

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19700336
 研究課題名 (和文) C57BL/6 マウスにおけるシナプス機能分子の系統的遺伝子改変システムの開発

研究課題名 (英文) Development of systematic gene manipulating techniques for analysis of synaptic proteins on the C57BL/6 strain.

研究代表者

阿部 学 (ABE MANABU)
 新潟大学・脳研究所・助教
 研究者番号：10334674

研究成果の概要：

遺伝子改変マウスの系統的作製のため、BAC-Red/ET システムと Multisite Gateway を組み合わせたポリ A トラップ型ターゲティングベクター作製法を実用化し、相同組換え体 ES 細胞作製を簡便にする手法を開発した。また、非相同的末端結合関連タンパクの発現抑制により、相同組換え効率を上昇させる手法を確立することができた。開発したこれらの手法を適用する事でシナプス機能遺伝子改変マウスを多数樹立する事ができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,600,000	0	1,600,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	480,000	3,680,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学 ・ 神経化学・神経薬理学

キーワード：分子・細胞・神経生物学

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は脳の高次機能である記憶・学習の分子機構の解明を目標とし、中枢神経系シナプスにおける機能分子の活性調節機構の解明を研究目的としている。現在まで、グルタミン酸受容体チャネルや細胞間接着分子など、幾つかのシナプス機能分子に着目し、ノックアウト(KO)マウスを作製して、その生理機能解析を行ってきた (Abe et al., J. Neuroscience (2004) 24: 7292-304)。その研究過程で、従来のジーンターゲティング法を用いた単純な分子欠損では、発生に与える影

響からしばしば致死や神経回路形成不全などを引き起こし、成体における脳の高次機能解析が不可能になるという問題に突き当たった。これらの制限、限界を克服するため、脳神経機能解析に適した C57BL/6 純系 ES 細胞を用いたコンディショナルジーンターゲティング法の開発を進めてきた。

ヒト、マウス等の全ゲノム配列が解読された今日、脳神経科学を含めた医学、生物学の次なる課題は機能ゲノミクス (全遺伝子の機能解明) へと移行している。機能ゲノミクスにおいて中心的な役割を果たすと考えられる全遺伝子の網羅的な KO マウス作製プロジ

エクトは、すでに欧米および中国において始動している (Science (2006) 312: 1862-6)。我が国では、これらの巨大プロジェクトに相当するものは存在していないが、各プロジェクトは全世界の研究者へのデータ公開、マウスの提供を謳っており、数年以内には各研究室単位での通常の KO マウス作製については不要となることが期待されている。しかし、以下に述べる理由から、脳神経科学における遺伝子改変マウス作製のニーズはさらに高まることが予想された。(1) 遺伝的背景の不統一性。行動学的解析に代表される脳神経機能の精緻な解析のためには、マウスの遺伝的背景が極めて重要な問題となる。米国の NIH Knockout Mouse Project は B6 系統の ES 細胞を用いてゆくことを表明しているが、他のプロジェクトでは従来から使用されている脳神経機能解析には不適当な 129 系統由来の ES 細胞を使用することが予定されていた。それ故、各プロジェクトにより作製されたマウスをそのままでは使用できない可能性が高い。(2) マウスの入手に関する問題。各プロジェクトは数年スパンの計画であるため、使用したい KO マウスが直ちに入手可能となる訳ではない。また、プロジェクトへの貢献が無い我が国の研究者へ、積極的な分与が行われる保証はなかった。(3) 通常の KO マウス以外の遺伝子改変マウスの作製ニーズの増加。単純な欠損変異体である KO マウスに生ずる致死性、遺伝子の機能的重複等の問題点を克服するために、コンディショナルジーンターゲット法が開発されており、現に The European Conditional Mouse Mutagenesis Program では網羅的なコンディショナル KO マウスの作製を表明した。しかしコンディショナル KO マウスといえど欠損変異マウスの延長であり、遺伝子の精緻な機能解析には、過剰発現、置換、部分的欠損、点変異導入等を複合してゆく必要が生じる。それらは対象とする遺伝子の専門家によりデザインされる必要があり、個々の研究者による遺伝子改変マウス作製のニーズは増加することが予想された。以上の理由から、脳神経科学において、B6 系統 ES 細胞を用いた遺伝子改変マウス作製の効率化は極めて重要な課題であると考えられた。

研究代表者は、近交系マウスより樹立した ES 細胞から効率的に KO マウスを作製するための ES 細胞の培養法とキメラマウス作成法の改良を行い、所属研究室にて独自に樹立された C57BL/6N 系統由来 ES 細胞 RENKA を用い、2006~2007 年度の 2 年間で 50 系統を越える遺伝子改変マウスを作出した。計画した遺伝子改変マウスの 96.6% を実際に樹立できたことから、ES 細胞培養とキメラマウス作製のシステムはほぼ完成型に近いと言えた。研究開始当初、上記の実績は B6 系

統遺伝子改変マウスの作製効率として類無いものであり、このシステムを基に、脳神経科学に有用な新しい遺伝子改変マウス作製システムの開発を計画していた。しかし当初の手法では、複雑なターゲットベクター (TV) の作製と、相同組換え体 ES 細胞の同定に多大な労力を要しており、このことが KO マウス作製の大規模化に最大の障害となっていた。

2. 研究の目的

C57BL/6 系統 ES 細胞 RENKA を用いて、コンディショナル KO マウスを系統的、かつ短時間に作製するシステムを構築するため、以下に示す 3 点を研究目的として設定した。

(1) TV 作製の効率化

BAC (bacterial artificial chromosome) を用いた Red/ET 組換え反応と Multisite Gateway システム (Invitrogen) を組み合わせた、新たな TV 構築法の実用化をはかる。従来の、PCR によるゲノム DNA 断片のサブクローニングと通常のライゲーション反応による TV 構築では、研究者 1 名により約 1 ヶ月間で 1 種類の TV を作製していたが、このシステムを用いることで、試算上、研究者 1 名により 1 ヶ月間で約 16 種類の TV の作製が可能となることが期待される。

(2) 選別マーカー発現系の最適化

相同組換え効率を上げるため、TV 中の選別マーカーの発現制御システムを開発する。ES 細胞への TV の導入時、ポジティブ選別に用いる薬剤耐性遺伝子発現カセットは、ゲノム中のどこに組み込まれた場合でも薬剤耐性遺伝子を発現し続けるため、非相同組み込みによるランダムなベクター挿入が、見かけ上の相同組換え効率を下げ、相同組換え体の同定を困難とする主要な原因となる。この欠点を克服するため、相同組換え体で選択的に薬剤耐性遺伝子を発現するシステムを開発する。また、ネガティブ選別マーカーの発現量の最適化を行う。

(3) DNA 組換え分子機構の制御

相同組換え効率上昇のための ES 細胞への処置を検討する。細胞種は異なるが、相同組換え関連タンパクである Rad51 の過剰発現 (Nucleic Acids Res. (1998) 26: 2859-64) や、非相同的末端結合 (nonhomologous end-joining: NHEJ) 関連タンパクである Ku70、Ku80 の欠損 (Proc Natl Acad Sci U S A. (2004) 101: 12248-53) は相同組換え頻度を上昇させるという報告が存在する。そこで ES 細胞での相同組換え関連タンパク過剰

発現、または RNAi による NHEJ 関連タンパク発現抑制の前処置を行い、その後 TV を導入し、相同組換え効率が上昇する条件を検索する。

本研究によって確立される技術により、従来まで遺伝子改変マウスの作製に必要としていた多大な労力、時間、経費が著しく削減される。シナプス機能分子の遺伝子改変マウスを多系統作製することが可能となることは、脳機能解析を飛躍的に推進できることを意味しており、脳高次機能の分子機構の解明に、極めて有意義な成果となる。

3. 研究の方法

(1) 簡便な TV 構築法の開発。

TV を構成する 5'および 3'相同領域のゲノム DNA 断片のサブクローニングには、BAC を用いた Red/ET 組換え反応を利用し、Multisite Gateway システムを利用した 1 ステップの DNA 連結反応により薬剤耐性遺伝子発現カセットを組み込むことで TV 構築を行う。このシステムは新潟大学脳研究所の薄井宏助教により考案されたもので、(2)のポリ A トラップ型 TV の作製へ適用する。さらに Multisite Gateway システムを使用せず、Red/ET 組換え反応だけで相同領域のサブクローニングと薬剤耐性遺伝子発現カセットの組み込みを同時に行うシステムを開発する。

(2) 選別マーカー発現系の最適化。

ポリ A トラップシステムの原理を利用して、ポジティブ選別に用いる薬剤耐性遺伝子の発現を制御するシステムを作製する。薬剤耐性遺伝子の発現を制御するポリ A トラップシステムには、奈良先端科学技術大学院大学の石田靖雅助教授（当時）らにより開発された UPATrap システム (Nucleic Acids Res. (2005) 33: e20) の原理を用いる。石田助教授らの協力を得て行った予備実験により、UPATrap システムが RENKA で機能することは確認済みである（未発表データ。平成 18 年度新潟大学プロジェクト推進経費、若手研究者奨励研究の成果による）。また、ネガティブ選別マーカーの発現量の最適化を行う。我々の用いている TV にはネガティブ選別に用いるジフテリア毒素遺伝子 (DT) が組み込まれているが、DT の発現の強弱により、見かけ上の相同組換え効率が変化するという知見が得られていた（未発表データ）。そこで、DT 発現のために通常用いている MC1 プロモーターと CAG プロモーターを比較し、相同組換え効率の高いものを選択する。

(3) ES 細胞での相同組換え、NHEJ の分子

機構の制御。

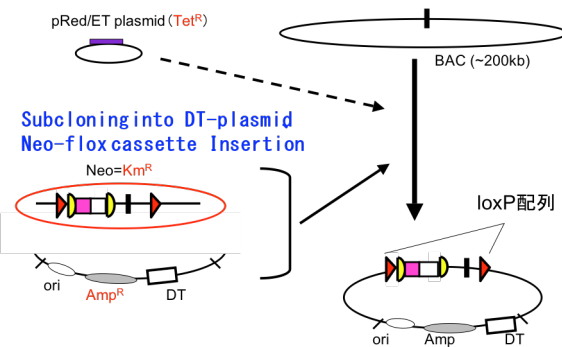
真核生物での主要な DNA 組換えは相同組換えと NHEJ である。相同組換えの促進または NHEJ の抑制により、相同組換え体を効率的に取得できることが予想される。そこで ES 細胞に相同組換え関連タンパクの過剰発現、または RNAi による NHEJ 関連タンパクの発現抑制等の前処置を行い、相同組換え効率を検証する。また、これらの操作が ES 細胞の分化全能性へ影響を与えないことを確認する。

4. 研究成果

(1) TV 作製の効率化のため、BAC-Red/ET システムと Multisite Gateway を組み合わせたポリ A トラップ型 TV 作製法の確立を研究協力者と共に行い、19 年度中に実用化することができた。また、BAC-Red/ET システムを用いた TV 作製法にさらなる改良を加える事で、極めて迅速な TV 作製を可能とした（図 1、flox 変異導入型 TV の構築例）。

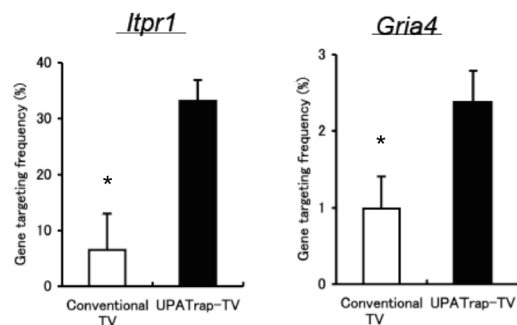
図1.

Red/ET-Based Method (flox vector, 1ステップ型)



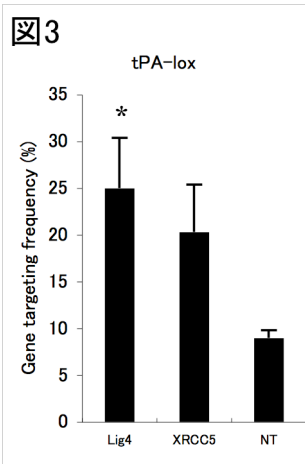
(2) ポリ A トラップ型 TV による相同組換え効率の上昇効果を確認し（図 2、*Iptr1* および *Gria4* 遺伝子を標的とした TV における、従来型 TV (conventional TV) とポリ A トラップ型 TV (UPATrap-TV) との相同組換え効率の比較）、第 30 回日本分子生物学会年会においてポスター発表を行った。相同組換え体

図2.



のクローニングのためのネガティブ選別に用いるジフテリア毒素遺伝子の発現プロモーターの選定を行い、現在は主に CAG プロモーターを使用することで、安定して相同組換え体を取得することができている。

(3)相同組換え関連タンパクの発現ベクター導入と、NHEJ 関連タンパクの RNAi による発現抑制の効果を検証し、NHEJ 関連タンパクの RNAi により有意に相同組換え効率を上昇させる手法を確立することができた (図 3、組織プラスミノーゲン活性化因子 (tPA) を標的とする flox 型 TV における RNAi 前処置と非前処置による相同組換え効率の変化。NHEJ 関連タンパク (Lig4 および XRCC5) の抑制は、コントロール RNA (NT) 処置に比較して、組換え効率を上昇させた)。



上記(1)~(3)で開発した手法を適用する事で、従来の条件では平均 1%以下であった相同組換え効率を約 4.5%にまで上昇させ (表 1、従来の条件 (旧条件) と、本研究課題で開発された手法を適用した実験条件 (新条件) での相同組換え効率の比較)、生殖系列伝達するキメラマウスを多数樹立する事ができた。

表 1

	解析クローン数	相同組換え体数	相同組換え効率 (%)
旧条件	10342	81	0.78
新条件	1972	89	4.51

以上の結果より、シナプス機能分子を標的とした遺伝子改変マウスの系統的作製システムの開発という、本研究課題の目的を達成することができたと考えられる。

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 4 件)

① Moos MP, Mewburn JD, Kan FW, Ishii S, Abe M, Sakimura K, Noguchi K, Shimizu T, Funk CD. Cysteinyl leukotriene 2 receptor-mediated vascular permeability via transendothelial vesicle transport. **The FASEB Journal**, **12**, 1352-1362. (2008) 査読有

② 崎村建司、阿部学、山崎真弥、薄井宏 ノックアウトマウス作製の現状と方向性 **蛋白質核酸酵素** 第 53 巻、1383-1391 (2008) 査読無

③ Miya K, Inoue R, Takata Y, Abe M, Natsume R, Sakimura K, Hongou K, Miyawaki T, Mori H. Serine racemase is predominantly localized in neurons in mouse brain. **The Journal of Comparative Neurology** **510**, 641-654 (2008) 査読有

④ 崎村建司、阿部学、山崎真弥、薄井宏 新時代のジーンターゲットング：その問題点と展望 **生化学** 第 79 巻、340-349 (2007) 査読無

[学会発表] (計 2 件)

① 阿部学、石田靖雅、崎村建司 C57BL/6 マウス胚性幹細胞における相同組換えの効率化；UPATrap システムの応用 第 30 回日本分子生物学会年会 2007 年 12 月 14 日 横浜

② 長澤寿磨、薄井宏、山崎真弥、夏目里恵、阿部学、崎村建司 C57BL/6 純系ドーパミン受容体 D2R-floxed マウスと D2R-Cre マウスの作製 第 31 回日本分子生物学会年会 2008 年 12 月 12 日 神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.bri.niigata-u.ac.jp/~cellular/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

阿部学 (ABE MANABU)
新潟大学・脳研究所・助教
研究者番号：10334674

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し