

機関番号： 34419
 研究種目： 新学術領域研究(課題提案型)
 研究期間： 2008～2010
 課題番号： 20200032
 研究課題名(和文) 非B型DNA配列を利用した遺伝子発現制御による高効率・安定的
 遺伝子改変動物の開発
 研究課題名(英文) Development of genetically engineered animals by use of non-B DNA
 structure for highly and stably expression of transgene
 研究代表者
 三谷 匡 (MITANI TASUKU)
 近畿大学・先端技術総合研究所・准教授
 研究者番号： 10322265

研究成果の概要(和文)：

高効率・安定的な遺伝子改変マウスの開発をめざし、非B型DNA人工配列によるRNAポリメラーゼII型ならびにIII型依存性の転写活性の賦活化作用について検討した。その結果、非B型DNA人工配列モデルとしたT20配列について、(1)ES細胞におけるPol II型転写活性の賦活化作用、(2)ES細胞の分化過程における作用の安定性とクロマチン構造の動態、(3)T20配列導入マウスの作製に関する新たな知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：

This study examined the function of non-B DNA sequence on the activation of transcription by RNAPII and/or RNAPIII to develop transgenic animals with highly efficient and stable expression of transgene. The results may be summarized as follows: T20 (180bp artificial curved DNA) as a model of non-B DNA sequence showed (1) the activation of the transcription by RNAPII in mouse ES cells, (2) the stability of transcription and chromatin dynamics during *in vitro* differentiation of ES cells, and (3) the possibility of the production of T20-driven transgenic mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2009年度	8,500,000	2,550,000	11,050,000
2010年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
年度			
年度			
総計	25,800,000	7,740,000	33,540,000

研究分野： 農学、複合領域

科研費の分科・細目： 畜産学・獣医学・発生工学、ゲノム科学・ゲノム工学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

生命科学研究における有用遺伝子改変動物の重要性と社会貢献については論を待たない。遺伝子工学と発生工学の融合によって創出される遺伝子改変マウスは、任意の遺伝子の過剰発現や遺伝子破壊による機能解析やヒト型疾患モデルを作製する上で強力な

ツールとなっている。さらに近年、RNA干渉(RNAi)による遺伝子ノックダウンが遺伝子機能の解析や治療法の開発・病気の発症メカニズムの解明の有効な手段として注目されている。しかしながら、現在でもなお、真核細胞での遺伝子発現を安定して制御することは難しく、医療・産業レベルでの技術的課

題として残されている。

遺伝子改変動物を作製し活用する上で、遺伝子発現制御技術はその核心ともいえる要素技術である。従来、遺伝子改変動物における遺伝子発現制御技術は、細胞内での実働部隊である役者（諸因子）と舞台装置（ゲノム上の相互作用領域）の単純化されたモデルの組み合わせに依存した遺伝子工学的手法により多くの制御システムが開発されてきた。しかしながら、真核生物ではゲノムがクロマチン構造をとっているために、遺伝子操作を行っても期待通りの結果が得られないことが多く、ライフサイエンス分野における技術的課題のひとつとなっている。遺伝子発現に関する研究は、高次に階層化された発現制御システムの統合的制御機構の解明へと進んでおり、特に近年は、転写の活性化または抑制におけるクロマチンリモデリング因子の分子構築とその作用機構、ヌクレオソームコアヒストンにおける修飾機構と遺伝子発現メカニズムなどが明らかにされつつある。しかし、転写アクチベーターの結合を許容するクロマチン構造の実体はほとんど明らかにされていない。本研究組織は、転写制御領域に形成されるクロマチン構造の解析を通して、転写開始に必須なクロマチン構造とその構築機構についてユニークな研究を展開し、核内においてヌクレオソームの配置を決定する因子として、ベント DNA が重要な役割をもつことを実証してきた。さらに、プロモーター部位をデザインすることにより転写効率が格段に上昇することを見出すなど、当該分野において独創的でありまた先駆的な成果をあげている (BioEssays 23, 2001; FEBS J. 273, 2006 ; DNA Conformation and Transcription (Ed), 2005, Nuclear Dynamics-Molecular Biology and Visualization of the Nucleus (著者), 2007)。クロマチン工学は、遺伝子工学の舞台装置そのものを提供しながら、なおかつその制御の役割も果たす技術であり、任意の転写ユニットにおいて転写活性に有利なクロマチン構造 (本研究では、「クロマチンモジュレーター」と称す) を人為的に構築するという、まったく新しいゲノム機能の制御技術として、概念的にも機構的にも、遺伝子工学と染色体工学の間に位置づけられるものである。そして、今もなお偶発的期待観に基づく個体レベルでの不安定な遺伝子発現制御システムに、クロマチン動態の人為的操作を図るクロマチン工学技術を導入する試みは、世界的にも例をみないものである。本研究組織は、ES 細胞研究ユニット、クロマチン動態・遺伝子発現制御研究ユニットおよび遺伝子改変動物作製基盤ユニットで構成され、そして本研究は、目的遺伝子の発現を遺伝子工学レベル (RNAi 技術) とクロマチン工学レベル (クロマチンモジュレーター

技術) の階層的制御機構により生体工学レベル (発生工学技術) で実現するというダイナミックな構成に基づく統合的な試みであり、幹細胞研究・クロマチン工学・発生工学を融合した研究として位置づけられる。

2. 研究の目的

遺伝子工学技術は、高発現プロモーター、特異的プロモーター、誘導型プロモーターやエンハンサーなど様々な発現誘導システムを開発してきたが、それらの特性を担保する安定的発現技術については未完である。特に、研究代表者らは、RNAi によるノックダウンマウスでの解析により、同一 ES 細胞に由来する個体群での個体差や個体内での組織差、さらには世代による安定性の欠如が、ノックダウン技術を汎用化させる上で重大な障害となることを見いだしてきた。真核細胞では、ゲノム DNA はヌクレオソームを形成し、クロマチンとして細胞核内に機能的に折りたたまれているため、真核生物に外来遺伝子を導入しても発現しない場合、細胞核内のクロマチン構造による影響が深く関与していることが明らかになってきている。そこでこの根本的課題を克服するための切り札として、クロマチン構造を制御する技術 (クロマチン工学) に着目した。

そこで本研究組織では、非 B 型 DNA 人工配列 (クロマチンモジュレーター) が RNA ポリメラーゼ II 型の転写活性のみならず、RNA ポリメラーゼ III 型の転写活性による shRNA の発現を高率かつ安定的に誘導する機能があれば、こうした課題の解決の糸口になりうると考え、クロマチンモジュレーターによる遺伝子発現の高率化・安定化ならびに RNAi の強化機能を開発することを提案する。これまで非 B 型 DNA 人工配列である人工ベント DNA 配列 (T20 配列) による RNA ポリメラーゼ II 型転写活性に対する強化機能について、T20 配列を β アクチンプロモーター上流に配置した GFP レポーターカセットを導入したマウス ES 細胞の体外分化誘導モデルを用いた解析を行い、転写活性の上昇を見いだしている。そこで本研究ではさらに、T20 配列による RNA ポリメラーゼ III 型転写活性に対する強化機能について、研究代表者らが実証してきたマウス ES 細胞での shRNA 発現ベクターによる標的遺伝子ノックダウンシステムを用いて解析を行う。具体的には、ES 細胞あるいはマウス個体内での当該構造の安定性、遺伝子発現における効果、個体の生存および繁殖性に及ぼす影響、次世代での安定性などについて検討し、クロマチンモジュレーターを利用したクロマチン工学の新技術の開発を目指す。

本研究成果から創出される新技術は「クロマチン改変技術」であり、成果物は「高効率・安定的外来遺伝子発現マウス」である。本研

究により、非B型DNA人工配列が真核生物の遺伝子発現制御システムにおいて、RNAポリメラーゼIIならびにIII依存型の転写を高効率・安定的に活性化できることが実証されれば、遺伝子発現制御の普遍的機構を確立する大きな基礎となる。そして本新技術をさらに発展させることにより、真核生物での品種改良や有用物質の生産、あるいは基礎医学や先端治療分野において大きなブレークスルーを与えると予測され、植物も含めた広範な生物種を対象に多様な生物機能の高度利用を促進する強力なツールになると期待される。

3. 研究の方法

遺伝子改変マウスにおいて技術的課題となっている導入遺伝子の高効率発現と安定性を実現するクロマチンモジュレーターの有効性について検証する。特に、shRNA発現ベクター導入ES細胞よりノックダウンマウスを作製する際、標的タンパク質の抑制効率にはES細胞レベルで大きなばらつきがあり、また個体レベルでも組織差や世代差が問題となっている。そこで本研究では、これまでの遺伝子ノックダウンマウスの成果を活用して、クロマチンモジュレーターによるRNAiの強化機能についても検討する。まず、一般的なGFPレポーター発現系を用いてRNAポリメラーゼII型転写活性モデルについてクロマチンモジュレーター機能の細胞、組織、個体レベルでの解析を行い、それと平行してクロマチンモジュレーターによるRNAポリメラーゼIII型転写活性について、RNAi効果の高効率・安定化機能を検証する。

(1) 人工ベントDNA配列(T20配列)によるPoI II型転写活性の賦活化機能の検討

① クロマチンモジュレーター付加GFP導入ES細胞株の樹立

クロマチンモジュレーターユニット(T20配列)(FEBS J. 273, 2006)を β -アクチンプロモーター/GFPの上流に配置したベクター(T20/GFP)をマウスES細胞に導入し安定導入株を樹立する。クロマチンモジュレーターの転写活性強化機能を解析するため、Cre-*loxP*システムによりクロマチンモジュレーターを除去したコントロールクローン(Δ T20/GFP)を作製する。

② クロマチンモジュレーター導入ES細胞株の体外分化誘導系による転写活性強化機能の評価

T20/GFP導入ES細胞株と Δ T20/GFP導入ES細胞株を用いて、体外で分化誘導を行い、分化過程という細胞のダイナミックな動的環境下におけるクロマチンモジュレーターの機能について検証する。体外分化誘導には単層培養法による肝様細胞の誘導システムを適用し、定量的PCR解析、フローサイトメトリ解析、組織学的解析、3D-FISH解析、ク

ロマチン構造解析等を用いてT20配列によるGFP転写誘導活性について検討する。

③ クロマチンモジュレーター付加GFP導入マウスの作製と個体レベルでの解析

T20/GFP導入株と Δ T20/GFP株を用いてキメラマウスを作製し、野生型マウスとの交配によりT20/GFP導入マウスと Δ T20/GFP導入マウスを作製する。

(2) 人工ベントDNA配列(T20配列)によるPoI III型転写活性の賦活化機能の検討

④ クロマチンモジュレーター付加shRNA導入ES細胞株の樹立

クロマチンモジュレーターユニット(T20配列)をU6プロモーター/SOD1遺伝子shRNAの上流に配置したベクター(T20/SOD1-shRNA)をマウスES細胞に導入し安定導入株を樹立する。(1)と同様にして、Cre-*loxP*システムによりT20配列を除去したコントロールクローン(Δ T20/SOD1-shRNA)を作製する。今回RNAiのターゲットとしたSOD1遺伝子に関しては、これまでのSOD1ノックダウンマウスの成果(J. Biol. Chem. 280, 2005, 他)に基づきクロマチンモジュレーター機能評価を実施する。本研究では、SOD1-shRNA発現ES細胞株の標的遺伝子発現抑制効果については、研究代表者らが開発したルシフェラーゼアッセイシステム(特願2007-118962号)とウエスタンブロットによりスクリーニングを行う。

4. 研究成果

(1) 人工ベントDNA配列(T20配列)によるPoI II型転写活性の賦活化機能の検討

哺乳動物培養細胞(HeLa細胞)において、RNAポリメラーゼII型転写活性促進機能を発揮することを明らかにしている人工ベントDNA配列(T20配列)を β -actinプロモーター/GFP発現ユニットの上流に配置した発現ベクターを作製し、ES細胞に導入した。シングルコピー導入ES細胞を選別し(T20/GFP株)、さらにCreリコンビナーゼによりT20配列を除去したES細胞(Δ T20/GFP株)を作製した。

得られた10株は、レポーターが何らかの遺伝子の上流に挿入されものが3組(グループAとする)、遺伝子間領域に挿入されものが5組、遺伝子内部に挿入されものが2組であった。なお、グループAにおける近傍遺伝子は、*Tgfbr3*遺伝子、*Alox5a*遺伝子、および*Cdk3*遺伝子であった。GFPの発現解析を行った結果、4組の株でT20/GFP株の方が Δ T20/GFP株よりもGFPを高発現していたが、その他の組では両者に差がみられないか、逆に Δ T20/GFP株の方が高かった。なお、上記の4組の細胞株のうち3組がグループAに属し、レポーター下流近傍に存在する各遺伝子は初期胚での発現が報告されているものであった。一方、これらグループAの3株を肝細胞に分化させた場合、*Alox5ap*を

近傍に持つ1組ではT20/GFP株とΔT20/GFP株とで発現量の逆転がみられた。なお、*Alox5ap*を含めグループAの各遺伝子は肝細胞でも発現していた。以上から、T20が活性遺伝子領域に導入された場合、未分化状態のES細胞ではその効果を発揮できるが、分化後には変動しうることが示された。

そこで、レポーター遺伝子を *Tgfbr3* の近傍に持つ細胞株1組 (*Tgfbr3*/T20) と遺伝子間領域に持つ細胞株1組 (IG/T20) を用いて、クロマチン構造解析を行った。ChIPアッセイとDNaseIフットプリントアッセイを用いてクロマチン構造解析を行った結果、*Tgfbr3*/T20株の場合には、細胞分化前後で *Tgfbr3*/ΔT20株とほぼ同じクロマチン構造をとるが、IG/T20株の場合、分化状態にかかわらず、IG/ΔT20株とはヌクレオソームの存在量やクロマチン構造が大きく異なっていることが明らかとなった。*Tgfbr3*/T20株ではレポーター遺伝子が活性遺伝子領域に、IG/T20株では遺伝子間領域に導入されている。したがって活性遺伝子領域の場合、クロマチン構造の質的違いが遺伝子発現の違いに反映していることが示唆された。一方、遺伝子間領域の場合には、クロマチン構造が厳密に管理されていない可能性が示唆された。

さらに、シングルコピー導入ES細胞 (T20/GFP株) と、それを元株とするΔT20/GFP株を比較し、T20によりGFPの発現が大きく向上しているクローンを選定し、それらを用いてキメラマウスを作製した。

(2) 人工ベントDNA配列 (T20配列) によるPoI III型転写活性の賦活化機能の検討

RNAポリメラーゼIII型転写活性におけるクロマチンモジュレーター機能の解析を目的として、shRNA発現トランスジェニックマウスによるノックダウンマウスの作製と解析を行った。まず、これまでに報告したSOD1ノックダウンマウスについて個体レベルで解析し、RNAi効果に組織差があること、micro RNAの経路と競合しないことなどを明らかにした。

次に、SOD1ノックダウンマウスのモデルを利用し、人工ベントDNA配列 (T20配列) をhU6プロモーター/SOD1-shRNA発現ユニットの上流に配置した発現ベクターを作製し、ES細胞に導入した。さらにCreリコンビナーゼによりT20配列を除去したES細胞 (ΔT20/SOD1-shRNA株) を作製した。この両者について、我々が新規に開発したルシフェラーゼアッセイ法によるタンパク質発現抑制効率評価システムを用いて、標的タンパク質SOD1の抑制効率を比較検討した。その結果、T20配列によりRNAi効果が増強される傾向がみられ、クロマチンモジュレーターによるRNAポリメラーゼIIIの転写活性賦活化機能の可能性が示された。

さらに、RNAi技術の特徴であるスプライスバリエーションのノックダウンについて、ABCトランスポーターの一つであるBcrp1がもつ3つのアイソフォーム (A, B, C) をモデルに、アイソフォームAのノックダウンES細胞を作製した。なお、Bcrp1遺伝子は、ES細胞を含む様々な幹細胞を共通して特徴づけるSide Population細胞 (SP細胞) の出現に関わる遺伝子であり、そのスプライスバリエーションであるアイソフォームAは未分化ES細胞において選択的に高発現していることから、本研究のモデルとして適用した。

(3) ES細胞の分化過程における遺伝子座の核内配置の動態の解析

ES細胞や初期胚におけるクロマチンレベルでの転写制御について、細胞核高次構造の機能に着目し、染色体テリトリーと標的遺伝子座の動態について3D-FISH法により解析した。その結果、ES細胞の分化過程において、未分化マーカーである *Oct3/4* 遺伝子座は、未分化状態では第17番染色体テリトリーの辺縁部に局在していたが、分化誘導が進んでも局在部位に顕著な変化はみられなかった。一方、肝分化マーカーである *Tdo2* 遺伝子座では分化に伴い第3番染色体テリトリーからのループアウト現象が観察された。これらの結果から、これまでにMHC遺伝子などでしか報告されていなかった染色体テリトリーからのループアウト現象が *Tdo2* 遺伝子座についても肝分化誘導過程で起きていることが示された。

さらに、3D-FISH法を用いて、ES細胞の分化過程におけるT20/GFP発現カセットの核内配置の動態について、T20/GFP発現カセットの挿入部位と遺伝子発現レベルをパラメーターにさらに解析した結果、分化状態や挿入部位 (遺伝子領域、遺伝子間領域) にともない、発現レベルや遺伝子座の動態が変動する傾向が認められた。このように、ES細胞の分化誘導系と3D-FISHを組み合わせることにより、分化にともなう染色体テリトリーと遺伝子座の動態モデルとして、クロマチン・染色体レベルでの遺伝子発現制御に関する有用な解析モデルを確立した。

本研究は、動物発生工学とクロマチン工学をつなぐダイナミックな連携であり、従来とは異なる新技術「クロマチン改変動物」を創出し、医療・創薬・農林水産業等に大きな恩恵をもたらすと期待される。

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5件)

- ① Tanase J, Mitani T, Udagawa K, Nishikawa J, Takashi Ohyama T.

Competence of an artificial bent DNA as a transcriptional activator in the mouse ES cells. *Mol. Biol. Reports*, 38, 37-47, 2011. (査読有)

- ② Kubodera T, Yamada H, Anzai M, Ohira S, Yokota S, Hirai Y, Mochizuki H, Shimada T, Mitani T, Mizusawa H, Yokota T. In vivo application of an RNAi strategy for the selective suppression of a mutant allele. *Human Gene Therapy* 22, 27-34, 2011. (査読有)
- ③ Onodera Y, Teramura T, Ozawa M, Takehara T, Mitani T, Anzai M, Sagawa N, Hamanishi C, Hosoi Y, Fukuda K. Differentiation diversity of mouse parthenogenetic embryonic stem cells in chimeric mice. *Theriogenology* 74, 135-145, 2010. (査読有)
- ④ Sasaguri H, Mitani T, Anzai M, Kubodera T, Saito Y, Yamada H, Mizusawa H, Yokota T. Silencing efficiency differs among tissues and endogenous micro RNA pathway is preserved in short hairpin RNA transgenic mice. *FEBS Letters* 583, 213-218, 2009. (査読有)
- ⑤ 西山有依, 森田真裕, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 三谷匡, 入谷明. マウス体細胞核移植由来再構築卵子における核内構造制御タンパク質の発現の解析. *Mem. Inst. Adv. Technol., Kinki Univ.* 14, 21-30, 2009. (査読無)

[学会発表] (計 11 件)

- ① 西山有依, 川口翔, 平野大起, 森木甲子郎, 藤本佑希, 細井美彦, 田辺秀之, 三谷匡. マウス胚性幹細胞の分化誘導過程における細胞核染色体テリトリーと遺伝子座の動態. 第 33 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2010 年 12 月 7-10 日.
- ② 西山有依, 森木甲子郎, 藤本佑希, 安齋政幸, 加藤博己, 松本和也, 佐伯和弘, 入谷明, 細井美彦, 田辺秀之, 三谷匡. マウス胚性幹細胞の分化過程における細胞核染色体テリトリーと遺伝子座の動態. 第 28 回日本受精着床学会総会, 横浜, 2010 年 7 月 27-29 日.
- ③ 西山有依, 森木甲子郎, 森田真裕, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 入谷明, 原田昌彦, 三谷匡. Expression of the components of chromatin remodeling factor SWR1 complex in mouse somatic nuclear transfer eggs. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月 9 日-12 日.
- ④ 森木甲子郎, 西山有依, 川村紘子, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 原田昌彦, 入谷明, 三谷匡. Dynamics of Arp family

proteins and components of chromatin remodeling complexes in in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月 9 日-12 日.

- ⑤ 棚瀬潤一, 宇田紘司, 西川純一, 三谷匡, 大山隆. Stable expression of transgenes realized by chromatin engineering. 第 32 回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009 年 12 月 9 日-12 日.
- ⑥ 西山有依, 森田真裕, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 原田昌彦, 三谷匡, 入谷明. マウス体細胞核移植由来卵子におけるクロマチンリモデリング複合体、SWR1 複合体の構成因子の発現. 第 102 回日本繁殖生物学会大会, 奈良, 2009 年 9 月 10 日-12 日.
- ⑦ 川村紘子, 川合智子, 田口善智, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 三谷匡, 入谷明. マウスES細胞の未分化維持機構においてABCトランスポーターBcrp1 が与える影響. 第 102 回日本繁殖生物学会大会, 奈良, 2009 年 9 月 10 日-12 日.
- ⑧ 川村紘子, 網本直記, 田口善智, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 入谷明, 三谷匡. マウスES細胞分化誘導過程におけるABCトランスポーター *Bcrp1* アイソフォームの発現様式およびRNAiによるアイソフォームAノックダウンES細胞樹立の試み. 第 31 回日本分子生物学会年会, 神戸, 2008 年 12 月 9-12 日.
- ⑨ 川村紘子, 網本直記, 田口善智, 安齋政幸, 加藤博己, 細井美彦, 入谷明, 三谷匡. マウスES細胞の分化誘導過程におけるABCトランスポーター *Bcrp1* アイソフォームの発現様式. 第 26 回日本受精着床学会総会, 福岡, 2008 年 8 月 28-29 日.
- ⑩ Mitani T. Differentiation of mouse ES cells to hepatocytes and its application. Recent Advance of Embryonic and Somatic Stem Cells in Biomedical Science Workshop. July 28-29, 2008, Bangkok, Thailand (Invited Speaker)
- ⑪ Kawamura H, Amimoto N, Moriki K, Morita M, Anzai M, Kato H, Hosoi Y, Iritani A, Mitani T. Expression of *Bcrp1* mRNA isoforms during *in vitro* differentiation of mouse embryonic stem cells. 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, May 28 - 30, 2008, Tokushima, Japan.

[その他]

ホームページ等

<http://rais.itp.kindai.ac.jp/researchdb/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三谷 匡 (MITANI TASUKU)

近畿大学・先端技術総合研究所・准教授

研究者番号：10322265

(2) 研究分担者

安齋 政幸 (ANZAI MASAYUKI)

近畿大学・先端技術総合研究所・准教授

研究者番号：30454630

(3) 連携研究者

大山 隆 (OHYAMA TAKASHI)

早稲田大学・教育・総合科学学術院・教授

研究者番号：60268513