

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401
 研究種目：若手研究（S）
 研究期間：2008 ～ 2012
 課題番号：20670006
 研究課題名（和文） レンチウイルスベクターを用いた新しい遺伝子機能解析システムの構築とその応用
 研究課題名（英文） In vivo gene function analysis using lentiviral vector
 研究代表者
 伊川 正人（IKAWA MASAHIITO）
 大阪大学・微生物病研究所・教授
 研究者番号：20304066

研究成果の概要（和文）：本研究では、レンチウイルスベクターを用いて個体レベルでの遺伝子機能解析システムを構築すると共に、遺伝子破壊マウスライブラリーを構築した。さらに遺伝子破壊マウスの約 1 割でみられる生殖不全について解析を進めた。結果として、*Calr3*, *Pdilt*, *Spesp1*, *Tex101*, *Pmis2* が精子の受精能力に必須であることを証明し、また胎盤特異的な遺伝子操作により妊娠高血圧症候群のモデル動物の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we developed the lentiviral vector system for random mutagenesis in mice. Next we analyzed reproductive failures found in the mice we created. Consequently, we found that genes coding testis specific proteins, *Calr3*, *Pdilt*, *Tex101*, and *Pmis2* are required for the maturation of sperm fertilizing protein, ADAM3, and male fertility. We further developed the preeclampsia model mice by placenta specific gene manipulation system.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2008年度 | 10,500,000 | 3,150,000 | 13,650,000 |
| 2009年度 | 16,000,000 | 4,800,000 | 20,800,000 |
| 2010年度 | 16,000,000 | 4,800,000 | 20,800,000 |
| 2011年度 | 16,000,000 | 4,800,000 | 20,800,000 |
| 2012年度 | 16,000,000 | 4,800,000 | 20,800,000 |
| 総計 | 74,500,000 | 22,350,000 | 96,850,000 |

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：レンチウイルス・ジーントラップ・バイオリソース・生殖・実験動物・不妊・ノックアウト

1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウスの全ゲノム配列が明らかにされた 21 世紀はポストゲノム時代と言われるが、ゲノムに秘められた無数の遺伝情報を生理機能と結びつけるには、個体レベルで遺伝子機能を解析する手法や、遺伝子組換え動物そのものが必要不可欠となる。

代表者は遺伝子治療用に開発されたレンチウイルス (LV) ベクターに着目し、個体レ

ベルでの遺伝子操作法の開発を進めていた。研究開始前に LV ベクターを受精卵に感染させることで効率的にトランスジェニックマウスが作製できる手法 (LV-TG 法) や、胚盤胞に感染させることで胎盤特異的に遺伝子導入できる手法を開発していた。

2. 研究の目的

LV ベクターの特長を生かしたジーントラ

ップ遺伝子破壊法や遺伝子置換システム、胎盤特異的遺伝子操作法など、個体レベルでの遺伝子機能解析システムを開発する。遺伝子破壊したマウスは、バイオリソースとして公開し広く生命科学研究者に提供する。

ところで遺伝子を破壊したマウスの約1割で生殖不全が認められる。本研究で作製したマウスを中心に、生殖不全を示す遺伝子破壊マウスについて重点的に解析を進めることで、哺乳類の生殖メカニズムについて理解を深め、社会問題にもなっている不妊・不育の診断・治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) 【遺伝子破壊マウスライブラリーの構築】

内在性遺伝子内に挿入された場合には、そのポリ A シグナルを利用して CAG プロモーターにより EGFP を発現すると同時に内在性遺伝子を破壊するジーントラップ用の LV ベクターを開発する。

ジーントラップ用 LV ベクターを生殖系列に寄与できる Embryonic Stem (ES) や Germ line Stem (GS) 細胞、もしくは受精卵に感染させることで、遺伝子破壊したマウスを効率良く作製する。LV ベクターの挿入位置を LAM-PCR 法により同定し、遺伝子破壊マウスはバイオリソースとして公的機関に寄託し、広く公開・提供する。

(2) 【LV ベクターを用いた遺伝子機能解析法の開発】

薬剤耐性遺伝子をゲノム相同領域で挟んだ相同組み換えカセットを搭載した LV ベクターを構築する。ES 細胞に感染させて相同組み換えによる標的遺伝子組み換えが可能かどうかを検討するが、インテグレース欠損型 LV ベクターを用いてランダム挿入を抑制する工夫を施す。

LV ベクターを胚盤胞期胚に感染させれば胎盤特異的に遺伝子操作できる系を利用して、胎盤形成・機能に関与すると予想される因子群について順次、過剰発現させて妊娠に及ぼす影響を検討する。

(3) 【生殖不全マウスの解析】

交配試験により生殖不全が認められたマウスについて、性行動、配偶子形成、射精・排卵、受精・着床、妊娠というステップに分けて表現型を解析する。

4. 研究成果

(1) 【遺伝子破壊マウスライブラリーの構築】

ジーントラップ用 LV ベクターを ES 細胞に感染させて薬剤選択を行った。これまでに LV ベクター挿入株を 1000 クローン以上樹立し

た。また受精卵への感染では GFP 蛍光選別により LV ベクターが挿入されたマウスを 200 系統近く作製した。内 82 系統について挿入位置を同定するとともに、57 系統を公的バイオリソースセンターに寄託・公開し、譲渡可能とした。

(2) 【LV ベクターを用いた遺伝子機能解析法の開発】

胎盤特異的な遺伝子操作技術を応用して、血管新生阻害因子である可溶性の VEGF 受容体 (sFLT1) を胎盤特異的に発現させることを試みた。その結果、妊娠マウスの血圧が上昇すると共にタンパク尿を発症し、妊娠高血圧症候群のモデルとなることを見出した。さらにこのモデルマウスを用いて sFLT1 が胎盤の血管新生不全や子宮内胎児発育不全を引き起こすことを明らかにした。またプラバスタチン投与により VEGF 様の PGF (Placental Growth Factor) が誘導され、治療効果を示すことを明らかにした。

(3) 【生殖不全マウスの解析】

遺伝子破壊したマウスで見られる生殖不全について解析を進め、10 以上の系統について生殖に関する表現型を解析し、内 8 系統について雄性不妊を認めた。例えば精細胞に特異的に発現する小胞体シャペロンである CALR3 や、S-S 結合の触媒酵素である PDILT を欠損すると、精子の形態や運動性は正常であるにも関わらず、精子が子宮から卵管に移行できないために雄性不妊となった。その後の解析から、CALR3 と PDILT は共役して働き精子膜タンパク質である ADAM3 の品質管理に関与することを明らかにした。

またアンジオテンシン変換酵素である ACE が GPI アンカー型タンパク質である TEX101 の切断を介して ADAM3 の成熟に必須であることを明らかにした。

これらを含めて 30 系統以上の遺伝子破壊マウスの表現型について論文発表した。

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 53 件)

- ① Fujihara Y, Tokuhiko K, Muro Y, Kondoh G, Araki Y, Ikawa M, Okabe M#. Expression of TEX101, regulated by ACE, is essential for the production of fertile mouse spermatozoa. **Proc Natl Acad Sci U S A** 110:8111-6 (2013) 査読有 doi:10.1073/pnas.1222166110
- ② Tokuhiko K, Ikawa M#, Benham AM,

- Okabe M. Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male fertility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:3850-5 (2012) 査読有
doi:10.1073/pnas.1117963109
- ③ Fujihara Y, Satouh Y, Inoue N, Isotani A, Ikawa M, Okabe M#. SPACA1-deficient male mice are infertile with abnormally shaped sperm heads reminiscent of globozoospermia. *Development* 139:3583-9 (2012) 査読有
doi:10.1242/dev.081778
- ④ Satouh Y, Inoue N, Ikawa M, Okabe M#. Visualization of the moment of mouse sperm-egg fusion and dynamic localization of IZUMO1. *J Cell Sci* 125:4985-90 (2012) 査読有
doi:10.1242/jcs.100867
- ⑤ Yamaguchi R, Fujihara Y, Ikawa M, Okabe M#. Mice expressing aberrant sperm-specific protein PMIS2 produce normal-looking but fertilization-incompetent spermatozoa. *Mol Biol Cell* 23:2671-9 (2012) 査読有
doi:10.1091/mbc.E11-12-1025
- ⑥ Kumasawa K*, Ikawa M*#, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, Takakura N, Kimura T, Okabe M. From the Cover: Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA* 108: 1451-1455 (2011) 査読有
doi:10.1073/pnas.1011293108
- ⑦ Ikawa M*#, Tokuhiro K*, Yamaguchi R, Benham AM, Tamura T, Wada I, Satouh Y, Inoue N, Okabe M. Calsperin Is a Testis-specific Chaperone Required for Sperm Fertility. *J Biol Chem* 286: 5639-5646 (2011) 査読有
doi:10.1074/jbc.M110.140152
- ⑧ Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M#. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. *J Clin Invest* 120: 984-994 (2010) 査読有
doi:10.1172/JCI41585
- ⑨ Morioka Y, Isotani A, Oshima RG, Okabe M, Ikawa M#. Placenta-specific gene activation and inactivation using integrase-defective lentiviral vectors with the Cre/LoxP system. *Genesis* 47: 793-798 (2009) 査読有
doi:10.1002/dvg.20563
- ⑩ Okada Y, Ueshin Y, Hasuwa H, Takumi K, Okabe M, Ikawa M#. Targeted gene modification in mouse ES cells using integrase-defective lentiviral vectors. *Genesis* 47: 217-223 (2009) 査読有
doi:10.1002/dvg.20469
- *equal contribution
corresponding author
- [学会発表] (計 24 件)
- ① 伊川正人、ER chaperones, ADAM3, and sperm fertilizing ability、日本発生物学会第 46 回大会、2013.05.31、松江 (招待)
- ② Masahito Ikawa, Placental Gene Manipulation and Its Application in the Study of Placental Biology and Diseases, 2012.05.10, 北京, China (招待)
- ③ Masahito Ikawa, ANZPLA meeting (satellite meeting of WCRB), Lentiviral transduction & placenta-specific gene manipulation to study PE in a mouse model, 2011.10.07, Cairns, Australia (招待)
- ④ Masahito Ikawa, 9th International Calreticulin Workshop, 2011.08.29, Copenhagen, Denmark (招待)
- ⑤ 伊川正人、胎盤の遺伝子操作とその応用、第 58 回日本実験動物学会総会、2011.05.25、船堀 (招待)
- ⑥ Masahito Ikawa, Lentiviral vector mediated gene transfer and its application in mouse genetics, Asian Federation of Laboratory Animal Science Associations Annual Meeting, 2010.11.09, Taipei, 中華民国 (招待)
- ⑦ Masahito Ikawa, Placenta specific gene manipulation using lentiviral vectors, 4th Asian Mouse Mutagenesis Resource Association meeting,

2009.12.17, Singapore (招待)

- ⑧ 伊川正人、精巢シャペロンが制御する精子の受精能力、第 80 回日本動物学会、2009.09.17、静岡 (招待)
- ⑨ 伊川正人、レンチウイルスベクターを用いた新しいジーントラップ法の開発、第 56 回日本実験動物学会総会、2009.05.15 大宮 (招待)
- ⑩ 伊川正人、ウイルスベクターを用いた胎盤特異的な遺伝子機能解析、日本生殖医学会、2008.10.23、神戸 (招待)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：妊娠高血圧症候群モデル動物とその治療方法

発明者：伊川正人、熊澤恵一、木村正、岡部勝

権利者：発明者および扶桑薬品工業

種類：特許

番号：特願 2010-048237

出願年月日：2010 年 3 月 4 日

国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：栄養外胚葉細胞特異的遺伝子導入法

発明者：岡部勝、伊川正人

権利者：岡部勝、伊川正人

種類：特許

番号：特許第 5020083 号

取得年月日：平成 24 年 6 月 22 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.egr.biken.osaka-u.ac.jp/information/>

<http://www.arcid.biken.osaka-u.ac.jp/index.php>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊川 正人 (IKAWA MASAHIITO)

大阪大学・微生物病研究所・教授

研究者番号：20304066