

機関番号：82508

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20310123

研究課題名（和文） 包括的機能研究のためのノックイン胚性幹細胞作製の迅速化と解析

研究課題名（英文） Improvement of high-throughput method to generate the knock-in ES cells

研究代表者

中山 学 (NAKAYAMA MANABU)

財団法人かずさDNA研究所・ヒトゲノム研究部・ヒト遺伝子応用技術研究室・主任研究員

研究者番号：30370927

研究成果の概要（和文）：

ノックインマウスはマウス個体レベルで蛋白質の機能を解析するために極めて有用な手法である。大腸菌内での相同組み換え反応により自由に DNA が改変できる Red/ET 組み換えの手法を用いることで、ノックイン作製のベクターを包括的に迅速に作製するシステムとノックインを行なう目的の蛋白質の C 末端部分に交換可能なタグを導入するシステムを構築した。また、ES 細胞のゲノムを複雑で緻密に改変することができるように新しい 2 種類の部位特異的組み換え酵素システムを開発した。

研究成果の概要（英文）：

Producing of knock-in mouse is extremely useful method to analyze various proteins' function in mice. By using Red/ET recombination system which can be recombined any DNA sequence through homologous recombination reaction, we have developed a high-through system to construct targeting vectors for knock-in and a new system to introduce exchangeable protein tag to C-terminal end of the protein. We also have developed two new site-specific recombination systems to engineer genome of mouse ES cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	6,400,000	1,920,000	8,320,000
2009 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010 年度	2,700,000	810,000	3,510,000
年度			
年度			
総計	13,000,000	3,900,000	16,900,000

研究分野：機能ゲノム学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：遺伝子、ゲノム、機能ゲノム、動物、発生・分化、バイオテクノロジー、病態モデル動物

1. 研究開始当初の背景

ゲノム研究の急速な進歩の中で、cDNA や遺伝子産物そのものの解析から包括的な機能解析のステージに明確に移行している。有用なモデル生物であるマウス遺伝子の機能解析のために ENU による突然変異やジーントラップによる大規模なスクリーニングが世

界中の多くのグループにより進められている。しかしながら、遺伝子産物の C 末端部分にタグを挿入する形のノックインマウスの作製を包括的に進めているグループはほとんど見当たらない。重要なことは、このノックインマウスからは遺伝子欠損マウスによる得られる知見とは、別のタイプのマウス個体レベルの重要な知見が得られることである。

る。抗体を作製しにくい蛋白質であったとしても、蛋白質の生体内の局在を明らかにし、それらの蛋白質の機能を生体内と同じように発現調節されている条件下で調べるためには、蛋白質にタグを付加し、マウス個体で発現させるノックインマウスの手法が有効であると考えられる。また、ノックイン ES 細胞を *in vitro* で分化誘導を行わせることで、様々な細胞への分化誘導に伴った蛋白質の発現誘導を可視化することも可能である。

遺伝子にタグを付加する形のノックイン法は、そのタグの種類により EGFP のように蛍光顕微鏡で発現させるタイプ、 β -ガラクトシダーゼのように、発色反応により比較的高感度で検定できるタイプ、また FLAG タグや HA タグのように蛋白質の機能を阻害しないために最小の大きさのもの、TAP 法に用いられるように複数のタグから成り立つもののように様々なタイプが存在する。どのタグもユーザーの目的に応じて使い分けられるケースが多く、遺伝子の機能解析のためにオールマイティ的なタグは存在しない。更に遺伝子の C 末端の直後に正確にタグを挿入することは意外に時間がかかる複雑な手順が必要である。包括的研究を成功させる最も重要なことは、遺伝子ごとにケースバイケースで行なわなければならない複雑なステップをできるだけ排除して、遺伝子に対する基礎知識が無い人でも決まったルーチンの手順で行なえるようにすることが重要である。このような視点から包括的にノックインマウス用のベクターを作製するハイスループットで確実なシステムが必要とされていた。

また、Cre/loxP や Flp/FRT システムは、部位特異的にゲノムを改変することができる広く汎用されているテクノロジーであり、Cre や Flp 組み換え酵素依存的に 34 塩基の組み換えサイトに挟まれた領域を除去、反転することができる。とりわけマウスのコンディショナル KO の実験では、コアとなる技術であり Cre/loxP がエクソン除去のために、Flp/FRT が（発現を邪魔する可能性がある）薬剤耐性遺伝子の除去のために両者のシステムが同時に用いられている。しかしながら、これらの 2 種類以外に認識サイトが異なる新規の部位特異的組み換えシステムが存在するならば、より緻密なゲノム改変ができる可能性が高い。このことから、新規部位特異的組み換えシステムの開発が求められていた。

2. 研究の目的

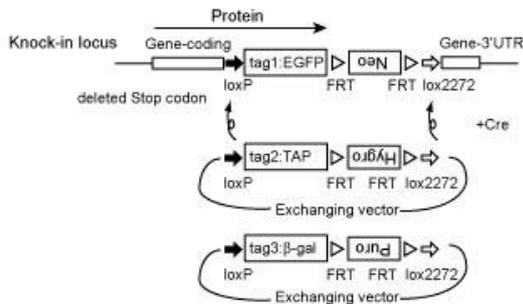
本研究の目標は、(1) ユーザーの必要に応じて、ノックイン ES 細胞を作製した後に、ノックイン用のタグが自由に変えることができる系の開発 (2) 遺伝子の C 末端の直後にタグが付加できるノックインマウス用のベクターが包括的に構築できるシステムの開発あるいは最適化、の 2 点である。具体的には RMCE 法を応用することでノックイン ES 細胞を作製した後にノックイン用のタグを自由に入れ換えることができる系を開発する。また、組み換え効率を上昇させた Red 組み換え法を用いることにより、マウス染色体 DNA を含む BAC クローンから 2 回の Red 組み換え (neo カセットの導入と DTA 遺伝子を含むプラスミドへの移し換え) でノックインマウス用のベクターを並行して構築できるシステムの開発を行ない、ES 細胞での相同組み換えの効率まで視野に入れた全体としてのハイスループット化を行なう。

このようなノックイン ES 細胞の迅速な作製方法を開発することができれば、必要に応じてノックインマウスを迅速に作製することができる有用なバイオリソースとして様々な研究に使用することができるであろう。

また、新規部位特異的組み換えシステムを開発し、既存の部位特異的組み換えシステムとクロス反応を起こさず、同時に使用できることを明らかにすることは、より緻密で複雑なゲノム改変を行うために必要であり、開発の意義が高い。このような新規のバイオテクノロジーは将来的にゲノム改変のスタンダードなテクノロジーとして幅広く使われる可能性があると考えられる。

3. 研究の方法

(1) ノックイン ES 細胞を作製した後に、ノックイン用のタグが自由に変えることの出来るシステムのために、RMCE (Recombinase-Mediated Cassette Exchange) 法を導入した。RMCE 法は、loxP サイトと変異型 loxP サイトである lox2272 サイトを両端に持ち、Cre 酵素依存的に 2 種類の DNA 断片の中身を入れ替える方法である。目的の DNA 断片に入れ換えられたクローンを選択するために、異なる薬剤耐性遺伝子を用いた。また交換の効率を上げるためにネガティブ選択用の tk 遺伝子を用いた。この方法を用いることで一度作製したノックイン ES 細胞のタグを正しいフレームで入れ換えた。



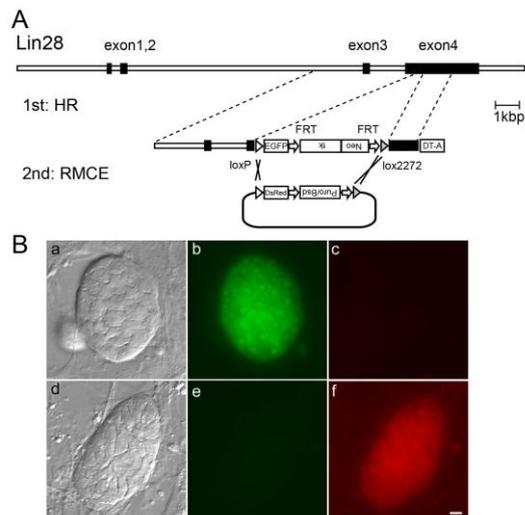
(2) 包括的機能研究のための迅速ノックイン ES 細胞作製のためには、ノックインベクター構築の迅速化が必要である。Red 組み換え反応に必要なラムダファージの組み換え酵素の遺伝子を PCR で増幅し、アラビノースで誘導できる BAD プロモーターの下流に Gam, β, α 蛋白質の遺伝子をオペロンとして挿入したものの中で、野生型より効率が上がる突然変異体の存在を明らかにしてきた。効率を上昇させた Red 組み換え反応を用いて、ノックインベクター作製のハイスループット化が可能となった。

Red 組み換え反応を用いて遺伝子欠損マウス作製を迅速に行なうためのターゲティングベクター構築に必要な neo カセット (neo/km 遺伝子を ES 細胞と大腸菌の両方で働かせるためのカセット) と DTA カセット (ES 細胞用の DTA 遺伝子と大腸菌用の amp 遺伝子を含むカセット) を作製した。neo カセットには上記の RMCE 法でタグを入れ換えのために必要な loxP サイトや FRT サイトを導入した。Red 組み換え法でのノックインベクター作製方法は、最初にマウス染色体 DNA を含む BAC クローンに Red 組み換え法でノックイン用の neo カセットを導入する。次の段階で同じく Red 組み換え法で BAC クローンから DTA 遺伝子を含む通常のプラスミドへ移し変える。2 回の Red 組み換えでノックインベクターを作製することができた。

4. 研究成果

ノックインマウスはマウス個体レベルで蛋白質の機能を解析するために極めて有用な手法である。また、胚性幹 (ES) 細胞は様々な細胞に In vitro で分化させることができることから、マウスを作製するために用いられるだけでなくノックイン ES 細胞自身も有用なバイオリソースとして様々な研究に使用することが可能である。大腸菌内での相同組み換え反応により自由に DNA が改変できる Red/ET 組み換えの手法を用いることで蛋白質の C 末端部分にタグを付加する形のノックイン作製のベクターを包括的に迅速に作

製するシステムを構築した。蛋白質の検出や様々な用途の実験のために色々なタグが現在広く使用されているが、ノックイン ES 細胞を多目的に使用するためには、ノックイン ES 細胞を作製した後にノックイン用のタグを自由に変えることの出来るシステムを開発することが必要である。このために従来は特定の場所に cDNA 等の発現ユニットを挿入する方法として開発された RMCE (Recombinase-Mediated Cassette Exchange) 法をノックイン ES 細胞のタグの入れ換えの手法として用い、ノックインを行なう目的の蛋白質の C 末端部分に交換可能なタグを導入するシステムを構築した。FRT サイトと変異型 FRT サイトの組み合わせと loxP サイトと変異 loxP サイトの組み合わせを比較した結果、タグの交換効率が最適なシステムを構築することができた。Lin28 は let-7 前駆体が成熟 miRNA にプロセッシングされることを妨げる負の制御因子として働く RNA 結合蛋白質であるが、Lin28 遺伝子を例に上記の RMCE のシステムを用いて Cre 酵素依存的に EGFP から DsRed タグに入れ換えることにより、一度作製したノックイン ES 細胞のタグを正しいフレームで入れ換えることが可能であることを示すことができた。



ES 細胞のゲノムをより複雑で緻密に改変することができるように Cre/loxP や Flp/FRT と認識サイトが異なり、これらのシステムと併用できる新しい 2 種類の部位特異的組み換え酵素システムを開発し、VCre/VloxP と SCre/SloxP と名付けた。これらの新規組み換え酵素は、Cre 蛋白質と 30% 程度の低い相同性しか示さず、部位特異的な認識サイトも異なる。各認識サイトを含むプラスミドを導入し組み換え反応を起こさせたところ、Cre/loxP 系とほぼ同じ効率で組み換え反応を起こすことができた。これらの組み換え酵素と認識サイトは特異性が極めて高く、相互

にクロス反応は起こさないことが明らかになった。また、マウス ES 細胞でも VCre 蛋白質発現依存的に VloxP で挟んだエクソンを欠損させることができた。

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 10 件)

① Minorikawa S. and Nakayama M. Recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) and BAC engineering via VCre/VloxP and SCre/SloxP systems. **BioTechniques** 査読有 Vol. 50, (2011), pp.235-246.

② Suzuki E. and Nakayama M. VCre/VloxP and SCre/SloxP: new site-specific recombination systems for genome engineering. **Nucleic Acids Res.** 査読有 Vol. 39, (2011), e49

③ Lu B., Zhang Q., Wang H., Wang Y., Nakayama M., Ren D. Extracellular Calcium Controls Background Current and Neuronal Excitability via an UNC79-UNC80-NALCN Cation Channel Complex. **Neuron** 査読有 Vol. 68, (2010), pp.488-499.

④ Masuda K., Mori H., Ohara O., Nakayama M., Wang J., Burrows P. Defining the immunological phenotype of Fc receptor-like B (FcRLB) deficient mice: confounding role of the inhibitory Fc γ RIIb. **Cellular Immunology** 査読有 Vol.266, (2010), pp.24-31.

⑤ Nakayama M. Homologous recombination in human iPS and ES cells for use in gene correction therapy. **Drug Discov. Today** 査読有 Vol.15, (2010), 198-202.

⑥ Takashina T. and Nakayama M. Eliminating target cells by inducing apoptosis-related factors using hTERT promoter. **Open Biotechnol J** 査読有 Vol.4, (2010), pp.1-7.

⑦ Ohmura-Hoshino M, Matsuki Y, Mito-Yoshida M, Goto E, Aoki-Kawasumi M, Nakayama M. Ohara O, Ishido S. Requirement of MARCH-1-mediated MHC II ubiquitination for the maintenance of conventional dendritic cells. **J Immunol.** 査読有 Vol.11, (2009), pp.6893-6897.

⑧ Suzuki E, Takashina T., Nakayama M. Engineered FADD induces apoptosis via an artificial death-inducing signaling complex (DISC). **Int J Biomed Sci.** 査読有 Vol.5, (2009), pp.237-245.

⑨ Nakayama M. Cell therapy using induced pluripotent stem (iPS) cells meets next-next generation DNA sequencing technology. **Curr. Genomics** 査読有 Vol.10, (2009), pp.303-305.

⑩ Fukada T, Civic N, Furuichi T, Shimoda S, Mishima K, Higashiyama H, Idaira Y, Asada Y, Kitamura H, Yamasaki S, Hojyo S, Nakayama M. Ohara O, Koseki H, Dos Santos HG, Bonafe L, Ha-Vinh R, Zankl A, Unger S, Kraenzlin ME, Beckmann JS, Saito I, Rivolta C, Ikegawa S, Superti-Furga A, Hirano T. The zinc transporter SLC39A13/ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGF-beta signaling pathways. **PLoS ONE.** 査読有 Vol.3, (2008), e3642.

[学会発表] (計 3 件)

①中山 学、新規部位特異的組み換えシステムを用いたゲノム改変技術の開発、第 33 回日本分子生物学会年会、平成 22 年 12 月 7 日、神戸ポートピアホテル

②中山 学、ノックイン胚性幹細胞作製の迅速化と新規ゲノム改変技術の開発、第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月 11 日、パシフィコ横浜

③中山 学、包括的機能研究のためのノックイン胚性幹細胞作製の迅速化と解析、BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会)、平成 20 年 12 月 11 日、神戸ポートアイランド

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：新規な部位特異的組換え酵素とその認識配列を用いた部位特異的組換え方法

発明者：中山 学

権利者：かずさDNA研究所

種類：特許

番号：2009-248439

出願年月日：平成 21 年 10 月 29 日

国内外の別：国内

名称：新規な部位特異的組換え酵素とその認識配列を用いた部位特異的組換え方法

発明者：中山 学

権利者：かずさDNA研究所

種類：特許

番号：特願 2009-136830

出願年月日：平成21年6月8日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 学 (NAKAYAMA MANABU)

財団法人かずさDNA研究所・ヒトゲノム研究部・ヒト遺伝子応用技術研究室・主任研究員

研究者番号：30370927

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし