

平成 21年 5月 25日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19300149

研究課題名（和文）MSM マウス・JF1 マウス由来 ES 細胞を用いた遺伝子改変マウス作出と解析

研究課題名（英文）Establishment of ES cell lines derived from MSM/Ms and JF1/Ms lines and production of genetically engineered mice.

研究代表者

荒木 喜美 (ARAKI KIMI)

熊本大学・発生医学研究センター・准教授

研究者番号：90211705

研究成果の概要：MSM 及び JF1 は、日本固有のモロシヌス亜種から樹立されたマウス系統で、西ヨーロッパ産のマウスから派生した実験用マウスの系統とは、遺伝的にも表現型的にも大きく異なる。我々は、これらの系統で遺伝子導入や遺伝子破壊を可能にするため ES 細胞を樹立、それらの ES 細胞からは、生殖系列キメラを作製することができた。さらに、実際に遺伝子トラップによる変異マウス作製およびがん遺伝子のトランスジェニックマウス作製を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

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：ES 細胞、野生マウス系統、キメラマウス、生殖系列キメラ、遺伝子トラップ、遺伝子導入

1. 研究開始当初の背景

マウスは、遺伝子操作を容易に行える哺乳類の実験動物として広く使用されており、特に、ノックアウトマウスを用いた遺伝子機能解析は、ポストゲノム時代と言われる今、最も有効な個体レベルでのゲノム機能解析手段である。通常用いられる標準的なマウス近交系統は、西ヨーロッパ産のドメスティカス亜種から派生したもので、樹立される過程で、研究者による選択があったと考えられており、マウス一般から見るとむしろ特殊な集団と言え

る。他の亜種由来の系統では、国立遺伝学研究所で樹立された MSM/Ms 及び JF1/Ms 系統があり、我が国固有のモロシヌス亜種のマウス系統として有名である。これらは、標準的近交系統との間に大きな遺伝的距離を有し、かなり異なる表現型（痛覚反応や長期記憶能力、癌に対する抵抗性、エネルギー代謝効率など）を示す。これらの系統を用いて遺伝子機能解析を行うことで、従来の標準的近交系統だけでは得られない、新たなゲノム機能を発見と期待される。しかし、MSM/Ms や JF1/Ms 系

統を用いた胚操作は非常に困難である、という大きな難点があった。そこで、我々は、これらの系統で直接遺伝子操作を行うことを可能にするため、胚性幹細胞(ES細胞)樹立を試みた。ES細胞が樹立できれば、ES細胞で遺伝子改変を行い、キメラマウスを作製、掛け合わせることで、100%純粋なMSM/MsやJF1/Msバックグラウンドの遺伝子操作マウスを得ることが出来る。我々は、インビトロジェンから市販されているKnockout Serum Replacement (KSR)を用い、MSM/Msからは3系統、JF1/Msから7系統のES細胞株を樹立することに成功した。これらのES細胞株が、汎用されているES細胞株のように、生殖系列キメラ作出能力を有するかどうか、遺伝子導入等の操作を行い得るほど安定かどうかなど、実用化に向けて条件検討を行う段階であった。

2. 研究の目的

- (1) 効率良くキメラ作製が出来るようなプロトコルの確立。キメラ作製手段としてインジェクションがいいのか、アグリゲーションがいいのか、用いる受容胚や仮親の系統は等について詳しく検討し、安定的かつ効率良くキメラを作出できる手法を確立する。
- (2) ノックアウトクローン、トランスジェニッククローンを単離するための培養条件の確立。エレクトロポレーションを行ったあとのサブクローンから、5割以上の確率でGermlineキメラが得られるような培養条件の確立を目標に、条件検討を行う。
- (3) 通常の標準的近交系統との表現型の違いの検討。発ガン・肥満・老化等が病態モデルとして最も注目を集める事柄である。そこで、これらに関連した遺伝子の変異マウスを作製し、従来の標準的近交系統で得られていた知見と比較し、MSM/MsやJF1/Ms系統のモデル生物としての有用性を検討する。

3. 研究の方法

- (1) キメラマウス作製条件の検討。
最適な受容胚を決定するため、ICRやC57BL/6 X BDF1を用い、桑実胚とのアグリゲーションと胚盤法へのマイクロインジェクションを行う。JF1/Ms系統は、毛色でのキメリズム判別が困難であるので、JF1特異的なマイクロサテライトを検出することで、キメリズムを判断する。得られたキメラは、正常メスと交配、毛色やマイクロサテライトの検出

により、germline transmissionを判定する。

(2) 培養条件の検討。

feederつきまたはfeederなしで6回植え継ぎを行い、キメラを作製、安定性をチェックする。形態が乱れてきた場合には、培地などを検討する。もし、6回植え継ぎ後に、形態は正常にも関わらず、キメラ形成能が低下してしまった場合には、新たなES株樹立を行う。

(3) トラップベクターを導入したサブクローンでのキメラ作出効率の検討。

エレクトロポレーションによる遺伝子導入を行えるかどうか検討するため、当研究室で既に保持しているトラップベクターを導入する。ベクター挿入が1コピーであるクローンを選択後、キメラ作製能の検討を行う。作製に用いたうち、5割程度の確率で生殖系列キメラが得られることを目指す。マウスラインが得られたESクローンからRNAを調製、5'RACEを行い、トラップされた遺伝子を同定、同一の遺伝子がトラップされていないか調べ、存在していた場合には、そのクローンを入手する。

(4) トランスジェニックマウス用コンストラクトの作製とマウスライン樹立。

トランスジェニックコンストラクトとしては、発がん感受性の差を調べるため、SV40Tag、Myc、Maf等のがん遺伝子を用いる。後の表現型比較のため、なるべく日本国内で研究され、マウス系統が保存されているものを優先、解析段階の必要性も考慮し、共同研究の形で行う。

4. 研究成果

- (1) キメラマウス作製および培養条件検討。
MSM/Ms由来ES細胞を用いたキメラ作製結果を下に示す。

細胞株番号	手法	受容胚	移植胚数	離乳キメラ数	生殖系列キメラ
1	凝集	ICR	125	24	9
2	凝集	ICR	100	6	1
3	凝集	ICR	100	8	2
1*	凝集	ICR	50	7	2
1	注入	ICR	75	20	8
1	注入	BD #	70	24	15

* 6回継代した細胞

C57BL/6 X BDF1

3系統すべてから生殖系列キメラを得ることが出来た。最も成績の良かったNo. 1ラインをさらに6回植え継いでキメラ作製を行っ

たところ、やはり生殖系列キメラが得られ、我々が用いている培養系で安定に保持できることが分かった。プラストシストへの注入法によるキメラ作製も行ったところ、C57BL/6 X BDF1 プラストシストへの注入が最も良い成績であった。

JF1 由来の ES 細胞株 8 つについても、まず、凝集法でキメラマウス作製を行ったが、No. 1 と 3 で各 1 匹の生殖系列キメラが得られたのみで、その効率は低かった。そこで、C57BL/6 X BDF1 プラストシストへの注入によるキメラ作製を行った。その結果を下に示す。

細胞株番号	移植胚数	出産仔数	離乳オス数	キメラオス数	生殖系列キメラ数
1	70	2	1	1	0
3	50	6	5	5	3
4	40	16	12	3	1
6	50	21	13	4	2

No. 3 ラインが最も成績が良かったが、生殖系列キメラでもコートカラーは全面黒毛であり、キメラであるかどうかは DNA を調べないと分からない状況であった。MSM 由来 ES の方が形態も安定しており、キメラ作製能も高かったため、以後の実験は Mol/MSM-1 株を用いて行った。

(2) トラップベクターを導入クローン単離とそのキメラ作出効率の検討。

Mol/MSM-1 株に、トラップベクター pU-21T をエレクトロポレーションにより導入、G418 選択後、144 個のコロニーを単離、142 のトラップクローンをストックした。コロニー出現率は通常の ES 細胞とかわらなかった。サザンブロットで単一コピー挿入かどうかを確認したところ、99 クロオンが単一コピー挿入であった。得られたクローンをを用い、様々な手法でキメラ作製を行い、生殖系列キメラが得られるかどうか比較検討した。その結果を下に示す。

キメラ作製を行ったライン数	受容胚	手法	生殖系列キメラが得られたライン数	効率 (%)
22	ICR	凝集	5	23%
40	BD #	凝集	12	30%
2	ICR	注入	0	0%
5	BD #	注入	5	100%

C57BL/6 X BDF1

当初、作業の容易な凝集法を用いて行ったが、生殖系列キメラの得られるラインの割合は 3 割程度であり、実用レベルにはいたらなかった。凝集法でキメラの得られなかったラインを用いて、プラストシストへの注入法でキ

メラを作製したところ、C57BL/6 X BDF1 の胚を用いた場合に、試した 5 系統すべてから生殖系列キメラを得ることができ、この手法が最も適していると考えられた。

現在、トラップされた遺伝子の同定を進めており、30 系統について結果が得られている。その中で、Ayu21-MT48 は Fto 遺伝子をトラップしており、当研究室において同じ遺伝子をトラップしたクローンが通常の ES 細胞株でも得られていることから、現在、このラインの表現型解析を進めている。

(3) トランスジェニックマウス用コンストラクトの作製とマウスライン樹立。
がんを発症するトランスジェニックマウスで、日本国内の研究者が現在も維持しているもの、という観点で調べると、CD2-cMaf が最も有力な候補であった。そこで、そのコンストラクトを入手、ES 細胞に導入するため、ネオマイシン耐性遺伝子を組み込んだ pMaf-neo を作製した。完成したプラスミドを Mol/MSM-1 に導入、48 クロオンを単離した。サザンブロットで導入遺伝子全長が挿入されているかどうか調べたところ、4 クロオンのみが全長を保持していた。現在までに 2 クロオンからマウス系統を樹立、今後、表現型を解析していく予定である。

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 10 件))

Yamashita, R., Yamamura, K. (7 名省略、7 番目) Defective development of the gall bladder and cystic duct in Lgr4-hypomorphic mice. *Dev. Dyn.* 238: 993-1000, 2009. 査読あり

Jin, S., Yamamura, K. (9 名省略、9 番目) Age-related pulmonary emphysema in mice lacking / hydrolase domain containing 2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 380: 419-424, 2009. 査読あり

Araki, K., Takeda, N., Yoshiki, A., Obata, Y., Nakagata, N., Shiroishi, T., Moriwaki, K. and Yamamura, K. Establishment of germline-competent embryonic stem cell lines from the MSM/MS strain. *Mamm Genome*, 20: 14-20, 2009. 査読あり

Zhao, G., Li, Z., Araki, K., Haruna, K., Yamaguchi, K., Araki, M., Takeya, M., Ando, Y. and Yamamura, K. Inconsistency between hepatic expression and serum concentration of transthyretin in mice

humanized at the transthyretin locus. *Genes to Cells*, 13: 1257-1268, 2008 査読あり

Yamamura, K. and Araki, K. Gene trap mutagenesis in mice; New perspectives and tools in cancer research. *Cancer Science* 99: 1-6, 2008. 査読あり

Hashimoto, D., Ohmuraya, M. (7名省略、7番目) Involvement of autophagy in trypsinogen activation. *J. Cell Biol.* 181: 1065-1072, 2008. 査読あり

Suyama, K., Ohmuraya, M. (8名省略、7番目) C/EBP homologous protein is crucial for the acceleration of experimental pancreatitis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 367: 176-182, 2008. 査読あり

Wang, J., Ohmuraya, M., Hirota, M., Baba, H., Araki, K. and Yamamura, K. Expression Pattern of the Serine Protease Inhibitor Kazal Type 3 (Spink3) Gene During the Mouse Embryonic Development. *Histochemistry and Cell Biology* 130: 387-397, 2008. 査読あり

Chen, H., Li, Z., Haruna, K., Li, Z., Li, Z., Semba, K., Araki, M., Yamamura, K. and Araki, K. Early pre-implantation lethality in mice carrying truncated mutation in the RNA polymerase 1-2 gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 365:636-642, 2008. 査読あり

Hoshii, T., Takeo, T. (4名省略、5番目) LGR4 regulates the postnatal development and integrity of male reproductive tracts in mice. *Biol. Reprod.* 76:303-313, 2007. 査読あり

〔学会発表〕(計 9件)

Araki, K., et al.: Establishment of embryonic stem cell lines derived from MSM/Ms strain originated from *Mus musculus molossinus.*, 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Jointly sponsored by the International Society of Developmental Biologists), 2008.May.28-30, 徳島

Araki, M., et al.: KEGG PATHWAY analysis of the EGTC clones., 41st Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (Jointly sponsored by the International Society of Developmental

Biologists), 2008.May.28-30, 徳島

荒木喜美 他: MSM/Ms 系統からの生殖系列キメラが高率に得られる ES 細胞株の樹立, 日本実験動物科学技術 2008 (第 55 回日本実験動物学会総会、第 42 回日本実験動物技術者協会総会), 2008.5-15-17, 仙台

荒木正健 他: 可変型遺伝子トラップクローンデータベース; EGTC ~ 効率的な遺伝子破壊を実現した Stop-ATG System ~, 日本実験動物科学技術 2008 (第 55 回日本実験動物学会総会、第 42 回日本実験動物技術者協会総会), 2008.5-15-17, 仙台

荒木喜美 他: MSM/Ms 及び JF1/Ms 系統からの ES 細胞株の樹立, 第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会合同大会, 2007.12.11 ~ 15, 横浜

Masatake Araki, et al.: EGTC, DATABASE FOR THE EXCHANGEABLE GENE TRAP CLONES; RESOURCE OF MOUSE AND ES CELL LINES FOR THE FUNCTIONAL ANALYSIS OF THE MOUSE GENOME., 21st International Mammalian Genome Conference IMGC2007, 2007.Oct.28-Nov.1, 京都

Kimi Araki, et al.: ESTABLISHMENT OF EMBRYONIC STEM CELL LINES DERIVED FROM MSM/MS STRAIN ORIGINATED FROM *MUS MUSCULUS MOLOSSINUS.*, 21st International Mammalian Genome Conference IMGC2007, 2007.Oct.28-Nov.1, 京都

荒木喜美: 我が国独自のノックアウトマウスプロジェクト(シンポジウム), 第 54 回日本実験動物学会総会, 2007.5.23 ~ 25, 東京

荒木正健, 荒木喜美, 山村研一 (10 名省略): 可変型遺伝子トラップクローンデータベース: EGTC, ゲノム機能解析を行うためのマウス及び ES 細胞リソース (EGTC, Database for the Exchangeable Gene Trap Clones; Resource of mouse and ES lines for the functional analysis of the mouse genome), 第 40 回日本発生生物学学会・第 50 回日本細胞生物学会合同大会, 2007.5.28 ~ 30, 福岡

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 喜美 (ARAKI KIMI)

熊本大学・発生医学研究センター・准教授

研究者番号: 90211705

(2) 研究分担者

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

(3)連携研究者
なし