

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290034

研究課題名(和文) 標的細胞中で発現しない非コードRNA遺伝子をトラップする手法の開発

研究課題名(英文) Development of a gene-trap strategy for the transcriptionally silent genes of non-coding RNAs in the target cells

研究代表者

石田 靖雅 (Ishida, Yasumasa)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

研究者番号：10221756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：欧米では、マウスES細胞中で全てのタンパク質コード遺伝子を挿入型変異導入法により破壊するために、大規模な「ノックアウトマウス・プロジェクト」が推進された。我が国では、ナショナルバイオリソースプロジェクト(文科省)の中で、報告者が開発した遺伝子トラップ法UPATrapの改変が進められた。本研究では、最新型UPATrapに、さらに二つの新しいトラップ技術を導入し、(1)標的細胞中で発現しない、(2)非コードRNA遺伝子を、ランダムに破壊するための手法の樹立を目指した。

研究成果の概要(英文)：In order to inactivate, by insertional mutagenesis, all protein-coding genes in mouse undifferentiated embryonic-stem (ES) cells, the knockout mouse project (KOMP) had been carried out in the USA, Canada, UK, and Germany as a large-scale and international collaborative effort. In Japan, on the other hand, a gene-trapping strategy termed UPATrap, which we had originally developed, was further upgraded in the national bio-resource project (NBRP) of Monka-sho (MEXT). In the current research, we have tried to establish a novel methodology for the random disruption (trapping) of the transcriptionally silent genes of non-coding RNAs in the target cells.

研究分野：マウスの分子遺伝学と免疫学

キーワード：遺伝子トラップ UPATrap 非コードRNA遺伝子 ES細胞 マウス

## 1. 研究開始当初の背景

### マウス・ゲノム科学における世界的潮流

2004年9月、*Nature Genetics* 誌に「ロックアウトマウス・プロジェクト(KOMP)」の概要が発表され、マウスES細胞中の全ての「タンパク質コード遺伝子」を破壊することが提案された。そこでは、ランダムな遺伝子トラップにより、短期間のうちにES細胞中で出来るだけ多数の遺伝子を破壊し、トラップで対処できないものに関しては、DNA相同組換えに基づく遺伝子ターゲティング法により、個別に変異を導入することが計画された。

### ランダムな遺伝子トラップでは非発現遺伝子をカバーできない?

2007年から本格的にスタートしたKOMPでは、今日までに、ランダムな遺伝子トラップによって12万5千株以上もの変異導入ES細胞クローンが産出された(<http://www.genetrap.org>)。しかしながら、2011年夏に報告者のグループが解析したところ、マウスES細胞中で恒常的に発現するタンパク質コード遺伝子の約81%が既にトラップされているのに対し、同細胞中で全く発現しないタンパク質コード遺伝子の場合、既にトラップされたものの割合は、わずか22%に過ぎないことが判明した(Mayasariら、*Nucleic Acids Res.* Vol. 40, e97, 2012)。

### トラップできない「タンパク質コード遺伝子」を厳選した上で、個別にターゲットする

このように、欧米では、マウスES細胞中で発現しない遺伝子のトラップが順調に進まなかったため、トラップするのが難しいタンパク質コード遺伝子を厳選した上で、相同組換えに基づく遺伝子ターゲティング法により、個別に破壊するストラテジーが採用された(*Nature* Vol. 474, 337-342, 2011)。遺伝子ターゲティングのために必要な時間と労力を考えた場合、タンパク質コード能力が証明されていない、おびただしい数の long non-coding RNA (lncRNA) 遺伝子にまで破壊の対象を広げることが、到底できなかったのである。

### 二つの遺伝子トラップ法: プロモータートラップとポリAトラップ

では何故、遺伝子トラップでは、標的細胞中で発現しない遺伝子を破壊することが難しいのか? 遺伝子トラップは、プロモータートラップ法とポリAトラップ法の二つに大別される。このうち、前者の有効性は確立しており、既に多くの研究に応用されているものの、「標的細胞中で発現しない遺伝子はトラップすることができない」という性質を持つ。これに対しポリAトラップ法には、「標的細胞中での発現の有無にかかわらず遺伝子を捕捉できる」という大きなメリットがあるはずだが……。

### 従来のポリAトラップ法の限界

1990年代からポリAトラップの改良に取り組んで来た報告者は、従来の手法では、ベクターが遺

伝子の最も3側の「最後のイントロン」に挿入されたES細胞クローンのみが選択的に単離されてしまう、という憂慮すべき事実を見出した。ベクターが最後のイントロンに挿入された場合、トラップにより引き起こされる遺伝子欠損の領域は非常に小さくなってしまったため、遺伝子機能が完全に破壊されない可能性が高くなる。

### 新しいポリAトラップ法「UPATrap」の開発

2005年、報告者は、ベクター挿入部位に関するこの驚くべき「偏り」は、nonsense-mediated mRNA decay (NMD) と呼ばれる mRNA サーベランス機構によって引き起こされる、という事実を発見した(重岡ら、*Nucleic Acids Res.* Vol. 33, e20, 2005)。さらに報告者は、NMDの影響を完全に排除した新しいポリAトラップ法 UPATrap の開発にも成功した。この新手法の創出により、ベクター挿入部位の「偏り」が皆無の状態でもポリAトラップを実施することが初めて可能となった(重岡ら、同論文)。

### UPATrap法と我が国のナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)

H19-20年度とH22-23年度の2度にわたり、報告者は文科省NBRPから支援を受け、UPATrap法の大幅な改造を実施した。その結果、コンディショナルな(組織/時期-特異的な)遺伝子破壊を実行する事が可能になり、さらに最新の *Tol2* DNAトランスポゾン型ベクターでは、初期のレトロウイルス型ベクターの場合と比べ、ES細胞中で発現しない遺伝子をトラップする頻度が約2.4倍上昇した(Mayasariら、*Nucleic Acids Res.* Vol. 40, e97, 2012)。

## 2. 研究の目的

前述のように、欧米のKOMPでは、非発現遺伝子のランダムなトラップが順調に進まなかったため、トラップするのが難しい「タンパク質コード遺伝子」(約8,500個)を厳選した上で、遺伝子ごとに個別のターゲティングが実施された(*Nature* Vol. 474, 337-342, 2011)。しかし、挿入型変異導入の対象細胞は、マウスES細胞(diploid)だけでなく、ラットやヒトのES細胞、iPS細胞、さらにはマウスのhaploid ES細胞などへと急速に拡大しつつある。また、欧米のKOMPで解析対象から除外された non-coding RNAs などの非タンパク質コード遺伝子も、近年その重要性が明らかにされつつある。このような状況下で、新種のミュータジェネシス標的細胞が出現するたびに、時間と労力を要する遺伝子ターゲティングに依存した大規模プロジェクトを立ち上げるのは、非現実的であると言わざるを得ない。

そこで本基盤研究では、NBRPの中で大幅に改良されたコンディショナル UPATrap-*Tol2* ベクター(Mayasariら、*Nucleic Acids Res.* Vol. 40, e97, 2012)に以下の「二つの新機能」を賦与し、遺伝子トラップの弱点を完全に克服することを目指す。

- (1) 標的細胞中で発現しない遺伝子「のみ」を選択的にトラップする機能
- (2) タンパク質コード遺伝子に加え、long non-coding RNA (lncRNA) 遺伝子をもトラップする機能

これらの改変により、我々は、挿入型変異導入の新しい標的細胞(ラットやヒトのES細胞、iPS細胞、マウスのhaploid ES細胞など)が出現した場合でも、時間と労力を要する遺伝子ターゲティングに依存することなく、非常に単純な遺伝子トラップを実行するだけで、大部分の遺伝子(これまではトラップが難しかった非発現遺伝子群や、あまりにも数が多いため、ターゲティングで個別に破壊することが困難だった非コードRNA遺伝子群などを含む)をコンディショナルに破壊することが可能となる。

<結論> 本研究が完成すれば、挿入型変異導入による遺伝子機能の解析が大きく促進され、哺乳動物の分子遺伝学領域における大きな貢献となる。

### 3. 研究の方法

報告者は、NBRP(H22-23年度)の中で、ジフテリア毒素(DT)遺伝子を利用した新しい遺伝子トラップ法「DTrap」の開発に着手した。この手法では、標的細胞中で発現しない遺伝子「のみ」を、ほぼ選択的に同定し破壊することができるが、トラップ効率のさらなる改善が必要である。ベクター挿入部位の著しい偏りを解消するためには、薬剤耐性遺伝子のmRNAがNMDによって分解されることを抑止するUPATrap技術を活用するが、現在の手法では、lncRNA遺伝子をトラップした場合のNMD抑止が不完全となり、結果としてES細胞クローンが得られないことが予想される。そこで本研究では、DTrap法の遺伝子トラップ効率を高め、NMD抑制のための新しいエレメントを導入することにより、標的細胞中で発現しないlncRNA遺伝子のトラップを可能にする手法を開発する。

### 4. 研究成果

報告者らの先行研究で用いたNMD抑制エレメントを改良し(RNAのレベルで形成される高次構造をより強いものにした)、トラップ・ベクター内のNEOの下流に組み込み、マウスES細胞を用いて遺伝子トラップを実施した。その結果、NEO部分とトラップされた遺伝子の融合型mRNAではNMDが回避されていることを確認することができた。さらに、トラップされた遺伝子の中に、従来よりも高頻度にlncRNA遺伝子(候補)が含まれることを確認することができた。平成28年度には、この完成した改良型ベクターを用いて重点的に遺伝子トラップを行い、トラップされたlncRNA遺伝子(候補)の発現パターンを解析した。既知遺伝子とは異なり、本研究で着目するlncRNA遺伝子には、関連するESTが存在しないことも多

いため、米国NCBIのUniGeneデータベースなどを利用して、マウス体内における発現パターンを類推することは、予想通り難しかった。そのため、候補遺伝子ごとにPCR用プライマーを設計してRT-PCRを行い、発現部位を解析する必要があった。トラップされたlncRNA遺伝子(候補)の中には、RNAレベルの発現が確認できないものも存在した。トラップされたlncRNA遺伝子(候補)のうち、免疫系組織(胸腺、脾臓、リンパ節など)や神経系組織(脳や脊髄など)で特異的に発現するものを選別し、定法に従いノックアウトマウスを作製する、という当初の予定であったが、これまでのところ、免疫系組織や神経系組織に高度に局限した発現パターンを示すlncRNA遺伝子(候補)がトラップされたES細胞クローンは樹立されていない。今後はさらに遺伝子トラップ実験を追加して、そのようなES細胞クローンの樹立を目指す必要がある。

本研究では、ジフテリア毒素(DT)遺伝子を利用した新しい遺伝子トラップ法「DTrap」を完成させることができたため、現在、その論文の投稿を準備中である。

### 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 10件)

石田靖雅. PD-1の発見について語るときに私の語ること. 現代化学, 査読なし(東京化学同人) 通巻第551号, pp.24-27 (2017).  
<http://www.tkd-pbl.com/book/b279413.html>

Kotoku, T., Kosaka, K., Nishio, M., Ishida, Y., Kawaichi, M., and Matsuda, E. CIBZ Regulates Mesodermal and Cardiac Differentiation of by Suppressing T and Mesp1 Expression in Mouse Embryonic Stem Cells. Sci. Rep. 査読あり Vol.6, p.34188, (2016).  
DOI: 10.1038/srep34188

石田靖雅. PD-1はこうして発見された. 肝臓膵, 査読なし(アークメディア) Vol.73, pp.317-322 (2016).  
[http://arcmedium.co.jp/publication02.php?a=201609\\_1](http://arcmedium.co.jp/publication02.php?a=201609_1)

工藤正俊, 石田靖雅, 池田公史, 田中真二 (発言順). 座談会: “免疫チェックポイント阻害剤”の基礎から臨床成績および開発動向. 肝臓膵, 査読なし(アークメディア) Vol.73, pp.429-443 (2016).  
[http://arcmedium.co.jp/publication02.php?a=201609\\_1](http://arcmedium.co.jp/publication02.php?a=201609_1)

Nakamura, A., Funaya, H., Uezono, N., Nakashima, K., Ishida, Y., Suzuki, T., Wakana,

S., and Shibata, T. Low-cost three-dimensional gait analysis system for mice with an infrared depth sensor. *Neurosci. Res.* 査読あり Vol.100, pp.55-62 (2015).  
DOI: 10.1016/j.neures.2015.06.006

石田靖雅. PD-1:発見の経緯と研究の歴史. Year Book of RCC 2014, 査読なし (メディカルレビュー社) pp.35-41 (2015).  
<http://www.m-review.co.jp/book/detail/978-4-7792-1393-9>

石田靖雅. PD-1 の発見から治療の標的分子へ. RCC INSIGHT, 査読なし (メディカルレビュー社) 通巻第 4 号, pp.10-11 (2015).

石田靖雅. 新しい癌免疫療法「PD-1 発見の経緯と研究の歴史」 THE LUNG perspectives, 査読なし (メディカルレビュー社) Vol.23, pp.409-413 (2015).  
[http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0013\\_2304](http://www.m-review.co.jp/magazine/detail/J0013_2304)

石田靖雅. 今明かす PD-1 発見の舞台裏. 細胞工学, 査読なし (秀潤社) Vol.33, pp.1038-1041 (2014).  
[https://booklive.jp/product/index/title\\_id/40005728/vol\\_no/003](https://booklive.jp/product/index/title_id/40005728/vol_no/003)

Fujita, S., Pytela, J., Hotta, T., Kato, T., Hamada, T., Akamatsu, R., Ishida, Y., Kutsuna, N., Hasezawa, S., Nomura, Y., Nakagami, H., and Hashimoto, T. An atypical tubulin kinase mediates stress-induced microtubule depolymerization in *Arabidopsis*. *Current Biol.* 査読あり Vol.23, pp.1969-1978 (2013).  
DOI: 10.1016/j.cub.2013.08.006

〔学会発表〕(計 2 件)

石田靖雅 (招待講演). PD-1 とがん、そして自己と非自己の識別. 第 104 回日本肺癌学会関西支部学術集会、薬業年金会館(大阪府、大阪市) (2016 年 07 月 16 日).

石田靖雅 (招待講演). Gene discovery in haploid ES cells. 第 66 回日本細胞生物学会年会(テクニカルシンポジウム「革新的なゲノム編集技術とハプロイド細胞の利用」)、奈良春日野国際フォーラム(奈良県、奈良市) (2014 年 6 月 11 日).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：

権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://bsw3.naist.jp/ishida/>

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

石田 靖雅 (ISHIDA, Yasumasa)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授  
研究者番号:10221756

### (2) 研究分担者 ( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者 ( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者 ( )