

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20300142

研究課題名(和文) トランスポゾンシステムを用いた医学・生物学研究ツールとしてのラットリソースの構築

研究課題名(英文) Rat research resource for biomedical science generated by *Sleeping Beauty* transposon system

研究代表者

北田 一博 (KITADA KAZUHIRO)

北海道大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：70263093

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、*Sleeping Beauty* (SB) と呼ばれる哺乳類でも機能するトランスポゾンシステムをラットにおいて確立した成果を基に、網羅的にラットで挿入突然変異を惹起してリソースを構築するための基礎データを得ることである。結果的に、SB トランスポザーゼのトランスジェニックラット (tg) と転写単位トラップベクターの tg との雄のダブル tg から産子を得て、3日齢で GFP 陽性個体を選抜、離乳後に耳介から RNA を抽出し 3' RACE 法で挿入部位を同定するプロトコルが確立できた。マウスと比較して表現型の解析がしやすいラットにおいて null mutation のリソースを構築することは、マウスでできなかったことをラットにより可能となり、広い範囲のバイオメディカルサイエンスの領域を活性化させることにつながる。

研究成果の概要(英文)：*Sleeping Beauty* (SB) transposon is known to be functional in mammalian species. Aim of this study is obtaining fundamental information of SB transposon system for future random-insertional-mutagenesis in the rat. We established the optimized protocol for generation of insertional mutant rat resource. SB transposon system established in this study would lead to activation of variety fields of biomedical science, based on advantages of the rat as an excellent experimental animal.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2010年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
年度			
年度			
総計	15,200,000	4,560,000	19,760,000

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：トランスポゾン、ラット、疾患モデル、リソース

## 1. 研究開始当初の背景

現在、欧米を中心に国際的にノックアウトマウスプロジェクトが進行中である。一方、マウスの約10倍の大きさを持ち実験動物

として重要な位置を占めるラットについても同様にノックアウトラットリソースが切望されるにはあるが、まだ開始はされていない。一方、本邦のナショナルバイオリ

ソースプロジェクトにより貴重な自然発症のミュータントラット等のリソースが充実しつつある。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*Sleeping Beauty* (SB) と呼ばれる哺乳類でも機能するトランスポゾンシステムをラットにおいて確立した成果を基に、網羅的にラットで挿入突然変異を惹起してリソースを構築するための基礎データを得ることである。具体的には、(1) 挿入突然変異効率や挿入部位決定効率などの情報を得るとともに、将来のトランスポゾンを用いたランダムミュータジェネシスのためのプロトコルを確立する。また、(2) 実際に得られた遺伝子トラップラット系統について、疾患モデル動物としての有用性を確認する。

## 3. 研究の方法

(1) 繁殖計画とスクリーニング：トランスポザーゼ遺伝子を持つトランスジェニックラットとトラッピングベクターを持つトランスジェニックラットを交配させて、繁殖用の雄のダブルトランスジェニックラットを作出した。ダブルトランスジェニックラットの生殖系列を含むすべての細胞で、トランスポジションがおきる。雄 1 匹に対して Slc:Wistar/ST 雌 2 匹を同居させて、約 3 週間に一度出産させた。生まれた直後の新生児の中から、全身に GFP を発現する個体のスクリーニングを行った。

(2) 3' RACE 法とシーケンシング：離乳後の GFP 陽性個体の耳介から常法にて RNA を抽出逆転写反応を行い、GFP のプライマーを用いた 3' RACE 法を実施した。その後、産物の TA クローニングを行い、最終的にシーケンスによって、どの転写単位がトラップされているかを確認した。

(3) ジストロフィン遺伝子トラップ系統およびフィブリリン遺伝子トラップ系統の疾患モデルとしての有用性：ジストロフィン遺伝子トラップ系統については、3 週齢、6 週齢、9 週齢の雄ヘミ個体で、腓腹筋、横隔膜、心筋を採取し病理組織学的観察を行うとともに、血液中のクレアチンホスホキナーゼ (CPK) を測定した。フィブリリン遺伝子トラップ系統については、出生直後のホモ個体の剖検を実施して病理学的観察を行うとともに、経時的な累積死亡率を検討した。

## 4. 研究成果

(1) プロトコルの確立：繁殖用の雄のダブルトランスジェニックラットから作出された産子について、1 日齢、2 日齢、3 日齢、4

日齢、5 日齢と同一個体を経時的に観察した。1 日齢から 3 日齢にかけて GFP の強度が増加する傾向が観察された。一方、4 日齢以降では非特異的な蛍光が増加する傾向が観察された。そこで、GFP 陽性のスクリーニングは 3 日齢で行うことを決定した。続いて、3' RACE 後のシーケンスについて、ダイレクトシーケンスと TA クローニング後のシーケンスのどちらが効率的か、また後者がより効率的ならば、いかほどのクローンをシーケンスすればよいかを検討した。その結果、TA クローニング後のシーケンスの方が挿入部位決定効率が良いこと、3' RACE で複数のバンドが得られている例でも 16 クローン程度をピックアップすれば、まず異なるインサートを持つクローンが得られることが判明した。最終的に、インサートサイズが大きい順に 2 つのクローンを選抜してシーケンスを行うこと、もし両者ともに GFP のプライマーによる特異的な 3' RACE 産物でなかった場合は、さらに 16 クローンをピックアップしてインサートサイズを決定し、異なるサイズのクローンを 2 つ選択して再度シーケンスを行うこととした。なお、挿入部位決定のステップが最も労力がかかると判断したため、2 ラウンドのシーケンスを失敗した系統についてはそれ以降の解析を行わないこととしたが、cDNA の凍結保存は行うこととした。以上により、SB トランスポザーゼのトランスジェニックラット (tg) と転写単位トラップベクターの tg との雄のダブル tg から産子を得て、3 日齢で GFP 陽性個体を選抜、離乳後に耳介から RNA を抽出し 3' RACE 法で挿入部位を同定する最適化されたプロトコルが確立できた。

(2) 挿入突然変異効率および挿入部位決定効率の検討：前述のプロトコルを用いた場合、ダブルトランスジェニックラットから作出された産子のうち、GFP 陽性の個体は平均 12.8% であり、これまでのプレリミナリーな解析結果と同等の陽性率であった。また、前述のプロトコルを用いた場合、3' RACE 法とシーケンシングを用いた挿入部位決定の成功率については 72.4% であった。なお、挿入部位決定が不成功に終わった一部の系統について GFP の有無を基に継代を行ったところ、メンデル遺伝で次世代に継承可能であったことから、挿入部位決定が不成功であった理由は 3' RACE 法の段階にあり、GFP 陽性であるが転写単位がトラップされていないという可能性は低いと推定された。このような基礎データは、将来のランダムミュータジェネシスに有益な情報を与える。すなわち、10 万のトラップ系統を得るには、約 108 万匹の動物生産を実施すれば良いと考えられる。

(3) ジストロフィン遺伝子トランプ系統およびフィブリリン遺伝子トランプ系統の疾患モデルとしての有用性: ジストロフィン遺伝子トランプ系統については、3週齢、6週齢、9週齢で、腓腹筋、横隔膜、心筋を採取し病理組織学的観察を行ったところ、3週齢では著変が観察されなかったが、6週齢では観察したすべての筋部位において巣状壊死が観察され筋破壊が示唆された。9週齢ではその程度が减弱した。血液中のクレアチンホスホキナーゼ (CPK) を測定したところ、3週齢ではトランプ系統が  $218 \pm 35$  IU/l、正常対照が  $165 \pm 53$  IU/l であり有意差は観察されなかったが、6週齢トランプ個体では  $2701$  IU/l と高い数値を示し、9週齢では  $1204$  IU/l と6週齢に比すると低下した。以上により、Duchenne 型および Becker 型筋ジストロフィーのモデルラットとなり得ること、筋破壊に対する治療効果の判定には、6週齢が適していることが結論付けられた。今後は、6週齢トランプ個体で筋萎縮が観察されるか否かの詳細な検討を続行する。フィブリリン遺伝子のトランプホモ個体は、1日齢から3日齢において大動脈瘤および大動脈解離が観察され、エラスチカ・ワンギーソン染色による組織観察では密に連続して走行すべき弾性繊維が局所的に不連続である像が得られた。また経時的な累積死亡率については、1日齢から死亡例が観察され始め、離乳前の19日齢で全例の死亡が確認された。死亡全例において、胸水の貯留が観察された。以上により、マルファン症候群のモデルラットとなり得ることが示された。

#### 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2件)

- ① Kuramoto T, Kuwamura M, Tokuda S, Izawa T, Nakane Y, Kitada K, Akao M, Guénet JL, Serikawa T. (2011) A Mutation in the Gene Encoding Mitochondrial Mg Channel MRS2 Results in Demyelination in the Rat. PLoS Genet. 7(1):e1001262. 査読あり
- ② Kitada K, Keng VW, Takeda J, Horie K. (2009) Generating mutant rats using the Sleeping Beauty transposon system. Methods. 49(3):236-42. 査読あり

[学会発表] (計4件)

- ① Kitada K, Hayano Y, Yamamoto N. (2010) A Netrin4 insertional-mutation generated by Sleeping Beauty transposon causes an anomaly of thalamocortical axon branching in the

rat. XVIIIth International workshop on genetic systems in the rat. Dec. 2. 2010 in Kyoto, Japan.

- ② 北田一博: トランスポゾンシステムによる新しいモデル動物の作成とその応用, 第32回日本高血圧学会総会, 平成21年10月3日, 大津プリンスホテル (シンポジウム発表)
- ③ 北田一博: 遺伝性疾患モデル動物と Sleeping Beauty トランスポゾンシステム, 第44回高血圧関連疾患モデル学会学術総会, 平成20年11月21-22日, 島根 (シンポジウム発表)
- ④ 北田一博: トランスポゾンシステムを用いたラットにおける網羅的遺伝子破壊と環境ストレス生物学への応用, 高温耐性 FOK ラットシンポジウム 2008, 平成20年8月13日, 名古屋市立大学 (招待講演)

[図書] (計8件)

- ① 北田一博 (2009) マウス・ラットを用いた実験をはじめに於いて (中釜斉/編 北田一博/編 庫本高志/編), 無敵のバイオテクニカルシリーズ「マウス・ラット実験ノート」, 羊土社, 14-31 (ISBN 9784897069265)
- ② 北田一博, 庫本高志 (2009) 研究への応用・手法の紹介: マウス・ラットでできること (中釜斉/編 北田一博/編 庫本高志/編), 無敵のバイオテクニカルシリーズ「マウス・ラット実験ノート」, 羊土社, 119-131 (ISBN 9784897069265)
- ③ 北田一博 (2009) 実験で使われるラットにはどんな種類があるのですか? その起源など教えてください. (中釜斉/編 北田一博/編 城石俊彦/編), 実験法 Q&A シリーズ「マウス・ラットなるほど Q&A」, 羊土社, 47-48 (ISBN 9784758107150)
- ④ 北田一博 (2009) ラットの基本的な特性について教えてください. マウスと異なるのはどのような点ですか? (中釜斉/編 北田一博/編 城石俊彦/編), 実験法 Q&A シリーズ「マウス・ラットなるほど Q&A」, 羊土社, 59-61 (ISBN 9784758107150)
- ⑤ 北田一博 (2009) 取り扱いに際して初心者にはどのような点に注意する必要がありますか? (中釜斉/編 北田一博/編 城石俊彦/編), 実験法 Q&A シリーズ「マウス・ラットなるほど Q&A」, 羊土社, 105-106 (ISBN 9784758107150)
- ⑥ 北田一博 (2009) 実験動物の入手法がわかりません. また, 検疫と検収など規制はあるのですか? (中釜斉/編 北田一博/編 城石俊彦/編), 実験法 Q&A シ

- リーズ「マウス・ラットなるほど Q&A」,  
羊土社, 107-109 (ISBN 9784758107150)
- ⑦ 北田一博(2009) マウスやトランスジェ  
ニック動物などの輸送・運搬方法を教え  
てください。(中釜斉／編 北田一博／  
編 城石俊彦／編), 実験法 Q&A シリー  
ズ「マウス・ラットなるほど Q&A」, 羊  
土社, 110-111 (ISBN 9784758107150)
- ⑧ 北田一博(2009) はじめてでも失敗しな  
い麻酔の方法を教えてください。また,  
実験の種類によって麻酔の方法を使い  
分けることはありますか?(中釜斉／編  
北田一博／編 城石俊彦／編), 実験法  
Q&A シリーズ「マウス・ラットなるほど  
Q&A」, 羊土社, 112-113 (ISBN  
9784758107150)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

北田 一博 (KITADA KAZUHIRO)  
北海道大学・大学院理学研究院・准教授  
研究者番号: 70263093

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし