

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650236

研究課題名(和文) マウスES細胞の維持に必須な遺伝子群の網羅的探索

研究課題名(英文) Genome-wide screening for the genes essential for the maintenance of mouse embryonic stem cells

研究代表者

堀江 恭二 (Kyoji, Horie)

奈良県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：30333446

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：ES細胞は、無限の自己複製能と、様々な細胞系譜へ分化するための多能性という、2つの特徴を有す。ES細胞を再生医療へ応用するには、この2つの特性を制御する遺伝子群についての詳細な解析が必要である。本研究では、近年報告されたハプロイドのマウスES細胞に対して、我々が長年に渡って用いて来た遺伝子トラップ法を適用し、ベクター挿入による遺伝子破壊株の単離の原理を証明した。本研究で樹立した実験条件を大規模化することで、ES細胞の自己複製と未分化維持に必須な遺伝子の網羅的スクリーニングが可能となり、表現型を元にした遺伝子機能解析に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Embryonic stem cells are characterized by unlimited self-renewal capacity and pluripotency to differentiate into various cell lineages. In depth analyses of these two characteristics are needed in order to apply ES cells toward regenerative medicine. In the present study, we applied gene trap strategy to recently developed mouse haploid ES cells and demonstrated feasibility of gene inactivation through insertional mutagenesis. A large scale application of our mutagenesis scheme would accelerate phenotype-based screen for the genes essential for self-renewal potential and maintenance of pluripotency.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：発生工学 ES細胞 ゲノム 遺伝子 バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子機能を解析する際に、遺伝子を破壊してその表現型を調べる方法は、一般性の高い手法である。とりわけ、特定の遺伝子に特化せずに網羅的かつランダムに遺伝子を破壊し、その中から目的とする表現型を示す変異体を選択する「順遺伝学」的手法は、研究者の恣意的要素が入らないために、全く新規の遺伝子機能の特定に繋がる可能性があり、大腸菌、酵母、線虫、ショウジョウバエなどでは、その有用性が確立している。これに対してマウスをはじめとする哺乳動物においては、多数の変異体を作製することは技術的に困難であり、順遺伝学的手法が立ち遅れて来た。この状況を打開すべく、研究代表者はこれまで、マウスをモデルとした網羅的遺伝子破壊法の開発に携わり、トランスポゾンを用いた変異マウス大量作製技術を開発した (Horie et al. PNAS 98: 9191, 2001; Horie et al. Mol Cell Biol 23: 9189, 2003)。さらに、この経験をマウス ES 細胞に適用し、Bloom 遺伝子の一過性発現抑制による相同染色体間組換えを利用したホモ変異体 ES 細胞の網羅的取得と、ES 細胞の多分化能を規定する遺伝子のスクリーニング法を開発した (Yusa, Horie et al. Nature 477: 340, 2004; Horie et al. Nature Methods 8: 1071, 2011)。しかし、ES 細胞の自己複製能や未分化性の維持に必須な遺伝子は、ホモ変異体の単離自体が不可能なため、新たな手法の開発が望まれていた。国際的にも、このような必須遺伝子に対しては、個々の遺伝子をジーンターゲット法により精巧に改変してコンディショナル遺伝子破壊を行うことが一般的であり、網羅的なスクリーニングは困難であった。本研究では、最近報告されたハプロイド ES 細胞に対し、我々が蓄積してきた遺伝子破壊技術を適用し、必須遺伝子の網羅的スクリーニングを行うことを計画した。ハプロイド ES 細胞は、ひとつのアレルを破壊することで、原理的には遺伝子機能が不活化される。このため、哺乳動物細胞の問題点である「両アレルの不活化」という過程をスキップすることができ、迅速かつ網羅的な遺伝子破壊が期待できる。

## 2. 研究の目的

ES 細胞は、無限の自己複製能と、様々な細胞系譜へ分化するための未分化性という、2つの特徴を有す。本研究では、ES 細胞の自己複製と未分化性維持に必須な遺伝子をスクリーニングするための遺伝子破壊法を開発する。

まず、ハプロイド ES 細胞に対して遺伝子トラップベクターをランダムに導入する。自己複製能や未分化性維持に必須な遺伝子が不活化されると、その細胞は死滅するか、もしくは分化に伴う増殖性低下により細胞群から消失する。消失した細胞における変異遺伝子は、ゲノム DNA において、ベクター挿入

部位を次世代シーケンサーで解析することで特定する。特定した変異遺伝子は、自己複製能や未分化性維持に必須の遺伝子と考えられる。

本手法で特定する遺伝子は、ランダムな遺伝子破壊にもとづくものであるため、ES 細胞の維持や多能性に新たな光を当てるものと期待できる。将来的には、特定した遺伝子のヒトでのカウンターパートを用いて、ヒト ES/iPS 細胞の多能性に重要な遺伝子を特定し、再生医療の進歩へ寄与したい。

## 3. 研究の方法

### (1) ハプロイド ES 細胞の培養条件の確立

ハプロイド ES 細胞は、Wutz ら樹立した細胞株を用いた (Leeb and Wutz, Nature 479:131, 2011)。ハプロイド ES 細胞は、自然にディプロイド化する性質が有り、実用上、大きな問題となる。このため、定期的に細胞を Hoechst33342 で染色して、染色体の含有量が 1N の細胞を FACS で sorting する必要がある。一方、Hoechst33342 での染色は、細胞に対して毒性が出現する可能性もある。そこで、Hoechst33342 によるダメージを最小限に留めるための染色条件を検討した。

### (2) 遺伝子トラップベクターの開発

網羅的かつランダムに遺伝子破壊を行うために、piggyBac トランスポゾン骨架を用いたベクターを作製した。Cre/loxP 配列を用いて、スプライス・アクセプターをはじめとする遺伝子破壊ユニットを反転させ、コンディショナルに遺伝子を破壊することを試みた。

### (3) 遺伝子トラップベクターの細胞への導入効率の検討

遺伝子トラップベクターを効率的にゲノムへ挿入するためのトランスフェクション条件を検討した。

### (4) 破壊された遺伝子の特定

遺伝子トラップベクターの挿入部位からゲノム DNA を精製し、挿入部位の周辺配列を ligation-mediated PCR および sequencing で同定した。さらに、sequencing で同定したゲノム領域を、マウスのデータベースと照合することにより、変異遺伝子を特定した。

### (5) 破壊された遺伝子の遺伝型の判定

(1)で記載の通り、ハプロイド ES 細胞は自然にディプロイド化が進行する。よって、ベクターをゲノムへ挿入した際にディプロイド ES 細胞をヒットする可能性も否定できない。そこで、ベクターのゲノム挿入部位の近傍とベクター内に PCR primer を設定して、変異アレルの出現とともに、野生型アレルが消失しているかどうかを確認した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ハプロイド ES 細胞の培養条件の確立

ハプロイド ES 細胞は、原著によると、いわゆる 2i 培地 (GSK3b inhibitor & MEK inhibitor) を使用することが重要とされている。2i を添加する基礎培地として、血清含有培地である N2B27+Neurobasal medium と、通常の血清入り培地等を試した。その結果、試した 2 種類の ES 細胞株間で、各々の培地に対する反応性に違いを認めた。基本的には、N2B27+Neurobasal medium を用いることにした。

FACS sorting 後に細胞の増殖能が著しく低下することを見出した。増殖能が低下すると、それに伴い、細胞へのベクター導入効率が低下する。しかし、sorting する細胞を大量に揃えようとする、細胞の増殖過程でディプロイド化が進行するので、かえって効率が低下しうる。この両因子を検討した結果、細胞の sorting から 1 週間弱程度でベクター挿入実験を行うことが至適条件であることがわかった。

##### (2) 遺伝子トラップベクターの開発

我々は当初、遺伝子破壊ユニット (splice acceptor - reporter - polyadenylation signal) が Cre 依存的に反転するベクターの作製を試みた。反転自体は為しえたのだが、反転効率が期待より低く、Cre の持続的発現が必要であった。この点については、強い改善が望まれるところであり、Cre の target 配列である lox 配列に工夫を加えることを計画している。

##### (3) 遺伝子トラップベクターの細胞への導入効率の検討

Promega 社の TransFast を用いて効率的な遺伝子導入を達成できた。しかしながら、(1) で記載のように、FACS sorting により細胞の増殖能が一過性に低下するので、通常の TransFast 使用時の細胞数を取得すること自体が容易ではない。そこで将来は、レンチウイルスを骨格とした遺伝子トラップベクターを使用することが有用と考えられた。レンチウイルスは、原理的には、増殖していない細胞に対しても効率的に感染するはずである。よって、FACS sorting による生存細胞数の減少や増殖能の低下に関わらず、遺伝子トラップユニットを細胞へ導入できると考えられる。

##### (4) 破壊された遺伝子の特定

我々がディプロイド ES 細胞での遺伝子破壊で樹立済みのプロトコールにより、容易に破壊遺伝子を同定できた。問題点としては、1 つの細胞に複数のベクターが挿入しうる点である。このため、表現型と責任遺伝子の対応関係に不確実性が残る。これを解決するためにも、上記のレンチウイルスベクターは、m.o.i. (multiplicity of infection) を低

値に抑えることにより 1 コピー挿入の達成が比較的容易なので、将来的には適していると考えられた。

##### (5) 破壊された遺伝子の遺伝型の判定

野生型アレルが消失した細胞が多いものの、残存しているものも散見された。これより、FACS sorting 後のディプロイド化の進行後にベクターの挿入がなされたと考えられた。この点を解決するために、上記のように sorting 直後にレンチウイルスベクターを使用する方法が有力であるが、それ以外に、ベクターの導入後に再度 FACS sorting を行って、ハプロイド細胞を回収することも有用と考えている。

##### (6) その他の考察

FACS sorting に関して

Hoechst33342 染色で 1N とみなされる細胞は、FACS の FSC の分布から、細胞の大きさ自体が小さいことが明らかである。よって、必ずしも Hoechst33342 染色を行わなくても、サイズの小さな細胞を gating することで、1N の濃縮をできる可能性がある。これが可能になれば、Hoechst33342 の細胞毒性を抑えられる分、sorting 後の細胞増殖能も高まる可能性がある。

##### CRISPR/Cas9 システムとの比較

本研究の申請が受理されたのちに、CRISPR/Cas9 システムによる遺伝子破壊法が報告され、その効率の高さから、極めて多くの研究者が使用するようになってきた (Mali et al. Science 339:823, 2013; Cong et al. Science 339:819, 2013)。また、CRISPR/Cas9 を用いて網羅的に遺伝子破壊を行う手法も報告され、順遺伝学的手法にも革命を起こしつつある (Wang et al. Science 343:80, 2014)。よって、今後、ハプロイド ES 細胞を用いた研究では、CRISPR/Cas9 システムとの違いを明確に打ち出す必要があるだろう。最も異なる点は、CRISPR/Cas9 システムにおいては、新規の遺伝子を特定できない点である。この点では、遺伝子トラップベクターを用いたランダム変異導入法に利点があると考ええる。我々も、この特性をより引き出すことを意識して、本研究の成果を次の研究へと繋げて行きたい。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

吉田純子、竹田潤二、堀江恭二 レトロウイルスおよびトランスポゾンベクターのゲノムワイドな挿入部位解析 第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 3-6 日 神戸  
Junko Yoshida, Kyoji Horie. Genome-wide comparative analyses of

retroviral and DNA-type transposon vector integration sites in mouse embryonic stem cells: Implication for reprogramming study. 11<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. June 12-15, 2013. Boston, USA.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
該当無しなし

〔その他〕  
該当無し

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

堀江 恭二 (HORIE, Kyoji)  
奈良県立医科大学・第二生理学・教授

研究者番号：30333446

(2) 研究分担者  
該当者無し

(3) 連携研究者  
該当者無し