

## 様式 C-19

# 科学研究費補助金研究成果報告書

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
研究期間：2007-2008 年度  
課題番号：19310130  
研究課題名（和文） 日本版「ノックアウトマウス・プロジェクト」の立ち上げに向けて  
研究課題名（英文） For the launch of a Japanese version of the Knockout Mouse Project  
研究代表者  
石田 靖雅（ISHIDA YASUMASA）  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授  
研究者番号：10221756

研究成果の概要：

ヒトやマウスのゲノム解読が終了した今、生物医学系研究の次なる目標は「高等動物ゲノムの機能解明」である。これを早期に達成するため、マウス ES 細胞中で全ての遺伝子をノックアウトし、作製された夥しい数の ES 細胞クローンを世界中の研究者に無償・無条件で分配するという「ノックアウトマウス・プロジェクト」が推進され始めた。この中で我が国が確たる地位を築くため、本研究において、新しい高機能型遺伝子破壊法が開発された。

交付額

(金額単位：円)

|         | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|---------|------------|-----------|------------|
| 2007 年度 | 8,000,000  | 2,400,000 | 10,400,000 |
| 2008 年度 | 7,200,000  | 2,160,000 | 9,360,000  |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 年度      |            |           |            |
| 総計      | 15,200,000 | 4,560,000 | 19,760,000 |

研究分野：複合新領域  
科研費の分科：ゲノム科学  
細目：応用ゲノム科学

キーワード：

- ノックアウトマウス
- 遺伝子トラップ
- ES 細胞
- Nonsense-mediated mRNA decay
- UPATrap
- コンディショナル・ノックアウト
- 国際的共同研究計画

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) マウス・ゲノム科学における世界的潮流

2004年9月、国際的な共同研究計画「ノックアウトマウス・プロジェクト」が *Nature Genetics* 誌に発表され、遺伝子トラップと遺伝子ターゲティングの手法を組み合わせることにより、マウスES細胞中の全遺伝子を破壊することが世界中の研究者に呼びかけられた。計画では、まずはランダムな遺伝子トラップの手法を用い、迅速にできるだけ多くの遺伝子をES細胞中で破壊する。遺伝子トラップ法で破壊できなかった遺伝子に関しては、次のステップでDNAの相同組換えに基づいた遺伝子ターゲティングを実行し、時間と労力を惜しまず、確実に破壊する。

### (2) 二つの遺伝子トラップ法

ランダムな遺伝子トラップは、プロモーター・トラップ法とポリA・トラップ法の二つに大別される。このうち、前者の有効性はすでに十分認知されており、多種多様な研究に広く応用されている。しかしプロモーター・トラップ法には、「標的細胞中で発現されない遺伝子をトラップすることができない」という致命的な欠点が存在する。これに対しポリA・トラップ法は、「標的細胞中での発現の有無にかかわらず、どのような遺伝子でも捕捉することができる」という大きな潜在的メリットを持つ。

### (3) 従来のポリA・トラップの限界: NMDの厚い壁

しかし申請者らは、従来のポリA・トラップ法では、ベクターが遺伝子の最も3'側の(最後の)イントロンに挿入された細胞クローンのみが選択的に単離されてしまう、という憂慮すべき事実を見出した。ベクターが最後のイントロンに挿入された場合、トラップにより引き起こされる遺伝子の欠損領域は最終エクソン部分のみとなるため、遺伝子機能が完全には破壊されない可能性が高くなる。さらに申請者らは、ベクター挿入部位に関するこの驚くべき「偏り」は、ポリA・トラップに用いられる選択マーカー(NEOなど)のmRNAがnonsense-mediated mRNA decay (NMD) と呼ばれるmRNAサーベイランス機構によって分解されるために引き起こされる、という決定的証拠を得た。

### (4) 理想的な遺伝子破壊法「UPATrap」の開発

2005年、申請者らは、選択マーカーのmRNAに対するNMDの影響を完全に排除した新しいポリ

A・トラップ法、「UPATrap」の開発に成功した。この新しい遺伝子トラップ法の創出により、ベクター挿入部位に関する著しい「偏り」が皆無の状態でもポリA・トラップを遂行することが可能となった。つまり、標的細胞(マウスES細胞など)の中で転写活性を持たない遺伝子群の機能を、ランダムな手法によって完全に不活性化することが初めて可能となったのである。

### (5) カナダの動向

上記のような特性を持つUPATrap法の開発は、ノックアウトマウス・プロジェクトの遂行にとり、大きな障害となっていたステップ(誰が試みても、標的細胞中で発現しない遺伝子のポリA・トラップは成功しない!)が解消されることを意味したため、主に海外の研究グループからは好意的な反応があった。カナダの国家的ゲノム・プロジェクトの一環として、トロント大学のJanet Rossantを中心としたチームは、Centre for Modeling Human Disease (CMHD) という名のマウス遺伝子ノックアウト計画を展開しているが、2005年後半より、彼らはUPATrap技術の導入に踏み切った。彼らのウェブサイトのトップページには、トロント大とともに奈良先端大のロゴマークが表示され、CMHDが両大学の共同作業として推進されていることが明記されている(<http://www.cmhd.ca/>)。

### (6) 米国-英国連携チームの動向

2006年9月、米国NIHは、世界規模でノックアウトマウス・プロジェクトを推進するため、米国の製薬会社Regeneronと、英国のサンガー研究所を中心にしたチームに巨額の資金を投入する、と発表した(<http://www.genome.gov/19517927>)。それによれば、Regeneronとサンガーを合わせ、ES細胞中で発現されない約8,500個の遺伝子を、ランダムなトラップではなく、相同組換えに基づいたターゲティングにより、5年以内に全て不活性化する計画である。

## 2. 研究の目的

このような状況下において、UPATrap技術の開発で世界に先んじた我が国では、未だにノックアウトマウス・プロジェクトの立ち上げに関する幅広い合意が得られていない。しかし、実際に同プロジェクトが立ち上がるまで何も行動を起こさず、先行する欧米諸国の独走をただ傍観するのを避けるため、個々の研究者レベルで最大限の努力を

続けることが申し合わされている。

そこで本研究では、平成19年度と20年度の2年間で、次の2点を重点的に推進する。

- ① UPATrapベクターを用い、ES細胞中で発現されない遺伝子を不活性化する。作製したES細胞クローンの情報をインターネット上で公開し、リクエストには無条件で応える。
- ② コンディショナルな新規UPATrapシステムを開発し、遺伝子トラップ実験に応用する。

### 3. 研究の方法

#### (1)ES細胞で発現されない遺伝子の破壊

UPATrapベクターの場合、EGFPの緑色蛍光の不在は、トラップされた遺伝子が標的細胞中で発現しないことを意味するため、そのようなクローンに着目する。遺伝子トラップにより生成されたES細胞クローンからRNAを抽出し、3' RACEとダイレクト・シーケンシングにより、トラップされた遺伝子(候補)の塩基配列を明らかにする。

#### (2)トラップされた遺伝子に関する情報の公開と凍結細胞の無条件供与

トラップされた遺伝子に関する情報を、「NAISTrap データベース」としてインターネット上で公開する (<http://bsw3.naist.jp/kawaichi/naistrap.html>)。ES細胞株に対するリクエストには無条件で応じる。

#### (3)コンディショナル・ノックアウトの重要性

ノックアウトマウスを作る際、破壊した遺伝子が個体発生に必須の場合には、マウスが胎児期に死亡し、本来の目的である「マウス個体を利用した遺伝子機能の解析」が極めて困難になってしまう。幸運にもノックアウトマウスが胎児期死亡を免れた場合でも、解析対象の遺伝子を、時期特異的、あるいは組織特異的に不活性化することができれば、その遺伝子の生理機能に関する情報量は飛躍的に増大する。このため、最近の遺伝子ターゲティングは、最初からコンディショナルなアレルの作製を目指して実行されることが多い。

#### (4)コンディショナルな遺伝子トラップ？

遺伝子ターゲティングと比較し、ベクター・デザイン

トラップの場合も最近ではコンディショナルな手法が主流になりつつある。しかし、それは構造が極めてシンプルなプロモータートラップ・ベクター(標的細胞中で恒常的に発現する遺伝子のみをトラップできる)に限定した事情であり、構造が複雑なポリAトラップ・ベクター(標的細胞中での発現の有無に関らず遺伝子をトラップできる)の場合には、コンディショナルな手法の応用例は報告されていない。本研究では、最新のポリAトラップ・ベクターであるUPATrapのコンディショナル化を目指す。

#### (5)コンディショナルなUPATrapベクターの構築

本研究では、コンディショナルなUPATrapベクターの構築のため、2種類の相同組換え酵素(recombinase)とその標的配列のシステムを用いる。Cre recombinaseの標的配列としてはloxPとlox5171を用いるが、loxPとlox5171の間で組み換えが生じることは殆どなく、基本的には、loxPはloxPとのみ、lox5171はlox5171とのみ組み換えを起こす。同様に、Flp recombinaseの標的配列としてFRTとF3を用いるが、基本的にFRTはFRTとのみ、F3はF3とのみ組み換えを起こす。これらの標的配列をUPATrapベクターの内部に配置する。

#### (6)Flp recombinaseによる最初の組み換え: inversion & deletion

ES細胞中でトラップされたばかりの遺伝子は、常時その機能が破壊された状態になっている。そこにFlp recombinaseを一過性に発現させ、(i)遺伝子破壊のためのターミネーター・カセット(SA-IRES-EGFP-pA)を反転させ、(ii)遺伝子トラップのためのNEOカセットを削除する。FRT間が先に反転するか、F3間が先に反転するかにより、二種類の異なる中間体が形成されるが、最終的には組換え反応は、「トラップした遺伝子にとって無害なアレル」が形成されるところまで進行し、そこで終結する。平成19年度は、新規ベクターとES細胞を用い、小さなスケールで遺伝子トラップを行い、Flp recombinaseの一過性発現により、このステップまで組換え反応が進行することを確認する。

#### (7)Cre recombinaseによるコンディショナル・ノックアウト:inversion & deletion

前項で予定通りの反転と欠失を誘導できたES細胞に対し、トランスフェクションにより、Cre recombinaseを一過性に強制発現させる。そして、

ターミネーター・カセット(SA-IRES-EGFP-pA)が反転し、「遺伝子破壊型アレル」が形成され、組換え反応が終結することを確認する。

#### 4. 研究成果

##### (1)ES 細胞で発現されない遺伝子の破壊

C57BL/6-129 F1 マウス由来の ES 細胞株 V6.4 (R. Jaenisch 教授より供与)と UPATrap ベクターを利用し、ランダムな遺伝子破壊実験を実行した。遺伝子トラップにより生成された ES 細胞クローンから RNA を抽出し、3' RACE とダイレクト・シーケンシングにより、トラップされた遺伝子(候補)の塩基配列を明らかにした。マウス ES 細胞におけるトラップされた遺伝子(候補)の発現を RT-PCR で解析した結果、同細胞中では完全にシャットオフされている遺伝子が、高頻度に見出された。

##### (2)トラップされた遺伝子に関する情報の公開と凍結細胞の無条件供与

産出された ES 細胞クローン(731 種)は、理化学研究所バイオリソースセンター(理研 BRC、つくば市)に寄託された。トラップされた遺伝子に関する情報は、インターネット上で公開されている([http://www2.brc.riken.jp/lab/mouse\\_es/](http://www2.brc.riken.jp/lab/mouse_es/))。ES 細胞株に対するリクエストには、理研 BRC を通じ、ほぼ無条件で応じることが可能である。

##### (3)UPATrap 技術のコンディショナル化

UPATrap 技術のコンディショナル化を達成するため、複数の相同組換え酵素認識配列をベクターの内部に挿入した。具体的には、相同組換え酵素 Cre の認識配列として loxP と lox5171 を、相同組換え酵素 Flp の認識配列として FRT と F3 を使用した。それらの認識配列を、ベクター内部の 3 カ所(遺伝子破壊カセットの上流と下流、それに遺伝子トラップカセットの下流)に、インバーテッドな位置関係になるよう配置した。得られたベクターをウイルス感染により ES 細胞に導入し、相同組換え酵素 Cre と Flp が培養細胞レベルで期待通りに働くことを確認した。特に相同組換え酵素 Cre に関しては、今後、動物個体(マウス)レベルの実験による検証を行い、有効性を確かめる必要がある。

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 2 件)

**1** Down-regulation of CIBZ, a novel substrate of caspase-3, induces apoptosis. Oikawa, Y., Matsuda, E., Nishii, T., Ishida, Y., and Kawaichi, M. **J. Biol. Chem.**, **283**, 14242-14247 (2008). 査読有.

**2** Mouse liaison for integrative brain research.

Aiba, A., Inokuchi, K., Ishida, Y., Itohara, S., Kobayashi, K., Masu, M., Mishina, M., Miyakawa, T., Mori, H., Nakao, K., Obata, Y., Sakimura, K., Shiroishi, T., Wada, K., and Yagi, T. (*authors are alphabetically ordered*) **Neurosci. Res.** **58**, 103-104 (2007). 査読有.

[学会発表](計 2 件)

**1** NMD 抑制に基づく新しい遺伝子破壊法(ナショナルバイオリソースプロジェクト).

石田靖雅

第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会.  
神戸ポートアイランド(Dec. 9, 2008).

**2** ノックアウトマウス・プロジェクトと mRNA サーベイランス機構「NMD」の接点.

石田靖雅

第54回日本実験動物学会総会(シンポジウム).  
東京 (May 25, 2007).

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

[その他]

特にありません。

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

石田 靖雅(研究者番号:10221756)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授

### (2)研究分担者

ありません。

### (3)連携研究者

ありません。