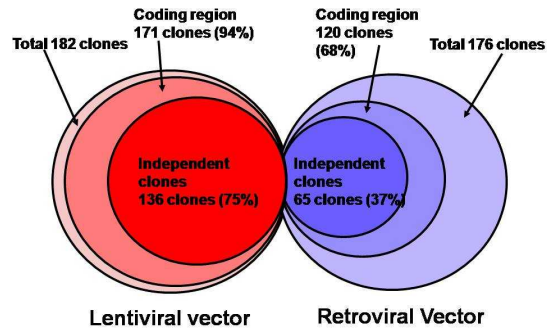


図7、レンチウイルスベクターとレトロウイルスベクターのトラップ効率の比較

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)

[学会発表](計2件)

発表者名 山口智之
 発表標題 レンチウイルスベクターを用いたジーントラップ法の開発
 学会等名 モロシヌス研究会
 発表年月日 2007年6月30日
 発表場所 淡路島洲本温泉ホテルニュー淡路

発表者名 山口智之
 発表標題 レンチウイルスベクターを用いたジーントラップ法の開発
 学会等名 第31回日本分子生物学会
 発表年月日 2008年12月10日
 発表場所 神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 智之 (YAMAGUCHI TOMOYUKI)

東京大学・医科学研究所・客員研究員

研究者番号: 80392158

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし