

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23300159

研究課題名(和文)可変型遺伝子トラップクローンを利用したCre-driverマウスの作製

研究課題名(英文)Establishment of Cre-driver mouse lines by using the Exchangeable Gene Trap Clones.

研究代表者

荒木 正健 (Araki, Masatake)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授

研究者番号：80271609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,600,000円、(間接経費) 4,680,000円

研究成果の概要(和文)： 条件的遺伝子破壊に必須のCre driverマウスを大量に作製した。50種類のCre driver ES細胞株(全203クローン)からキメラマウスを作製し、50種類全てをカバーする93クローンについてマウスラインを樹立した。79種類のCre driverマウスを熊本CARDに、51種類のCre driverマウスを理研BRCに寄託した。SACreをノックインした34クローンについて、レポーターマウスであるROSA26Rと交配して得た産仔のX-gal染色を行った。21-T188SACreは、小脳特異的な染色パターンを示した。同様に、mERT2をノックインした25クローンの解析を行った。

研究成果の概要(英文)： Gene targeting in embryonic stem cells has become the principal technology for manipulation of the mouse genome, most protein coding genes are producing conditional knock out allele. However a variety of Cre driver mouse line, which has an important role about conditional knock out system, is not enough.

We have developed Database for the Exchangeable Gene Trap Clones; EGTC (<http://egtc.jp>). In our system, reporter beta-geo gene can be exchanged into any other DNA of interest through Cre-mediated recombination. We have produced more than 300 Cre driver ES cell lines using EGTC ES cells. Among them, about 250 clones were provided to make chimeric mice, and more than 100 mouse lines could be established. Then we did mating of Cre driver mice with ROSA26R mice, and performed X-gal staining of ROSA26R mice with Cre driver allele. Among them, 21-T188SACre mouse line exhibited the cerebellum specific expression pattern.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学

キーワード：遺伝子 バイオリソース 遺伝子改変マウス Cre-driver X-gal染色 国際情報交換 多国籍

1. 研究開始当初の背景

遺伝子の機能解析を行う上で、その遺伝子のみを破壊するノックアウトマウスは強力なツールである。さらに、コンディショナル・ノックアウトシステムが盛んに用いられる様になった。

ここで重要な役割を演じるのが時期特異的、組織特異的に Cre が発現する Cre-driver マウスであるが、その整備はまだ進んでいない。我々は、レポーター遺伝子を任意の遺伝子に交換する事が出来る『可変型遺伝子トラップ法』を開発し、データベース『EGTC』(Data base for the Exchangeable Gene Trap Clones) を全世界に公開している。

この可変型遺伝子トラップクローンを利用する事で、比較的容易に Cre-driver マウスを作製する事が可能である。そこで、理化学研究所バイオリソースセンター(理研BRC)の試験研究『条件的遺伝子破壊に必須の Cre-driver マウスの開発』(H19-20 年度)において、可変型遺伝子トラップクローンに Cre 遺伝子をノックインし、Cre-driver ES 細胞株を78 種類作製した。そのうち3ラインに関しては、ES 細胞を用いてキメラマウスを作製した後、レポーターマウスである ROSA26R マウスと交配し、得られた12.5 日胚及び産仔のX-gal 染色によりCre 酵素活性の確認を行った。その後BRC において Cre-driver ES 細胞株6 種類からキメラマウス作製を行い、5 種類のCre-driver マウスラインを樹立し、Cre 酵素活性の確認を行っている。

また、基盤研究(B)『目的の部位で発現させることが出来るプロモータートラップマウスのライブラリー構築』(H20-22 年度)において、X-gal 染色によるレポーター遺伝子の発現パターンは、EST Profile の情報と一致しないことが明らかとなった。従って、ノックインした Cre 遺伝子の発現についても、その組織特異性を実際に調べる必要がある。

2. 研究の目的

本研究は、可変型遺伝子トラップクローンを利用してCre-driver マウスを作製し、レポーターマウスである ROSA26R マウスと交配して得られた産仔のX-gal 染色を行い、その情報を新たなデータベースとして全世界に公開する事を目的としている。

3. 研究の方法

基盤研究(B)「目的の部位で発現させることが出来るプロモータートラップマウスのライブラリー構築」(H20-22)で行った可変型遺伝子トラップクローンのX-gal 染色作業を継続し、結果を EGTC で公開する。

興味深い染色パターンを示したトラップクローンのレポーター遺伝子をCre 遺伝子に置換して、Cre-driver ES 細胞を作製する。ノックインベクターとして、核移行シグナルを付加したCre遺伝子(NCre)をスプライスアクセプターの下流に配置した「SACre」を作製した。EGTCクローンのレポーター遺伝子と置換することで、トラップした遺伝子のプロモーターの直下にCre遺伝子をノックインする。

また、時期特異的にコンディショナルノックアウトを行うためにestrogen receptor ligand-binding domain containing T2 mutation (ERT2)をCre遺伝子に付加した「mERT2」を作製し、同様にEGTCクローンのプロモーター直下にノックインする。

新たに作製した Cre-driver ES 細胞及び理研 BRC の試験研究で作製したCre-driver ES 細胞からキメラマウスを作製し、マウスラインを樹立する。

新たに作製した Cre-driver ES 細胞株及びマウスラインは、熊本大学 CARD 及び理研 BRC に順次寄託する。また、Cre-driver マウスを ROSA26R マウスと交配し、得られた産仔の各種組織のX-gal 染色を行う。脳については、1 ミリ厚連続切片のX-gal 染色も行う。

さらに理研 BRC において、Cre-driver ES 細胞及びマウスラインに関する新たなデータベースを構築し、全世界に公開する。

4. 研究成果

1) EGTC データベースの整備を進めた。平成26年3月末現在、EGTCに登録しているES細胞株は1,266クローンであり、そのうち468クローンに関してマウスラインを樹立し、CARD R-BASE に寄託している。さらに116クローンについては、X-gal 染色像を公開している。

2)理研BRCの試験研究で作製したCre-driver ES細胞株の中から10種類を選択し熊本大学においてキメラマウスを作製した。Fbxo17-SACre, Alad-mERT2, Tspan9-SACre, Gzf1-SACre, Hip1-SACre, Pknx1-SACre, Pkig-mERT2, Wdfy1-mERT2, Mark3-mERT2, Fto-mERT2。得られた雄キメラマウスとC57BL/6N雌マウスを交配し、10種類全てをカバーするマウスラインを樹立することができた。

3)X-gal染色を行ったEGTCクローンの中から興味深い発現パターンを示したクローンを選び、新たなCre-driver ES細胞株を作製した。まず16クローンにSACreをノックインした。21-W126 (Elov16), 21-W377 (Zfp13), 21-W15 (Mett12), 21-W74 (Fkbp4), 21-W60 (Lpp), 21-T242 (Itpk1), 21-T167 (2500002B13Rik),

21-W115 (New), 21-T188 (EST), 21-W203 (New), 21-T34 (EST), 21-W148 (EST), 21-W241 (New), 21-W52 (New), 21-W147 (EST), 21-106 (New)。

次に19クローンを選んでmERT2をノックインした。21-B186 (EST), 21-W377 (Zfp13), 21-W126 (Elavl2), 21-W74 (Fkbp4), 21-W15 (Mettl2), 21-T242 (Itpk1), 21-T167 (2500002B13Rik), 21-W203 (New), 21-T34 (EST), 21-W148 (EST), 21-W241 (New), 21-W321 (1600020E01Rik), 21-W207 (EST), 21-W52 (New), 21-W138 (Ubiad1), 21-W246 (Eif2c1), 21-106 (New), 21-W473 (Slc38a4), 21-W392 (6820431F20Rik)。

4) 50種類の Cre-driver ES 細胞株 (全 203 クローン) を用いてキメラマウス作製を試みた。そのうち 50 種類全てをカバーする 93 クローンについてマウスライン樹立に成功した。

5) 79 種類の Cre driver マウスラインを熊本大学 CARD に寄託した。

6) 51 種類の Cre driver マウスラインを理研 BRC に寄託した。そのうち 3 種類は成体で、48 種類は精子で寄託した。

7) SACre をノックインした 34 クローンについて、レポーターマウスである ROSA26R と交配して得た産仔の X-gal 染色を行った。6 ラインについて胎児期の、28 ラインについてアダルトマウスの各臓器の X-gal 染色を行っている。

胎児期の 6 ラインの中で、5 ラインはユビキタスな発現パターンを示し、1 ラインは全く染まらなかった。試行的に胎児期の X-gal 染色を行ったのだが、胎児期で行う場合、複数のポイントで経時的に見ていく必要があり、かなりの労力を要するため、スクリーニングには適していないと判断し、この後はアダルトマウスの各種臓器の X-gal 染色を行う事にした。

アダルトマウスを解析した 28 ラインの中で、23 ラインがユビキタス、1 ラインが組織特異的な発現パターン、1 ラインがその中間の発現パターンであった。また 3 ラインは全く染まらなかった。

8) Ayu21-W15 は methyltransferase like2 (Mettl2) 遺伝子をトラップしており、脳特異的な染色パターンが得られていた。

しかしながら、この Ayu21-W15 に SACre をノックインした 21-W15SACre と、レポーターマウス ROSA26R を交配して得られた産仔の X-gal 染色を行うと、ユビキタスな染色像が得られた。これは発生初期に Cre が発現した

ことを示唆している。

9) Ayu21-W377 は、zinc finger protein 13 (Zfp13) 遺伝子をトラップしており、雌の腎臓と生殖器だけが発色していた。

この Ayu21-W377 に SACre をノックインした 21-W377SACre と ROSA26R を交配して得られた胎児 (11.5 日胚) の X-gal 染色を行ったところ、ユビキタスな染色像からぼつぼつとまばらに染まる像まで、著しい個体差が観察された。

10) Ayu21-T188 は EST (CJ063182) をトラップしており、小脳だけが発色した。

この Ayu21-T188 に SACre をノックインした 21-T188SACre と ROSA26R を交配して得られた産仔の X-gal 染色において、小脳特異的な発色が観察された (図 1, 図 2)。



図 1

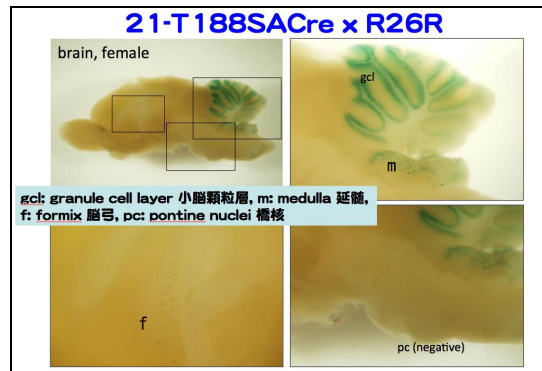


図 2

11) 小脳特異的な発現パターンを示した 21-T188SACre であるが、個体差が見られ、小脳以外にいくつかの臓器 (脳全体、肝臓等) が染色される事もあった。個体数を増やして検討した結果、小脳特異的な発現パターンが観察されたのは、21-T188SACre, 170 において 5 匹中 1 匹、21-T188SACre, 172 において 8 匹中 2 匹であった。合計 13 匹中 3 匹が小脳特異的な発現を示した。

12) 理研 BRC において、21-T188SACre の組織特異的な Cre 組換え酵素の発現解析を行った。レポーターマウスとして ガラクトシラーゼが核内に移行する

B6.129P2-Gt(ROSA)26Sor^{tm1(NLS-lacZ)}/It0 マウスを用いて、特に、脳・神経組織における Cre 発現細胞の検出を試みた。遺伝子型ダブルヘテロ型 (SACre/+; NLS-lacZ/+) の雌 5 匹、雄 6 匹とその対照として野生型マウス雌雄各 2 匹を 8-10 週齢にて解析した。4%パラフォルムアルデヒド灌流固定後に脳、肺、腎、肝、舌、膈等の組織を 1mm 厚切片とし、他は断面切り出しまたはホールにて X-gal 染色 (3 時間) し、後固定後、グリセリンによる透明化処理を行った。

その結果、小脳の顆粒神経細胞に特異的な発現を認めた個体 (A) もあったが、全身でモザイク状の発現パターン (B, C, D) を示す個体もあった (図 3)。

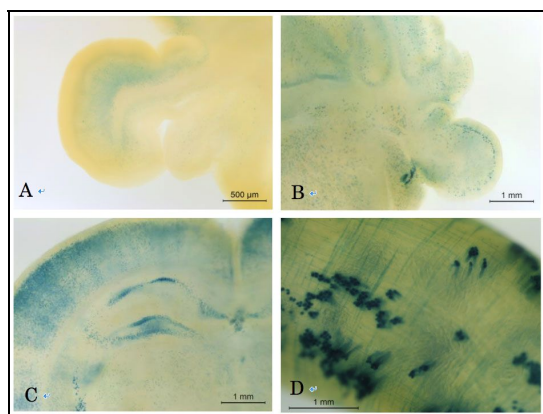


図 3

今後、細胞種特異的な抗体等により Cre 発現の細胞レベルでの同定を進めるとともに、個体による発現パターンの違いを生じる要因を究明することにより開発した Cre マウスの有用性をさらに高めたい。

13) 全身で Cre-mERT2 を発現する Cre driver マウスライン Ayu21-B165CAG-Cre-mERT2 を用いて、タモキシフェン誘導の条件検討を行った。タモキシフェンは、Tamoxifen (T5648 SIGMA) を使用し、20 mg/ml の濃度で corn oil に溶解した。

タモキシフェンの投与方法として腹腔内注射 (i.p.) と経口投与 (p.o.) の比較を行ったところ、i.p.の方が少し強く発色する傾向があったため、以後の実験では i.p.投与を採用した。

タモキシフェンの投与量に関しては、1.0, 1.75 or 2.0 mg / 100 μl corn oil / 10 g body weight の量と、1 回、3 回及び 5 回の投与回数比較を行った。

投与回数については 5 回の方が 3 回及び 1 回よりも強い発色が得られる傾向があったので、5 回に決定した。

しかしながら、投与量に関しては、発色が強くなる高濃度ではタモキシフェンの毒性も強くなり、実験途中で死亡するマウスが多く

なり、投与した 5 匹のマウス全てが死亡する事もあったため、最適濃度の決定には至っていない。タモキシフェンに対する感受性も、マウスの系統差や個体差が大きい様で、まだ最適なプロトコルを確立できていないのが現状である。

従って、まだプレリミナリーなデータではあるが、全 25 マウスラインについて、1 ラインがユビキタス、11 ラインが中間的な発現パターン、4 ラインが組織特異的な発現パターンであった。また 9 ラインは全く染まらなかった。

14) 理研 BRC において、可変型遺伝子トラップクローンを利用して作製した Cre driver マウスラインのデータベース『日本 Cre リソース・発現データベース』(J-CRED; Japan Cre Resource and Expression Database)を開発し、試験公開を開始した。

15) 今後の方針

SACre をノックインしたマウスラインにおいてユビキタスな発現パターンが多く見られたのは、発生初期における発現を反映していると考えられる。従って、mERT2 をノックインする方が、時期特異的というだけでなく、組織特異的な Cre driver としても有用性が高いと予想される。しかしながら、発生初期における発現が無ければ、21-T188SACre の様に組織特異的な発現パターンも期待でき、タモキシフェンの浸透性や毒性を考慮した場合、2 種類とも作製して、実際に比較してみるのがベストであると考えている。

小脳特異的な Cre 遺伝子の発現を示した 21-T188SACre において、個体差が観察された。原因として、使用している ES 細胞 (TT2 由来) が C56BL/6 と CBA の F1 であるため、遺伝的背景が影響している事も考えられる。そこで C57BL/6N へのバッククロスを進めた後、再度実験を行う予定である。

タモキシフェンの投与方法について近年、タモキシフェンを餌に混ぜて食べさせるプロトコルが報告されており、検討を開始した。予備実験において、i.p.と比べて少し発色が弱い傾向もあるが、マウスへのダメージはほとんど無いため、安定した結果が得られると期待している。

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 12 件)

(1) Lu, J., He, L., Behrends, C., Araki, M., Araki, K., Jun Wang, Q., Catanzaro, J. M., Friedman, S. L., Zong, W. X., Fiel, M. I.,

Li, M., Yue, Z., NRBF2 regulates autophagy and prevents liver injury by modulating Atg14L-linked phosphatidylinositol-3 kinase III activity. *Nat. Commun.*, 5, 3920 (2014). 査読有り

(2) Mishima, E., Inoue, C., Saigusa, D., Inoue, R., Ito, K., Suzuki, Y., Jinno, D., Tsukui, Y., Akamatsu, Y., Araki, M., Araki, K., Shimizu, R., Shinke, H., Suzuki, T., Takeuchi, Y., Shima, H., Akiyama, Y., Toyohara, T., Suzuki, C., Saiki, Y., Tominaga, T., Miyagi, S., Kawagishi, N., Soga, T., Ohkubo, T., Yamamura, K., Imai, Y., Masuda, S., Sabbisetti, V., Ichimura, T., Mount, D. B., Bonventre, J. V., Ito, S., Tomioka, Y., Itoh, K., Abe, T., Conformational Change in Transfer RNA Is an Early Indicator of Acute Cellular Damage. *J. Am. Soc. Nephrol.*, (2014). 査読有り

(3) Araki, M., Nakahara, M., Muta, M., Itou, M., Yanai, C., Yamazoe, F., Miyake, M., Morita, A., Araki, M., Okamoto, Y., Nakagata, N., Yoshinobu, K., Yamamura, K., Araki, K., Database for exchangeable gene trap clones: Pathway and gene ontology analysis of exchangeable gene trap clone mouse lines. *Dev. Growth Differ.*, 56, 161-174 (2014). 査読有り

(4) Schneppenheim, J., Huttli, S., Mentrup, T., Lullmann-Rauch, R., Rothaug, M., Engelke, M., Dittmann, K., Dressel, R., Araki, M., Araki, K., Wienands, J., Fluhrer, R., Saftig, P., Schroder, B., The intramembrane proteases Signal-peptide-peptidase-like 2a and b (SPPL2a/b) have distinct functions in vivo. *Mol. Cell. Biol.*, 34 (8), 1398-1411 (2014). 査読有り

(5) Kei Semba, Kimi Araki, Ken-ichirou Matsumoto, Hiroko Suda, Takashi Ando, Akira Sei, Hiroshi Mizuta, Katsumasa Takagi, Mai Nakahara, Mayumi Muta, Gen Yamada, Naomi Nakagata, Aritoshi Iida, Shiro Ikegawa, Yusuke Nakamura, Masatake Araki, Kuniya Abe, Ken-ichi Yamamura, Ectopic Expression of Ptf1a Induces Spinal Defects, Urogenital Defects, and Anorectal Malformations in Danforth's Short Tail Mice. *PLoS Genetics*, 9, e1003204 (2013). 査読有り

(6) Nakahara, M., Tateyama, H., Araki, M., Nakagata, N., Yamamura, K., Araki, K., Gene-trap mutagenesis using Mol/MSM-1 embryonic stem cells from MSM/Ms mice. *Mamm. Genome*, 24, 228-239 (2013). 査読有り

(7) Kappei, D., Butter, F., Benda, C., Scheibe, M., Draskovic, I., Stevance, M., Novo, C. L., Basquin, C., Araki, M., Araki, K., Krastev, D. B., Kittler, R., Jessberger, R., Londono-Vallejo, J. A., Mann, M., Buchholz, F., HOTA1 is a mammalian direct telomere repeat-binding protein contributing to telomerase recruitment. *EMBO J.*, 32, 1682-1701 (2013). 査読有り

(8) Cid, L. P., Roa-Rojas, H. A., Niemeyer, M. I., Gonzalez, W., Araki, M., Araki, K., Sepulveda, F. V., TASK-2: a K2P K(+) channel with complex regulation and diverse physiological functions. *Front. Physiol.*, 4, 198 (2013). 査読有り

(9) Nam, G., Lee, Y. K., Lee, H. Y., Ma, M. J., Araki, M., Araki, K., Lee, S., Lee, I. S., Choi, E. Y., Interaction of CD99 with its paralog CD99L2 positively regulates CD99L2 trafficking to cell surfaces. *J. Immunol.*, 191, 5730-5742 (2013). 査読有り

(10) Park H. J., Byun D., Lee A. H., Kim J. H., Ban Y. L., Araki, M., Araki, K., Yamamura, K. I., Kim I., Park S. H., Jung, K. C., **CD99-Dependent Expansion of Myeloid-Derived Suppressor Cells and Attenuation of Graft-Versus-Host Disease.** *Molecules and Cells*, 33, 259-267 (2012). 査読有り

(11) Kim, H. R., Leon, B. H., Im S. H., Araki, M., Araki, K., Yamamura, K. I., Choi S. C., Park D. S., Jun, C. D., **IGSF4 is a novel TCR zeta-chain-interacting protein that enhances TCR-mediated signaling.** *J. Exp. Med.*, 208, 2545-2560 (2011). 査読有り

(12) Kim, Y. D., Lee, J. Y., Oh, K. M., Araki, M., Araki, K., Yamamura, K., Jun, C. D., NSrp70 is a novel nuclear speckle-related protein that modulates alternative pre-mRNA splicing in vivo. *Nucleic Acids Res.*, 39 (10), 4300-4314 (2011). 査読有り

〔学会発表〕(10件)

(1) 吉信公美子。来海葉子、慶田貴子、古閑成美、中原舞、山村研一、荒木喜美、荒木正

健：「可変型遺伝子トラップクローンの進展」第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、神戸。

(2) 荒木喜美、森田彩香、宮家幹子、吉信公美子、来海葉子、古閑成美、中瀧直己、村上亜弓、門田雅世、目加田和之、吉木淳、荒木正健：「可変型遺伝子トラップクローンを利用したCre-driverマウスの作製」第60回日本実験動物学会総会、2013年5月15日～17日、つくば。

(3) 吉信公美子、来海葉子、慶田貴子、古閑成美、中原舞、荒木喜美、山村研一、荒木正健：「未知遺伝子をトラップした可変型遺伝子トラップマウスラインの解析」第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡。

(4) 荒木喜美、中原舞、牟田真由美、荒木正健、山村研一：「単独では高寄与率のキメラを得ることが困難なES細胞からヘルパーES細胞を用いることにより生殖系列キメラを得る手法の開発」日本遺伝学会第84回大会、2012年9月24日～26日、福岡。

(5) 荒木正健、吉信公美子、中原舞、山村研一、荒木喜美：「可変型遺伝子トラップクローンデータベース(EGTC)」日本遺伝学会第84回大会、2012年9月24日～26日、福岡。

(6) 荒木正健、吉信公美子、山村研一、荒木喜美：「EGTC マウスラインの Gene Ontology 解析」第59回日本実験動物学会総会、2012年5月24日～26日、別府。

(7) 荒木喜美、中原舞、作村由美、牟田真由美、山村研一、荒木正健：「ヘルパーES細胞を用いることによりキメラ作製困難なES細胞から生殖系列キメラを得る手法の開発」第59回日本実験動物学会総会、2012年5月24日～26日、別府。

(8) 荒木正健、吉信公美子、山村研一、荒木喜美：「EGTC マウスラインの Gene Ontology 解析」第34回日本分子生物学会年会2011年12月13日～16日、横浜。

(9) 吉信公美子、来海葉子、慶田貴子、古閑成美、江上稔子、荒木喜美、山村研一、荒木正健：「可変型遺伝子トラップマウスにおけるプロモーター発現解析」第34回日本分子生物学会年会2011年12月13日～16日、横浜。

(10) 荒木喜美、大村谷昌樹、荒木正健、山村研一：「新しい部位特異的組換えシステム Dre/rox を用いたES細胞及びマウス個体での組換え率の検討」第25回モロシヌス研究会2011年7月8日～9日、十日町、新潟。

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計2件)

(1) 名称：マウス系統を樹立する方法

発明者：荒木正健、荒木喜美

権利者：国立大学法人熊本大学

種類：特許国際出願

番号：PCT/JP2011/69612

出願年月日：2011年8月31日

国内外の別：国外

(2) 名称：マウス系統を樹立する方法

発明者：荒木正健、荒木喜美

権利者：国立大学法人熊本大学

種類：特許米国出願

番号：No.13/818,906

出願年月日：2013年2月25日

国内外の別：国外

〔その他〕

ホームページ等

EGTC; Database for the Exchangeable Gene

Trap Clones

<http://egtc.jp>

J-CRED; Japan Cre Resource and Expression Database

<https://database.riken.jp/sw/en/Home/cria429sli/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 正健 (ARAKI, Masatake)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授

研究者番号：80271609

(2) 研究分担者

荒木 喜美 (ARAKI, Kimi)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・准教授

研究者番号：90211705

吉信 公美子 (YOSHINOBU, Kumiko)

熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教

研究者番号：20274730

吉木 淳 (YOSHIKI Atusi)

独立行政法人理化学研究所・実験動物開発室・室長

研究者番号：40212310