

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5日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成22年度～平成24年度

課題番号：22500384

研究課題名（和文）部位特異的組換え酵素群を駆使した、マウス生体における多段階遺伝子発現制御法の確立

研究課題名（英文）Generation of multi-step, site-specific recombination system in vivo

研究代表者

市瀬 広武（ICHISE HIROTAKE）

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10313090

研究成果の概要（和文）：

発生、発がんなどの研究分野において、複数の遺伝子の発現を時期・組織を変えて人為的に制御する実験系の確立が望まれている。本研究では、Cre/loxP 遺伝子組換えに依存して H-Ras および EGFP を広範囲の組織で発現する CGH4 遺伝子導入マウス (Ichise et al., 2010) の導入遺伝子組込み部位を同定し、当該遺伝子座を標的とした遺伝子改変システムを作出した。既存の Rosa26 遺伝子座改変システムとの併用が可能であり、複数の配列特異的遺伝子組換え酵素を利用した遺伝子発現制御に有効である。

研究成果の概要（英文）：

We identified the transgene integration site of the CGH4 transgenic mice that conditionally express H-Ras and EGFP in a variety of tissues in a Cre/loxP recombination-dependent manner (Ichise et al., 2010), generated new mouse lines using targeting vectors for the locus, and found that the locus is suitable for site-specific recombinase-mediated, binary expression of transgenes in an endothelial cell lineage. Targeted transgenesis and binary expression system using the locus in combination with the Rosa26 locus will be valuable for developing multi-step, site-specific recombination system in vivo.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
H22 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
H23 年度	800,000	240,000	1,040,000
H24 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

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：Cre/loxP；FLP/FRT；Dre/rox；部位特異的組換え酵素；マウス

1. 研究開始当初の背景

部位特異的組換え酵素とその標的配列で構成される Cre/loxP システムは、マウスにお

ける時期・組織特異的遺伝子発現制御技術の中心的な役割を果たしている。当該システムを利用した、**floxed** アリルを有する遺伝子改変マウスの系統数は増加の一途をたどっており、特に、近年の国外における遺伝子改変マウス作出プロジェクト、米国の **KOMP**、カナダの **NorCOMM** やヨーロッパの **EUCOMM** が、**floxed** アリルを有する遺伝子改変マウスの作出を主たる目的としていることから、今後の爆発的な系統数の増加は確実である。

しかし、遺伝子改変マウスの低コスト・労力軽減による効率的な作出と共有化が望まれている一方で、経時的に蓄積する複数のがん遺伝子およびがん抑制遺伝子の変異によって引き起こされる、ヒト腫瘍を模倣した発癌モデルの構築や、遺伝子欠損の影響を、他の遺伝子の欠損あるいは過剰発現によって回避、緩和あるいは増強できるかといった、遺伝子間相互作用の解析、同一個体の2種類の組織での2遺伝子の遺伝子改変による組織・細胞間相互作用の解析などを成立させるための、従来よりも高度な遺伝子発現制御系の確立も研究現場で望まれるようになってきており、**Cre/loxP** システムに加え、他の部位特異的組換え酵素とその標的配列を効果的に利用するための環境を整える必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、**Cre/loxP** システムを利用したマウスでの時期・組織特異的遺伝子改変技術に加え、新規に開発された部位特異的組換え酵素とその標的配列である **Dre/rox** システム、組換え効率の向上化が進められている **FLP/FRT** システムをさらに組み合わせることで、マウス生体での高度な遺伝子改変を行う技術基盤の確立を目的とした。

3. 研究の方法

Rosa26 遺伝子座への CAG プロモーター支配下のトランスジーンを導入と比較して、血球、内皮細胞において遜色のない発現が認められ、その有用性が期待される、既存の導入遺伝子組込み遺伝子座、CGH4 遺伝子座 (Ichise et al., 2010) を、Fosmid ゲノム DNA ライブラリーの作成およびスクリーニングによってクローン化した。当該クローンを利用して、ターゲティングベクターを構築し、レポーター遺伝子やマウス cDNA をコンディショナルに発現する遺伝子導入マウスを作成し、発現パターンや実用性に関する検討を行なった。また、Dre/rox および FLP/FRT 遺伝子組換えのインディケーターとなるコンストラクト

を標的遺伝子組換えで導入した ES 細胞を単離し、組換えの検討を行なった。

4. 研究成果

(1) CGH4 遺伝子座 (Ichise et al., 2010) の同定、クローニングに成功した。

(2) 相同組換えのネガティブセレクションマーカーである DT-A 発現ユニットの改良を行った。CGH4 遺伝子座と改良型 DT-A カセットを利用して、Cre インディケーターとなるレポーターコンストラクトの導入を行い、高効率で相同組換え体が得られることを確認した。また、当該領域に対する ES 細胞での相同組換えにより、Cre インディケーターとなるレポーターコンストラクトを導入したマウスを作成した。そして、内皮細胞系列で Cre を発現する遺伝子導入マウスとの組み合わせによって、内皮細胞系列でのレポーター遺伝子の発現誘導が起こることを確認した。

(3) Dre/rox および FLP/FRT 遺伝子組換えのインディケーターマウスの作成を目的として、既存のレポーターコンストラクトにおける loxP-neoR-BGHpA-loxP 領域を rox-neoR-BGHpA-rox あるいは FRT-neoR-BGHpA-FRT に置換したターゲティングベクターを作成し、それらのコンストラクトを導入した ES 細胞株を得た。当該細胞株と、Dre および FLP の発現ベクターを用いて、配列特異的組換えおよびレポーター遺伝子の発現誘導が可能であることを確認した。

(4) CGH4 遺伝子座を利用して、解析対象とする野生型あるいは変異型タンパク質をコードする cDNA および IRES 配列支配下にあるレポーター遺伝子の発現誘導が可能なコンストラクトを相同組換えによって導入した ES 細胞クローン4種類を得た。それらのクローンを用いてマウス4系統を作出し、Cre ドライバーマウスとの交配によって cDNA およびレポーター遺伝子の発現を誘導した。発現誘導を行なった4種類の野生型あるいは変異型タンパク質の発現パターンをそろえることで、タンパク質間での機能的差異の比較、検討を成功裡に進めることができることを確認した。

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8件)

①

Ichise, T., Yoshida, N., Ichise, H.

Ras/MAPK Signaling Modulates VEGFR-3 Expression through Ets-Mediated p300 Recruitment and Histone Acetylation on the Vegfr3 Gene in Lymphatic Endothelial Cells.

PLoS One. 7:e51639, 2012

10.1371/journal.pone.0051639

②

Osada, M., Inoue, O., Ding, G., Shirai, T., Ichise, H., Hirayama, K., Takano, K., Yatomi, Y., Hirashima, M., Fujii, H., Suzuki-Inoue, K., Ozaki, Y.

Platelet activation receptor CLEC-2 regulates blood/lymphatic vessel separation by inhibiting proliferation, migration, and tube formation of lymphatic endothelial cells.

The Journal of biological chemistry. 287:22241-22252, 2012

10.1074/jbc.M111.329987

③

Shibasaki, T., Tokunaga, A., Sakamoto, R., Sagara, H., Noguchi, S., Sasaoka, T., Yoshida, N.

PTB Deficiency Causes the Loss of Adherens Junctions in the Dorsal Telencephalon and Leads to Lethal Hydrocephalus.

Cerebral cortex.

Epub ahead of print, Jun 15, 2012

10.1093/cercor/bhs161

④

Ohno, S., Shibayama, M., Sato, M., Tokunaga, A., Yoshida, N.

Polypyrimidine tract-binding protein regulates the cell cycle through IRES-dependent translation of CDK11(p58) in mouse embryonic stem cells.

Cell Cycle. 10, 3706-3713, 2011

10.4161/cc.10.21.17903

⑤

Fukuda, T., Tokunaga, A., Sakamoto, R., Yoshida, N.

Fbxl10/Kdm2b deficiency accelerates neural progenitor cell death and leads to exencephaly.

Molecular and cellular neurosciences. 46, 614-624, 2011

10.1016/j.mcn.2011.01.001

⑥

Funato, Y., Terabayashi, T., Sakamoto, R., Okuzaki, D., Ichise, H., Nojima, H.,

Yoshida, N., Miki, H.

Nucleoredoxin sustains Wnt/ β -catenin signaling by retaining a pool of inactive Dishevelled protein.

Current biology. 20:1945-1952, 2010

10.1016/j.cub.2010.09.065

⑦

Hayashi, T., Funato, Y., Terabayashi, T., Morinaka, A., Sakamoto, R., Ichise, H., Fukuda, H., Yoshida, N., Miki, H.

Nucleoredoxin negatively regulates Toll-like receptor 4 signaling via recruitment of flightless-I to myeloid differentiation primary response gene (88).

The Journal of biological chemistry. 285:18586-18593, 2010

10.1074/jbc.M110.106468

⑧

市瀬 広武

リンパ管新生における Ras の役割

リンパ学 33 2010, 102-106 (査読無)

<http://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ed6lymph&ye=2010&vo=33&issue=2>

[学会発表] (計 4 件)

①

吉田 進昭

「先進的医学研究のための遺伝子改変動物研究コンソーシアムの概要」

第 8 5 回日本生化学会大会フォーラム「わが国における遺伝子改変動物研究コンソーシアムの取組みと現状」

2012 年 12 月 16 日

福岡国際会議場 (福岡)

②

Hirotake Ichise

“A Modulatory Role of Ras in VEGFR-3 Signalling during Normal and Pathological Lymphangiogenesis”

第 3 2 回 日本炎症・再生医学会シンポジウム “Tumor Microenvironment and Inflammation”

2011 年 6 月 2 日

国立京都国際会館 (京都)

(招待講演)

③

市瀬 広武

「リンパ管新生における Ras の役割」

第 34 回日本リンパ学会総会

2010 年 6 月 26 日

東京大学山上会館 (東京)

(招待講演)

④

Hirotake Ichise

“Role of Ras in lymphangiogenesis”

Gordon Research Conference 2010,

“Molecular Mechanisms in Lymphatic

Function & Disease

June 15, 2010

Lucca (Barga), Italy

(招待講演)

[図書] (計 1 件)

①

市瀬 広武 (光嶋 勲 編著)

永井書店

「よくわかるリンパ浮腫のすべて」(分担執筆)

2011 年、213 ページ中 6 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市瀬 広武 (ICHISE HIROTAKE)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：10313090

(2) 研究分担者

市瀬 多恵子 (ICHISE TAEKO)

東京大学・医科学研究所・助教

研究者番号：00396863

吉田 進昭 (YOSHIDA NOBUAKI)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：10250341

(3) 連携研究者

該当なし