

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24年6月5日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22700499

研究課題名（和文） 神経堤細胞選択的遺伝子発現機構を用いた高効率遺伝子ノックイン法の開発

研究課題名（英文） Development of highly effective gene knock-in procedure using neural crest-specific gene expression machinery

研究代表者

佐藤 崇裕 (SATO TAKAHIRO)

京都大学・iPS細胞研究所・特任研究員

研究者番号：10572000

研究成果の概要（和文）：

神経堤細胞における遺伝子発現の責任となるエンハンサー領域と、そこに結合する転写因子を同定するため、エンドセリンA受容体遺伝子プロモーター領域のルシフェラーゼアッセイを行い、転写開始点近傍で2つの転写因子がタンデムに結合する配列約30塩基の重要性が明らかになった。マウス生体内の神経堤細胞ではこのエンハンサー活性のみでは組織特異的高発現が得られず、他の領域との協調が必要であると考えられた。

Cre発現アデノウイルスとノックインベクターを用いた受精卵での遺伝子導入の検討では、lacZ発現アデノウイルスの感染によって高い発現が受精卵で得られたものの、その後の胚発生率に悪影響を及ぼすため、その克服が重要な課題となった。

研究成果の概要（英文）：

To identify the neural crest cell-specific enhancer region as well as transcription factors that bind to the enhancer region, we conducted luciferase assay using several upstream promoter regions on endothelin type-A receptor gene locus. Consequently, we found that about 30 bases as a critical enhancer sequence that consisted of presumable tandem binding sites of two transcription factors. In vivo experiments in transgenic mice exhibited an insufficiency of this enhancer sequence for neural crest cell-specific forced expression of LacZ gene. These results suggest that a possible coordination with other region may be required to proper gene expression in neural crest cells.

Adenoviral transduction in fertilized eggs exhibited toxicity for their later normal development, whereas strong expression of LacZ was observed. Therefore, the important issue of viral toxicity remained to be overcome.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

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：発生工学

1. 研究開始当初の背景

ノックアウトマウスに代表される発生生物学研究は、現在では殆どの生命科学領域において欠かすことの出来ない実験手法の一つとなっている。近年は、Cre-loxP やテトラサイクリン誘導系を用いたコンディショナルノックアウトが主流となっているが、ES 細胞を用いたスクリーニングの煩雑さや生殖細胞系列への移行効率などのハードルは未だに高いのが現状である。我々はこれまで、神経堤細胞による鰓弓・心大血管の形成におけるエンドセリン-1 (ET-1) /エンドセリン A 受容体 (ETAR) シグナル経路の役割と分子機序を明らかにするため、Cre-変異 lox 系を用いたリコンビナーゼ依存性遺伝子交換 (RMCE) によって ETAR 遺伝子座に外来遺伝子を高い効率でノックインできる系を確立した。また、ノックイン遺伝子が頭部神経堤細胞や心筋細胞の一部など、特定の細胞を標的として発現することを示すとともに、G 蛋白結合型受容体として ETAR とエンドセリン B 受容体の機能的差異を明らかにした (Sato T. et al., Development 135:755, 2008)。更に、ET-1 のノックインにより、ET-1 がホメオボックス遺伝子の Dlx5/6 の誘導を介して上顎・下顎領域決定の分子スイッチとして機能することを証明した (Sato T. et al., PNAS 105:18806, 2008)。これらの成果は、神経堤細胞による頭部の領域アイデンティティの決定機構の一端を解明したものであり、脊椎動物の顎の獲得という進化生物学上極めて興味深い課題にも示唆を与える発見となった。

一方でこれらの研究の方法論に関して、以下の問題点、疑問点が生じた。

- (1) ノックイン遺伝子の発現レベルは、導入する遺伝子の種類によっては十分ではない。発現レベルを高めるためにノックインベクターのデザインを改良出来ないだろうか。
- (2) ES 細胞での RMCE によるノックインの効率は、ES 細胞における一般的なジーンターゲットングの際の相同組換え効率に比べてはるかに高いが、ES 細胞を介さず、かつ高効率でノックインマウスを得る方法を開発できないだろうか。

前者に対しては、細胞特異的な ETAR 遺伝子エンハンサーを用いることを考えたが、既報のプロモーター解析からは十分な情報が得られず、新たな解析が必要であることが判明した。

後者については、電気穿孔法やウイルスベクターによる生殖細胞への遺伝子導入の成功例が報告されており、追試によりアデノウイルスベクターによる受精卵への Cre の一過

性高発現が期待できることが判明した。これまで我々は、ノックインプラスミドベクターと、Cre をコードした mRNA を同時に受精卵に注入することで効率は低いながらも RMCE によるノックイン胚の作製に成功しており、ウイルスベクターを用いることで効率を高めることが可能ではないかと考えた。

これらの課題は、本来の発生学研究を更に推進すると同時に、方法論的にも波及効果が大きいと考え、本研究を着想した。

2. 研究の目的

本研究においては、以下の2点を明らかにする。

- (1) ETAR 遺伝子のプロモーター領域を解析することにより、神経堤細胞が神経管から離れて遊走を開始する過程で活性化されるエンハンサー領域と、そこに結合する転写因子を同定する。これにより、神経堤細胞選択的な遺伝子発現制御機構を明らかにするとともに、このエンハンサー領域をノックインベクターに組み込むことにより、遺伝子発現レベルの増強を試みる。
- (2) Cre 発現アデノウイルスベクターの感染とノックインベクターの注入によって受精卵で相同組み換えを効率よく起こす条件を明らかにする。これにより、ES 細胞を介さないノックイン法として、受精卵での RMCE を介した遺伝子ノックインの手法を確立する。

3. 研究の方法

(1) ルシフェラーゼアッセイによる ETAR 遺伝子プロモーター領域の解析およびマウス胚におけるエンハンサー活性の解析

ETAR 遺伝子プロモーター領域約 2kb を GFP に結合したマウス胚で、神経堤細胞に発現する結果を既に得ている。また、転写開始配列近傍に位置し、種を越えて良く保存された領域に高いエンハンサー活性が認められることも、ETAR を発現する NIH 3T3 細胞を用いた予備実験で確認している。これらをもとに、エンハンサー領域のコア配列を絞り込み、その変異配列とともに SV40 基本プロモーターに結合して活性を確認する。このコア配列を単独またはタンデムに結合したものを lacZ 遺伝子上流に組み込み、受精卵前核に注入することによって lacZ トランスジェニックマウスを作製する。卵管移植後胎生 9~10 日相当で取り出し、lacZ 陽性細胞の分布とシグナル強度を解析する。

(2) エンハンサー配列のノックインベクターへの組み込みによる遺伝子発現レベル変

化の解析

(1) で確認したエンハンサー配列を lacZ 遺伝子とともにレポーター遺伝子として 2 つの変異 lox(lox66, lox2272) で挟み込むことによってノックインベクターを作製し、これを用いた RMCE によって得られたノックインマウスの lacZ 陽性細胞の分布とシグナル強度を既報の ETAR-lacZ ノックインマウス (Sato T. et al, Development 135:755, 2008) と比較する。エンハンサー活性がうまく働かない場合の対策としては、ノックインベクターに含まれる puromycin 耐性遺伝子を Flp-FRT 系で除くこと、エンハンサー領域とノックインするエクソン領域の位置関係を変えてみるなどが考えられる。

(3) Cre 発現アデノウイルスとノックインベクターを用いた受精卵での遺伝子導入の検討

lacZ 発現アデノウイルスを用いた予備実験において、受精卵へのアデノウイルスベクターの導入によって高い lacZ 発現が可能であることがわかっている。本研究では Cre が働くことによって lacZ が発現する ROSA-lacZ マウスの受精卵に対して Cre 発現アデノウイルスの感染を行い、ウイルス力価や感染のタイミングと相同組み換えの効率、胚発生への影響などとの関係を検討する。次に、RMCE によって ETA 遺伝子座での相同組み換えが可能な ETAR-neo マウス (既報) 由来の受精卵前核に lacZ 遺伝子ノックインベクター (プラスミド) を注入するとともに Cre 発現アデノウイルスを感染させ、RMCE による相同組み換えの有無とその効率を、胎生 9~10 日で lacZ 染色により検討する。

4. 研究成果

神経堤細胞における遺伝子発現の責任となるエンハンサー領域と、そこに結合する転写因子を同定するため、ETAR 遺伝子プロモーター領域のルシフェラーゼアッセイを行い、転写開始点近傍で 2 つの転写因子がタンデムに結合する配列約 30 塩基の重要性が明らかになった。生体内の神経堤細胞ではこのエンハンサー活性のみでは組織特異的高発現マウスが得られず、他の領域との協調が必要であると考えられた。

Cre 発現アデノウイルスとノックインベクターを用いた受精卵での遺伝子導入の検討では、lacZ 発現アデノウイルスの感染によって高い発現が受精卵で得られたものの、その後の胚発生率に悪影響を及ぼすため、その克服が重要な課題となった。

一方、RMCE を用いた遺伝子ノックインマウスの解析では、心発生初期における ETAR 発現細胞群を心流入路に生じる一次心臓領域の亜集団として特徴的な動態を示すこと、エンドセリンシグナルが ERK リン酸化や Tbx5

遺伝子発現を促進し心室形成に役割を果たしていることを明らかにした (Asai et al., Development 137:3823, 2010)。また、エンドセリンは神経堤細胞に作用して、大血管のみならず冠動脈の形成にも関与していること、血管形成への関与は顎顔面の形成と異なり、Dlx5/Dlx6 による領域パターンニングには依存しないことを明らかにした。

更に、エンドセリン A 受容体 (ETAR) 遺伝子座に対し RMCE によって LacZ あるいは EGFP を導入し、得られたノックインマウスを用いて ETAR の発現パターンを解析した。腎臓での ETAR 発現はその発生段階において胎齢 12.5 日の尿管芽周辺の間葉領域に認められ、その後主に髄質間質細胞へと発現が広がることが分かった。また、胎児期の発現パターンの特徴として傍糸球体領域および糸球体内メサンギウム細胞での ETAR の強い発現認められた。一方、成体になると間質および糸球体内メサンギウム細胞での ETAR の発現は著しく減少し、一部の間質細胞や血管平滑筋、CD31 陽性で示される傍糸球体領域の血管内皮細胞に局限することが分かった。更に傍糸球体領域の発現について調べたところ、輸入細動脈のレニン産生細胞は ETAR を発現していることが分かった。これらの成果を論文投稿によって公表した (Kitazawa T, Sato T et al., Gene Expr Patterns 11: 371, 2011)。

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 Kitazawa T, Sato T, Nishiyama K, Asai R, Arima Y, Uchijima Y, Kurihara Y, Kurihara H. Identification and developmental analysis of endothelin type-A expressing cells in the mouse kidney. Gene Expr Patterns. 11, 371-7, 2011 査読有
DOI:10.1016/j.gep.2011.04.0001
- ② Asai R, Kurihara Y, Fujisawa K, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Tonami K, Nishiyama K, Uchijima Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. Endothelin receptor type A expression defines a distinct cardiac subdomain within the heart field and is later implicated in chamber myocardium formation. Development. 137, 3823-33, 2010 査読有
DOI:10.1242/dev.054015

[学会発表] (計 7 件)

- ① Kitazawa T, Fujisawa K, Kurihara Y,

- Arima Y, Kawamura Y, Sato T, Uchijima Y, Kurihara H. Hox gene Function and possible crosstalk with Dlx genes in craniofacial morphogenesis. The 34th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, 2011. 12. 13, Yohohama
- ② Kim KS, Arima Y, Asai R, Sato T, Nishiyama K, Kurihara H. Endothelin-1/Endothelin type-A receptor signaling regulates pharyngeal arch artery development through Dlx5/6-independent pathway. The 19th Annual Meeting of the Japanese Vascular Biology and Medicine Organization/ The 1st Asia-Pacific Vascular Biology Meeting, 2011. 12. 10, Tokyo
- ③ Kurihara Y, Uchijima Y, Fujisawa K, Sato T, Kushiyama S, Asai R, Kitazawa T, Nishiyama K, Kurihara H. Involvement of non-coding RNA in the Endothelin signaling in branchal arch development. BMB2010, 2010. 12. 8, Kobe
- ④ Uchijima Y, Kurihara Y, Sato T, Fujisawa K, Kushiyama S, Kurihara H. Transcription regulation of non-coding RNA Evf-2 in the Endothelin-1/Dlx5/Dlx6 pathway. BMB2010, 2010. 12. 8, Kobe
- ⑤ Asai R, Kurihara Y, Fujisawa K, Sato T, Kawamura Y, Kokubo H, Tonami K, Nishiyama K, Uchijima Y, Miyagawa-Tomita S, Kurihara H. Endothelin type-A receptor expression defines a distinct subpopulation within the first heart field contributing to chamber myocardium. BMB2010, 2010. 12. 10, Kobe
- ⑥ Sato T, Kurihara Y, Asai R, Kawamura Y, Tonami K, Uchijima Y, Heude E, Ekker M, Levi G, Kurihara H. Involvement of the endothelin-1/endothelin receptor type-A signaling in determination of the mandibular identity in mouse craniofacial development. Gordon Research Conference: Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration, 2010. 4. 11-16, Lucca (Barga), Italy
- ⑦ Kurihara Y, Uchijima Y, Fujisawa K, Sato T, Kushiyama S, Asai R, Kitazawa

T, Nishiyama K, Kurihara H. Non-coding RNA regulation of endothelin signaling in branchal arch development. Gordon Research Conference: Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration, 2010. 4. 11-16, Lucca (Barga), Italy

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 崇裕 (SATO TAKAHIRO)

京都大学・iPS 細胞研究所・特任研究員

研究者番号：10572000