

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24650241

研究課題名(和文)染色体異常疾患モデルマウスの開発、及び原因遺伝子同定

研究課題名(英文)Development of a new method to generate the model animal of human chromosomal disorders

研究代表者

田村 勝(Tamura, Masaru)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソースセンター・開発研究員

研究者番号：50370119

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)：本研究課題では、モデル動物がない為に解析が遅れている染色体異常疾患において、CRE/loxPシステムとトランスポゾンを用いてモデル動物を作製する手法の確立を試みた。即ち、相同染色体上の異なる遺伝子座にLoxP配列を挿入し、それらをCRE組換え酵素を用いてトランスに組換えることにより染色体部分重複、部分欠損マウスの作製を行った。また、モデルマウスの表現型を詳細、かつ網羅的に解析する為に μ -CTを用いた解析手法を開発した。その結果、モデル動物作製、及び μ -CTによる表現型解析法の基盤を構築することができた。これらの成果は、今後の染色体疾患解析に貢献できるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is estimated that over 1% of human newborn have some kind of chromosomal anomalies including partial trisomy. Although incidence of chromosomal abnormalities is high, molecular mechanisms and causative genes of chromosomal disorders remain unclear, because we have no animal model of most part of chromosomal diseases. In this study, we challenged the development of the new method that created the model animal of chromosomal disorders using the CRE/loxP technology and local hopping system of transposon. We inserted the loxP and Tol2 transposon into the mouse genome by transgenic or homologous recombination techniques. We obtained several transgenic mouse lines and ES cell lines, and established the platform to generate the model animal of chromosomal disorders. In addition, we tried to develop the new phenotyping method using the micro computed tomography and contrast agents. These new techniques will help us to understand the molecular mechanism of human chromosomal disorders.

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：マウス 染色体異常疾患 トリソミー モデル動物 CRE/loxP トランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

ヒトにおける単一遺伝子疾患は、遺伝子ノックアウトマウスや N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)等を用いた点突然変異マウスをモデル動物として解析を行うことにより、大きな進展を見せている。一方、ヒトにおける trisomy や monosomy などの染色体異常は高頻度(新生児の約 1%)に生じているが、その責任遺伝子や分子メカニズムに関しては驚くほど明らかにされていない。その一つの理由として、染色体異常モデル動物は、ダウン症などの極限られた疾患を除いては存在せず、実験アプローチに限りがあることが挙げられる。即ち、染色体異常疾患を理解する為にはそのモデル動物が求められている。

軸前側多指症を示す自然発症優性突然変異マウス Recombination induced mutation 4 (*Rim4*)は、ヒト 4 番染色体 4q31-35 と相同な領域を重複しており、4 番染色体長腕部分重複症のモデルマウスであることが本研究申請研究代表者らの解析から明らかになった。当該疾患の患者二人と *Rim4* の表現型を比較したところ、非常に多くが共通していた(*Rim4* の染色体重複領域はこれら患者のそれに完全に含まれる)。このことは、共通表現型の原因遺伝子が *Rim4* における重複領域に存在することを意味している。一方で患者における症状で最も Quality of life (QOL)に関係する表現型の一つである腎臓抵形成は *Rim4* において観察されない。このことから腎臓抵形成責任遺伝子が *Rim4* 重複ゲノム領域の外側に存在すると考えられ、腎臓抵形成を示す 4q+染色体異常モデルマウスが望まれた。

2. 研究の目的

染色体異常疾患に対するモデル動物自体、非常に数が限られているが、それらは偶然の産物として得られたものが多い。実際に我々が見出し、解析を行っている 4 番染色体長腕部分重複症のモデルマウス、*Rim4* も自然発症突然変異マウスである。一方、最近になって比較ゲノムハイブリダイゼーション法(Comparative genomic hybridization, CGH)等の解析技術の向上により、染色体部分重複、部分欠損疾患症状における原因候補領域が非常に限定された領域で予想されるようになってきた。同時に loxP 配列と Embryonic Stem (ES)における相同組換え、CRE 組換え酵素による組換えを利用して、目的の染色体異常疾患原因候補領域を異常に持つモデルも作製されるように成りつつある。しかしこの手法では、2 回の相同組換えを行うことが必要で、非常に煩雑であり、また一度作製したモデルを解析した結果、目的疾患のモデルとならなかった場合には、また一から作製し直さなければならない。即ち、非常に労力が掛かり、場合により更なる時間と労力を要する。

このような状況下において、本研究は未だにモデル動物が非常に少ない染色体異常疾患のモデル動物を容易に作製する技術を開発することを第一の目的とする。具体的には、トランスポゾン内に loxP 配列を組み込み、一度ゲノム内に挿入した配列を再度移動可能にすることにより、多彩な染色体重複、もしくは欠損モデルを作製する基盤を構築する。同時に、染色体異常疾患モデル動物表現型を高速・高精細、かつ網羅的に解析することを目的として micro computed tomography (micro-CT)による軟組織イメージング法の開発、改良を行う。更にこれらの技術を用いて染色体異常疾患表現型の責任遺伝子同定に挑む。

3. 研究の方法

本研究では、Cre/loxP システム、並びにメダカ(*Oryzias latipes*)由来トランスポゾンである Tol2 を用いて染色体異常疾患モデル動物を作製する。具体的には、Tol2 トランスポゾン内に loxP 配列を挿入し、このトランスポゾンをマウスゲノム中に導入する。遺伝子導入は、受精卵前核注入トランスジェニック法によるランダムインテグレーションと ES 細胞を用いた標的遺伝子組換え法により行う。マウスゲノム中に導入された Tol2/loxP は、トランスポゾン転移酵素を作用させることによりローカルホッピングさせ、様々なゲノム領域に Tol2/loxP が挿入されたマウス個体を作製する(なお、トランスポゾンはローカルホッピングによりその多くが近傍ゲノム領域に Cut & Paste することが知られている)。これらのマウスを元に同一染色体で別々の locus に loxP 配列を持つ受精卵を作製し、そこに CRE タンパク質を作用させることにより相同染色体間で組換えを起こさせて、染色体部分重複、染色体部分欠損モデル動物を作製する。なお、Cre/loxP により染色体間で組換えが引き起こされたことを簡単に検出する為に、発現ベクターに pCAGGS を、reporter gene に EGFP 及び RFP を、更に DRE/roxP, FLP/frp を組み合わせ検出系を構築する。

モデル動物作製系の構築と平行して、造影 micro-CT を用いた網羅的表現型解析系を構築する。この構築には、各種固定法や造影剤の選定、イメージング条件などの検討を行う。また、これらの技術評価として、ヒト 4 番染色体長腕部分重複症モデルマウスの *Rim4* と当該マウスで重複ゲノム領域に存在する遺伝子の KO マウスをモデルに、表現型責任遺伝子の同定を行う。

4. 研究成果

pCAGGS プラスミドの promoter/enhancer 領域を DRE/roxP で、reporter gene を FLP/Frp でそれぞれ挟み、loxP 配列を隣接する roxP と Frp 配列の間に挿入したコンストラクトを Tol2 ベクターに挿入した。Tg ベースの

遺伝子導入にはこのベクターをそのまま用いた。ES ベースの標的組換えを用いた遺伝子導入に先行して Tg ベースでのモデル動物作製を行ったところ、多くの遺伝子導入マウスで、位置効果 (position effect) と考えられる reporter gene の発現不安定性が観察された。Tol2 の local hopping 後に position effect を受けることは非常に実験系に影響するので、導入ベクターにウニ由来 insulator を付加した。その結果、安定発現マウス系統を複数ライン作製することが出来た。ES ベースの標的組換えを用いた遺伝子導入用には、更に insulator 付き Tol2 ベクターの両端に相同配列を付加した。当該ベクターを用いて遺伝子導入した組換え ES 細胞をスクリーニングしたところ、複数の陽性細胞を得ることが出来た。本研究における研究代表者の研究機関異動に伴い、マウス移動や異動先での実験系立ち上げ等で研究計画に遅れが生じたが、ベースとなる細胞、遺伝子導入マウスは得ることが出来た。なお、予備的な解析から DRE/roxP、FLP/frp、Cre/loxP システムを作用させる為には HTN-CRE (Kim et al., BBRC, 2009 388; 122-126) の系を応用すること、また最近の CRISPR/Cas9 システムを用いて loxP を目的のマウスゲノム中に挿入することが、本研究課題に効果的であることが確認出来た。

Micro-CT を用いた網羅的表現型解析法の構築では、造影剤にヨウ素、およびリンタンゲステン酸を用いて高速高精細イメージング法を開発した。この開発により、マウス胚の発生段階、具体的には皮膚バリアが成立するか否かで使用する造影剤と固定法を調整しなければならないなど、基本的なデータを取得することが出来た。開発した造影 micro-CT 法を用いて *Rim4* と数種類の KO マウス系統を用いた二重変異体系統を解析した結果、ヒト 4 番染色体長腕部分重複症における心臓中隔欠損、軸前側多指症などの症状は、bHLH 型転写因子 Heart and neural crest derivatives-expressed protein 2 (*Hand2*) 遺伝子の量的効果であることを明らかにすることができ、この成果を Human Molecular Genetics 誌 (2013 22: 2471-2481)、並びに Current Topics in Developmental Biology 誌 (in press) に発表した。

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 5 件)

(1) Tamura M., Amano T. and Shiroishi T. The *Hand2* gene dosage effect in developmental defects and human congenital disorders. *Curr. Top. Dev. Biol.* 2014 in-press (査読有り)

(2) Kono H., Tamura M., Osada N., Suzuki H., Abe K., Moriwaki K., Ohta K. and Shiroishi T. Prdm9 polymorphism unveils mouse evolutionary tracks. *DNA Res.* 2014 in-press (査読有り) PMID: 24505791

(3) Roy S., Liang X., Kitamoto A., Tamura M., Shiroishi T. and Brown MS. Phenotype detection in morphological mutant mice using deformation features. *Med. Image Comput. Comput-Assist. Interv.* 2013 16: 437-444. (査読有り) PMID: 24505791

(4) Tanaka S., Mizushima Y., Kato Y., Tamura M. and Shiroishi T. Functional conservation of *Gsdma* cluster genes specifically duplicated in the mouse genome. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 2013 3(10): 1843-1850. (査読有り) doi: 10.1534/g3.113.007393, PMID: 23979942

(5) Tamura M., Hosoya M., Fujita M., Iida T., Amano T., Maeno A., Kataoka T., Otsuka T., Tanaka S., Tomizawa S. and Shiroishi T. Over-dosage of *Hand2* causes limb and heart defects in human chromosomal disorder, partial trisomy distal 4q. *Hum. Mol. Genet.* 2013 22: 2471-2481. (査読有り) doi: 10.1093/hmg/ddt099, PMID: 23449628

[学会発表](計 8 件)

(国際学会発表 2 件)

(1) Masaru Tamura, Yasuyo Kozawa, Kazuhiro Hirota, Toshihiko Shiroishi, Shigeharu Wakan. X-Ray data (X-ray & micro-CT), International Mouse Phenotyping Consortium Phenotyping Workshop. CNR Headquarters, Rome, Italy, 2013, December 2-4

(2) Masaru Tamura. Introduction of Mouse phenotyping using the Micro Computed Tomography. 2013 Asian Mouse Mutagenesis and Resource Association (AMMRA)/ Asia Mouse Phenotyping Consortium (AMPC) Annual Meeting and Workshop on Mouse Model Research. RIKEN BRC, Tsukuba, Japan 2013, May 18

(国内学会 6 件、招待講演 1 件含む)

(3) 田村 勝, 若菜茂晴, 城石俊彦. マウスモデルを用いたヒト染色体異常疾患の解析: ヒト 4 番染色体長腕部分重複症をモデルとして. 第 61 回実験動物学会総会 2014 年 5 月 15~17 日・札幌コンベンションセンター

(4) 田村 勝. Micro-Computed Tomography (micro-CT) による軟組織高速イメージング. 第 2 回実験動物科学シンポジウム新たなライフサイエンス研究の展開 -鳥類リソースの整備と活用に向けて- 2013 年 12 月 9 日・

名古屋大学（招待講演）

(5) 田村 勝. Micro-Computed Tomography (micro-CT)を用いた軟組織表現型高速イメージング. 日本遺伝学会第 85 回大会 2013 年 9 月 19~21 日・慶応大学

(6) 田村 勝. Micro-Computed Tomography (micro-CT)を用いたマウス形態計測. 第 60 回実験動物学会総会 ワークショップ <次世代マウス表現型解析技術の潮流> 2013 年 5 月 15~17 日・つくば国際会議場

(7) 田村 勝, 城石 俊彦. ヒト 4q-ter に存在する複数遺伝子の量比は、頭蓋顔面骨形成に關与する. 日本遺伝学会第 84 回大会 2012 年 9 月 20~22 日・九州大学

(8) 田村 勝. 組織をみる：古典組織学 VS Micro-Computed Tomography. 第 25 回モロシナス研究会 2012 年 7 月 8~9 日・東京大学

〔図書〕(計 3 件)

(1) 遺伝子図鑑 (国立遺伝学研究所「遺伝子図鑑」編集委員会) 田村 勝. 10-2: 動物の品種改良. p214-215 悠書館 2013 年 10 月

(2) マウス実験の基礎知識 第 2 版 (小出剛編集) 田村 勝. 第 5 章: マウスの解剖について知ろう. p67-78 オーム社 2013 年 6 月

(3) マウス実験の基礎知識 第 2 版 (小出剛編集) 田村 勝, 前野 哲輝, 天野 孝紀. 第 6 章: マウスの胎仔を見てみよう. p79-92 オーム社 2013 年 6 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 勝 (TAMURA, Masaru)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソ
ースセンター・開発研究員

研究者番号：50370119