

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2018～2021
 課題番号：18K06038
 研究課題名(和文) コンディショナルレスキュー法による組織または発生時期特異的な遺伝子機能の解析

研究課題名(英文) Analysis of tissue- and development-specific gene function using a novel conditional-rescue transgenic mouse technique.

研究代表者
 渡邊 大介 (wtanabe, daisuke)

北里大学・理学部・講師

研究者番号：00260175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)： 組織特異的な遺伝子の機能の解析にはコンディショナルノックアウト法が有効であるが、その作成にはES細胞が必須なため特殊な技術や多くの時間が必要とされる。そこで我々はES細胞を用いず、より簡便に遺伝子機能の解析を可能とするコンディショナルレスキュー法を考案した(特許第6327712)。本研究ではレスキュー遺伝子の発現の切り替わりをリアルタイムで観察可能とする第2世代のベクター系を用いてInv遺伝子のほか新たに幹細胞の増殖や移動において重要な働きを有しているkit ligand遺伝子に対するコンディショナルレスキューマウスの作成を試み、これら新規の技術が有効的に機能することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては新規のベクターを用いて、Inv遺伝子のほか新たにkit ligand遺伝子に対するコンディショナルレスキューマウスの作成に成功し、我々が開発した手法が多くの遺伝子の機能解析において有効的に機能することを明らかにした。本手法は、従来の手法と比べ、短時間かつ低コストで目的とする遺伝子の組織または細胞特異的な欠失の誘導が可能となる新規の手法である。さらにこの手法はES細胞を必要としないため、ES細胞が存在しないマウス系統やマウス以外の動物種にも適用可能である。本手法は今後遺伝子の機能解析に広く適用されることが期待される。

研究成果の概要(英文)： Although the conditional knockout mouse method is effective for analyzing tissue-specific gene functions, it requires special techniques and a lot of time because ES cells are necessary for its generation. Therefore, we developed a conditional rescue technique (Patent No. 6327712) that does not require ES cells and is more convenient for analysis of gene function. In this study, in addition to the Inv gene, we generated novel conditional rescue mice target for the kit ligand genes, which play important roles in stem cell proliferation and migration, using a second-generation vector system that enables real-time observation of the switching of rescue gene expression. We have shown that these novel technologies are very effective for the analysis of the tissue- and development-specific gene function.

研究分野：分子生物学 発生生物学

キーワード：コンディショナルレスキュー コンディショナルノックアウトマウス Inv/ inversin 左右軸形成 多発性嚢胞腎 kit ligand 幹細胞 疾患モデルマウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Inv 遺伝子変異マウスは、内臓の位置や臓器の形状がすべて左右逆転する完全内臓逆位 (situs inversus totalis) の表現型を表すとともに、多発性嚢胞腎 (polycystic kidney disease) を発症する。また最近、家族性若年性ネフロン癆 (NPHP2) はヒトの INV 遺伝子の変異が原因であることが明らかとなったが Inv 遺伝子の左右軸形成や成体組織における生理学的な機能は未だ明らかにされていない。以前我々は、この遺伝子の機能解析を目的として、新たに開発した手法により、Inv 遺伝子がノックダウンされた RNAi ノックダウントランスジェニックマウスの作製に成功し、その解析結果を報告した (2014, *PLoS ONE*)。この結果はマウス個体においても機能的な遺伝子を標的とした RNAi が可能であることを初めて証明するとともに、その表現型から Inv 遺伝子の成体組織における新たな機能が示唆される結果となった。

Inv 遺伝子の組織特異的な機能を調べるにはコンディショナルノックアウトマウス法をもちいた解析が有効であるが、完全内臓逆位などの表現型は FVB 系統マウス特異的であるため、一般的なマウス系統由来の ES 細胞を用いた解析では正確な表現型の解析が期待できない。そこで従来の ES 細胞を必要とするコンディショナルノックアウトマウスの手法をもちいずに、組織特異的にレスキュー遺伝子の欠失誘導を可能とするコンディショナルレスキュー法を考案し (特許第 6327712)、この手法により Inv 遺伝子の組織特異的な機能の解析を進めた。この手法は特定の遺伝子に変異を有したマウス系統に正常な遺伝子を導入し、その表現型をレスキューした後に組織または発生時期特異的にレスキュー遺伝子の欠失を誘導する手法であり、従来の方法と比べ以下の利点がある。

- ①コンディショナルノックアウトマウスの作製と比べて短時間かつ低コストで組織特異的な遺伝子の機能解析が可能となる。
- ②現存する多くの疾患モデルマウスやこれまでに作製されたクラシカルなノックアウトマウスマウスを利用して、組織または発生時期特異的な遺伝子の機能解析が可能となる。
- ③作製に ES 細胞を必要としないため、ES 細胞が存在しないマウス系統やマウス以外の実験動物や家畜にも応用可能な技術となる。

これまでに我々は初期型のベクター系をもちいて Inv 遺伝子に対するコンディショナルレスキューマウスの作製に成功し、実際に Inv 遺伝子が組織特異的に欠失誘導されていることを確認した。しかしながらコンディショナルレスキューマウスの作製方法の効率化や、レスキュー遺伝子の発現状態の視覚化には作製に使用するベクター系のさらなる改良が必要であることが考えられた。本研究においては新たに開発した第 2 世代のベクター系をもちいて Inv 遺伝子のほか kit ligand 遺伝子など複数の重要な遺伝子に対するコンディショナルレスキューマウスの作製を進め、本手法の有効性を明らかにした。

2. 研究の目的

本研究においてはこれまでに作製を終えたコンディショナルレスキューマウスのほか、改良を加えた第 2 世代のベクター (Dual-color vector) をもちいて Inv 遺伝子に対するコンディショナルレスキューマウス系統を新規に作製し、Inv 遺伝子の発現を組織または発生時期特異的に欠失させ、その左右軸の決定や嚢胞腎形成における機能を明らかにする。さらに Inv 遺伝子のほか、始原生殖細胞や血球幹細胞などの幹細胞の増殖や移動において重要な機能を有したレセプター分子である kit やそのリガンドである kit ligand 遺伝子に対するコンディショナルレスキューマウスを作製し、その機能を解析するとともに本手法の有効性を明らかにし、新規の解析手法であるコンディショナルレスキュー法を確立することを目指す。

3. 研究の方法

本研究では従来のコンディショナルレスキューマウスの作製でもちいたベクター系を改良し、ユビキタな発現を示す EF1 α プロモーターの下流に Lox 配列、レスキュー遺伝子の cDNA、Ires 配列、GFP 遺伝子、PolyA 配列、lox 配列、Ds-Red 遺伝子、PolyA 配列の順に連結した第 2 世代のベクター系を構築し、新規のコンディショナルレスキューマウス系統を作製した。このベクター内には複数の遺伝子や特殊な塩基配列が含まれるため、その構築にあたっては部分的に人工合成した DNA 断片を連結する方法を用いた。第 2 世代のベクターをもちいて作製されたコンディショナルレスキューマウスにおいては Cre 遺伝子が活性化した組織特異的に lox 配列で囲まれた Inv 遺伝子が欠失すると同時に Ds-Red 遺伝子が発現するため、細胞全体で赤色の蛍光が観察されるのに対し、Inv 遺伝子が機能している組織では核移行シグナルが連結された GFP 遺伝子の発現が継続するため、緑色の蛍光が核内において観察される。そのためこのベクターをもちいて作製されたコンディショナルレスキューマウスでは目的とする遺伝子が欠失した組織と正常な組織を 1 細胞レベルでリアルタイムに識別することが可能となる (図 1)。

Inv 遺伝子に対する第 2 世代のコンディショナルレスキューマウスは上記のベクター内のマルチクロニングサイト内に Inv 遺伝子の cDNA を挿入したプラスミドを構築し、inv 変異マウスの受精卵に導入し作製した (九州大学との共同研究). 同様に kit ligand 遺伝子に対するコンディショナルレスキューマウスは kit ligand 遺伝子の cDNA を挿入したベクターを構築し、kit ligand 遺伝子に変異を有する sld 変異マウスの受精卵に導入し作製した (文部科学省先端モデル動物支援プラットフォーム支援). コンディショナルレスキュー遺伝子が導入されたトランスジェニックマウスは新生児マウスの tail より抽出した DNA をもちいた PCR 法により判定し、各マウス系統の樹立を進めた.

コンディショナルレスキューマウスの解析に必要な組織または発生時期特異的な Cre 遺伝子発現マウスとしては、神経細胞特異的な発現が報告されている P0-Cre のほか、マウス胚発生の特定の組織において左側部特異的に Cre 遺伝子が活性化される Pitx2-Cre マウスならびにタモキシフェンを投与することにより、発生途中の胎児や成体において Cre 遺伝子の活性化の誘導が可能となる ER2-Cre マウスを神戸理化学研究所ならびに熊本大学よりそれぞれ入手した. また Inv 遺伝子の解析に使用するため、FVB 系統マウスと交配を繰り返し、遺伝子背景を FVB 系統に置換した新たな系統を樹立した. 入手した Cre マウスの有効性を確認するため、Cre マウスと Cre 遺伝子の発現領域において lacZ 遺伝子が活性化する ROSA-lacZ マウスとの交配により得られたマウス新生児に lacZ 染色を施し、組織特異的な Cre 遺伝子の活性領域を確認した.

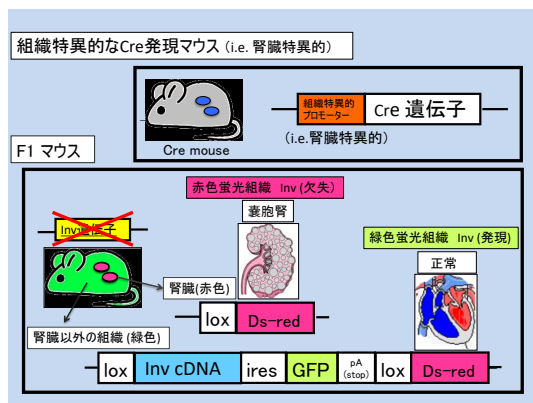


図1 コンディショナルレスキューマウスにおける組織特異的なレスキュー遺伝子の欠失の誘導

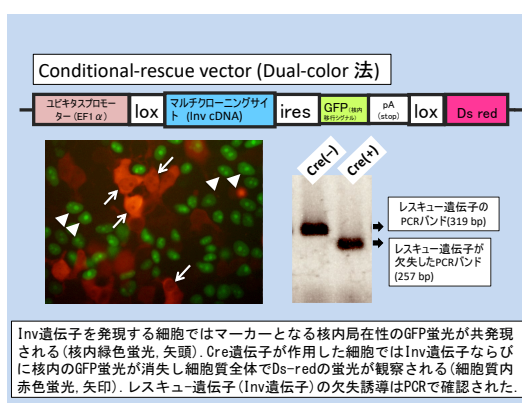


図2 コンディショナルレスキューベクターが導入された細胞における蛍光蛋白質の発現誘導とレスキュー遺伝子の欠失の誘導

4. 研究成果

本研究においては新規に開発した第 2 世代のベクター系をもちいてコンディショナルレスキューマウスの作製を試みた. このベクター内には正常なレスキュー遺伝子の cDNA を挿入するためのクロニングサイトが予め用意されているため、Inv 遺伝子のほか kit ligand 遺伝子などの目的とする遺伝子に対するコンディショナルレスキューベクターの構築が以前と比べて容易となった. レスキュー遺伝子を発現する細胞の指標となる核局在性の GFP 蛍光蛋白質と Cre 遺伝子の発現によって誘導されるレスキュー遺伝子の欠失と Ds-Red 遺伝子の発現誘導が実際に細胞内において機能しているかを確認するため、293T 細胞に Inv 遺伝子が挿入された第 2 世代のコンディショナルベクターを導入し、パーマネントな発現細胞株を作製した. この細胞では予想どおりに GFP 蛋白質の蛍光が核内特異的に観察され、さらに Cre 遺伝子が導入された細胞では GFP 蛍光が消失するとともにその細胞においては強い Ds-Red 蛋白質の赤色蛍光が特異的に観察された (図 2). これらの結果は、特定の遺伝子の欠失した細胞と正常な細胞を作製されたコンディショナルレスキューマウスの生体組織または組織由来の細胞をもちいた in vitro での解析において、1 細胞レベルでリアルタイムに観察することが可能となる実験系であることを示す結果となった. また Cre 遺伝子の発現により実際に Inv レスキュー遺伝子の欠失が誘導されていることが PCR 解析により確認された (図 2).

本ベクターの有効性が確認されたため、次に正常な Inv 遺伝子が挿入された本ベクターを inv 遺伝子変異マウスより得られた受精卵に導入し、Inv 遺伝子に対する第 2 世代のコンディショナルレスキューマウスの作製を進めた. 遺伝子導入処理により得られた Founder マウスのうち、5 系統のマウスにおいて遺伝子導入が確認された. そのうち #16 系統ではこれ



図3 第2世代のベクターにより新たに作成されたInv遺伝子に対するコンディショナルレスキューマウス (#16系統)

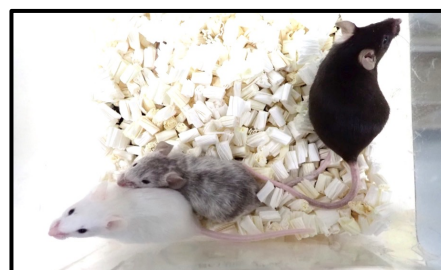


図4 第2世代のベクターより新たに作成された kit ligand 遺伝子に対するコンディショナルレスキューマウス (右上:野生型, 左下:sld/sldホモ変異マウス, 中:コンディショナルレスキュー遺伝子が導入されたsld/sldホモ変異マウス)

までに作製した第1世代のコンディショナルレスキューマウスと同様に、inv ホモ変異マウスで発症する完全内蔵逆位の表現型が完全にレスキューされていることが判明し、今回実験に用いた第2世代のベクターも有効的に機能していることが確認された。

さらに、このレスキューマウスでは出生後の成長に遅延が認められるとともに頭蓋骨の形成異常等の新たな表現型が確認された。その原因としてはレスキュー遺伝子の発現程度が正常値よりも低く、初期発生の左右軸形成時における機能をレスキューするには十分であったが、その後の正常な発生に必要とされる機能が不十分であったため、成長遅延等の表現型が認められたものと考えられた(図3)。#16系統マウスはコンディショナルレスキュー実験だけでなく、今後Inv遺伝子のハイポモルフィックな変異マウス系統としての活用が期待され、特に頭蓋骨形成におけるInv遺伝子の新たな機能に興味を持たれた。現在このマウス系統の正確な表現型ならびにInv遺伝子の発現等について解析を進めている。

本研究においては第2世代のベクターをもちいてInv遺伝子の他、同様に幹細胞の増殖や移動において重要な機能を有したリガンド分子であるkit ligand 遺伝子に対するコンディショナルレスキューマウスの作製を進めた。正常なkit ligand 遺伝子が挿入された第2世代のコンディショナルレスキューベクターをkit ligand 遺伝子に変異を有したsld/+マウス系統より得られた受精卵に遺伝子導入し、28系統の遺伝子導入マウスを得た。交配の結果、そのうち18系統については次世代へのトランスジーン継承が確認されたため、sld変異マウスとの交配を繰り返しkit ligand 遺伝子に対するコンディショナルレスキューマウス系統の樹立とその表現型の解析を進めた。通常sld/sldホモ変異マウスはkit ligand 遺伝子が機能しないためメラノサイトの移動や増殖の障害が生じ、全身の毛色が白色化する。またその多くが生後致死となるが、遺伝子の導入が確認された18系統のうち6系統のマウスにおいては毛色が部分的に黒色化し、一部の系統では成体まで生育することが確認された(図4)。これらの結果は本研究でもちいた第2世代のコンディショナルベクターが複数の遺伝子において有効的に機能することを示す結果となった。現在sld/sldホモ変異マウスにおける毛色の黒色化の割合を指標として選別を行い、kit ligand 遺伝子に対するコンディショナルレスキューマウス系統の樹立と表現型の解析を進めている。

コンディショナルレスキューマウス解析に必要とされる、組織特異的なCre遺伝子発現マウス系統の有効性をROSA-lacZをもちいて解析した結果、P0-Creマウスでは成体の大脳皮質ならびに三叉神経、座骨神経、腸管膜神経における特異的なCre遺伝子の活性化が確認されたことから、今後のコンディショナルレスキューマウス実験において有効的に活用されることが期待された(図5)。

我々が新規に開発したコンディショナルレスキュー法は特定の遺伝子に変異を有したマウスに正常な遺伝子を導入し表現型をレスキューした後に、組織または発生時期特異的にレスキュー遺伝子の欠失を誘導する新規の手法である。この手法はES細胞を必要としないため、ES細胞が作製されていないマウス系統やマウス以外の実験動物にも応用が可能であり、また従来の方法と比べ短時間かつ低コストでその解析が可能となることが考えられる。

本研究によりコンディショナルレスキュー法が有効に機能することが証明された。今後この手法はInv遺伝子に限らず、新規の遺伝子機能の解析手法として広く適用されることが期待される。

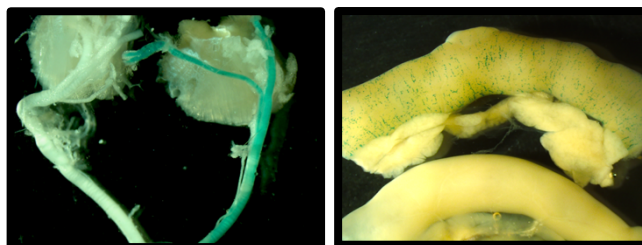


図5 P0-Creマウスにおける末梢神経特異的なCre遺伝子の発現
座骨神経(左図右):腸管膜神経(右図上)。左図左、右図下はそれぞれP0-Cre遺伝子を有さない同腹マウス由来の組織

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊大介
2. 発表標題 Generation of novel conditional-rescue transgenic mice target for the functional ligand and its receptor gene.
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊大介
2. 発表標題 Generation of the conditional-rescue transgenic mice that can regulate rescue-gene expression in the null mutant mice background.
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 渡邊大介
2. 発表標題 コンディショナルレスキュー法を用いた新規のトランスジェニックマウスの作成
3. 学会等名 文部科学省新学術領域研究 学術研究支援基盤形成 先端モデル動物支援プラットフォーム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡邊大介
2. 発表標題 Inv 遺伝子をターゲットとしたコンディショナルレスキューマウスの作製とその新技術の開発
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------