

機関番号：17401  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2008～2010  
 課題番号：20300146  
 研究課題名（和文） 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  
 研究課題名（英文） Expression Analysis of the Exchangeable Gene Trap Clones by X-gal Staining  
 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

研究成果の概要（和文）：可変型遺伝子トラップクローンデータベース（EGTC）に登録しているプロモータートラップマウスの発現解析を行った。84 ラインについて発現解析を行い、既に67 ラインについてEGTCで公開している。多くの場合、複数の臓器で強いX-gal染色像が得られ、その結果はEST profile (Unigene)のTPM (transcripts per million)値と相関していなかった。このことは、プロモーターリソースとして考える場合に、実際にレポーター遺伝子の発現パターンを調べる事が重要である事を示している。

研究成果の概要（英文）： We investigated the expression pattern of the established EGTC mouse lines by X-gal staining. We have analyzed 84 mouse lines, and opened expression patterns of 67 clones. In many case, multiple organs showed strong expression of beta-geo protein. There are almost no relationship between X-gal staining results and TPM (transcripts per million) scores of the EST profile (Unigene). This finding shows the importance of actually monitoring the expression pattern of the reporter gene, when we consider it as promoter resources to produce transgenic mice.

#### 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

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：リサーチバイオリソース

#### 1. 研究開始当初の背景

##### (1) 研究の学術的背景

我々が開発した一連のプロモータートラップベクターは、レポーター遺伝子であるβ-geoの開始コドンとスプライスアクセプターの間を終止コドンを配置してある。そのためトラップした遺伝子の開始コドン周辺にベクターが挿入されている頻度が高く、ノックアウトマウスがヌルになる確率が高い。

また、可変型遺伝子トラップクローンであ

る特徴を活かして、レポーター遺伝子を任意の遺伝子に置換することが可能である。

従って、マウス個体におけるレポーター遺伝子の発現パターンを調べることにより、目的の部位で任意の遺伝子を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を構築することが出来る。

##### (2) 学術的な特色・独創的な点

ゲノム情報から生命をシステムとして理

解するためにはモデル生物の存在が重要である。既知遺伝子のノックアウトマウスをひとつひとつ作製することも重要であるが、時間とコストがかかり効率的ではない。ドイツのGSF、アメリカのBay Genomics、イギリスのSanger Instituteなど、既にいくつかのグループが国家レベルのプロジェクトとして遺伝子トラップES細胞株を大量に産生している。我々も参加しているIGTC (International Gene Trap Consortium)には、全体で約8千遺伝子が登録されている(2007年10月現在)。しかしながら、これらはES細胞株に関するデータベースであり、マウスラインに関する情報はない。発現プロファイルを明らかにしたプロモータートラップマウスライブラリーはこれまでに存在しない。

また、2007年度のノーベル医学生理学賞はノックアウトマウス作製技術に与えられたが、今では時期特異的あるいは組織特異的に組換えを起こさせるコンディショナルノックアウトが主流である。従って、組換え酵素Creを時期特異的に、あるいは組織特異的に発現させることが求められている。EGTCに登録している可変型遺伝子トラップクローンは、容易にCre遺伝子をノックイン出来ることから、今後の医学薬学研究への貢献が期待される。

さらに最近になって、マウスゲノムには遺伝子の数よりもはるかに多くのプロモーターが存在することが報告されている。ひとつの遺伝子に組織特異的な複数のプロモーターが有ることは以前から知られていた事実であるが、遺伝子とは考えられない部分にもプロモーター活性があることが報告されている。実際に、我々のトラップクローンの中にも、該当するクローンが数多く存在する。この様なプロモーターにどういう意義があるのかは全く不明であり、その発現プロファイルを検討することから新しい知見が得られると期待される。

## 2. 研究の目的

我々は、部位特異的組換えシステムであるCre-loxシステムを応用し、単純なノックアウトマウスよりも優れている『可変型遺伝子トラップ法』を世界に先駆けて開発し、データベース『EGTC』(Database for the Exchangeable Gene Trap clones)を構築し、全世界に公開している。本研究は、EGTCに登録し、マウスラインを樹立したクローンについて、トラップしたプロモーターの発現プロファイルを作成し、任意のノックインマウスを効率良く作製するためのプロモータートラップマウスライブラリーを構築することを目的としている。

## 3. 研究の方法

### (1) マウスラインの樹立

本研究を開始した2008年3月末の時点で、EGTCに登録しているES細胞株は425クローン、CARD R-BASEに登録したマウスラインは147系統であった。EGTCをより充実させるために、新たな可変型遺伝子トラップクローンのピックアップを行い、トラップした遺伝子を解析し、5' RACE産物をGSS (Genome Suetvey Sequence)としてDDBJ/EMBL/GenBankに登録し、EGTCに登録する。

また、ES細胞からキメラマウスを作製し、マウスラインを樹立し、CARD R-BASEに寄託する。

### (2) プロモーター活性の解析

EGTCに登録し、マウスラインを樹立したクローンの中から、ATGよりも上流にベクターが挿入されたクローンを選択し、まずユビキタな発現をすることが知られている既知遺伝子を用いてプロトコルの検討を行う。次に、部位特異的な発現を示すことが知られている既知遺伝子について、ヘテロ接合体マウスにおける $\beta$ -geoの発現パターンをX-gal染色で調べる。並行してプロモーター活性を分かり易く示す写真の撮り方を検討する。

### (3) データベース作成

20系統以上のデータがそろったら、データベースの仮公開を行う。しばらく運用し、特に問題無ければ正式に公開を始める。3年目以降は、既知遺伝子だけでなく、ESTや未知遺伝子も含めて解析を行い、プロモータートラップマウスライブラリーを充実させていく。

## 4. 研究成果

### (1) EGTCデータベースの整備

2008年4月から2011年3月末までの3年間に、新たに558クローンをEGTCに登録した(図1)。

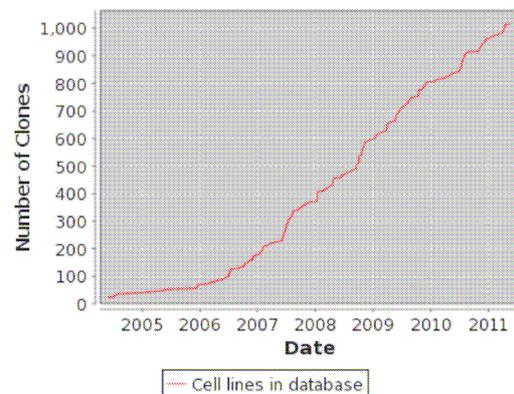


図1 EGTC登録クローン数の推移

5' RACE でトラップした遺伝子を同定し、

マウス染色体上の位置を決定した (図2)。

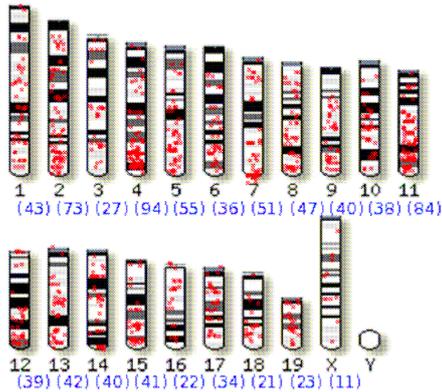


図2 トラップした遺伝子のマウス染色体へのマッピング

また、2009年10月には、EGTCデータベースのリニューアルを行い、研究者に役立つさまざまな情報を提供している。

< EGTC URL; <http://egtc.jp> >

2011年5月20日現在の登録数は1014である。そのうち360クローンについてキメラマウスを作製し、マウスラインを樹立し、CARD-R-BASEに寄託している。

### (2) プロモーター活性の解析

EGTCに登録している可変型遺伝子トラップクローンの中から、ベクター挿入部位がトラップした遺伝子のATG近傍であるクローンをリストアップした。ヘテロ接合体マウス(アダルト) ♂♀各2匹と、ネガティブリッターメイト ♂♀各1匹の、各種組織のホルマウントX-gal染色を行った。また、プロモーター活性を分かり易く示す画像取得方法を模索し、最終的に全ての組織をデジタルカメラで用いて一括して撮影することに決定した(図3)。図では、各組織の左側がヘテロ接合体、右側がワイルドタイプである。3年間でトータル84クローンの解析を行った。

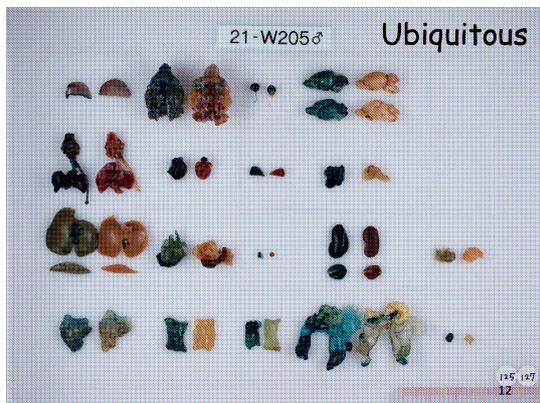


図3 ユビキタスな発現パターン例 (Ayu21-W205, ♂)

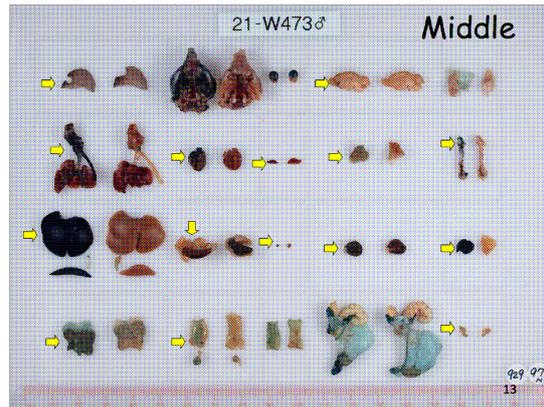


図4 少し広い発現パターン例 (21-W473, ♂)

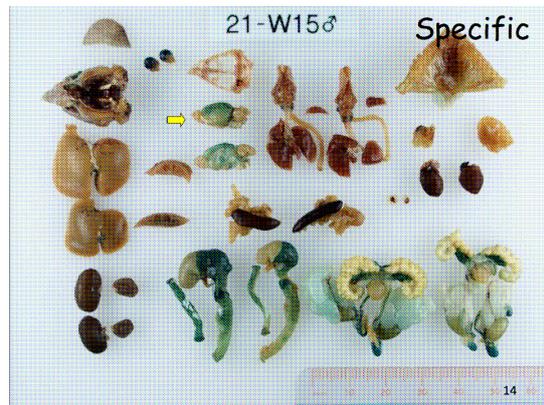


図5 組織特異的な発現パターン例 (21-W15, ♂)

### (3) データベースの作成

当初はX-gal染色像を独立させた、新たなデータベースの作成を考えていた。しかしながらEGTCのリニューアルを進める際に、EGTCの中にX-gal染色画像データも含める方が、プロモータートラップマウスライブラリーとしてより有効であるとの結論に至った。

そこで、EGTCのクローン詳細情報ページの中に「Expression Information」というコーナーを新設し、X-gal染色を行った各種組織の写真を2010年6月から公開している。2011年5月16日現在、67クローンの発現プロファイルデータをEGTCに登録している。公開当初はどのラインにX-gal染色データが登録されているか分からない状態であったが、簡単に探せる様に検索機能のバージョンアップを2011年4月に行った。

Search By Keyword

Filter By	Field <input type="text" value="All"/>	Word <input type="text"/>
	<input checked="" type="checkbox"/> has Expression Information	
Order By	<input type="text" value="Last Update"/> <input type="radio"/> Ascending <input checked="" type="radio"/> Descending	
Page Size	<input type="text" value="20"/>	
<input type="button" value="Search"/> <input type="button" value="Browse All Clones"/>		

図6 検索画面

Last Update	EGTC ID	Gene Name	Gene Symbol	Card ID	Expression Information
2011.05.12	21-W333	Williams-Beuren syndrome chromosome region 16 homolog (human)	Wbscr16	1744	Male / Female
2011.05.09	21-W359	nonhomologous end-joining factor 1	Nhej1	1737	Male / Female
2011.04.22	21-W377	zinc finger protein 13	Zfp13	1695	Male / Female
2011.04.22	21-W358	supervillin	Svil	1692	Male / Female
2011.04.22	21-W371	angiogenin, ribonuclease, RNase A family, 5	Ang	1693	Male / Female
2011.04.22	21-W392	RIKEN cDNA 6820431F20 gene	6820431F20Rik	1696	Male / Female
2011.04.14	21-W199	Dicer1, Dcr-1 homolog (Drosophila)	Dicer1	1689	Male / Female

図7 検索結果の例

(4) X-gal 染色を行なったトラップマウスライン (トラップした遺伝子)

21-T3 (Ehbp1), 21-T35 (Pitpnc1), 21-T57 (Fbxo17), 21-T62 (Gzf1), 21-T73 (Rbpm5), 21-T152 (Tect1), 21-T162 (Tspan9), 21-T175 (Pus1), 21-T180 (0610007L01Rik), 21-T222 (Nln), 21-T242 (Itpk1), 21-T287 (Sfxn1), 21-T354 (Pkig), 21-T323 (Alad), 21-T160 (3110056003Rik), 21-T247 (Tnrc6a), 21-T288 (Et14), 21-T253 (Mutyh), 21-T299 (Klf12), 21-T327 (Fblim1), 21-T408 (Gas5), 21-T519 (Fry1), 21-W6 (Ctnd1), 21-W15 (Mettl2), 21-W18 (Ube3c), 21-W24 (N4bp212), 21-W60 (Lpp), 21-W74 (Fkbp4), 21-W76 (Srr), 21-W83 (Epb4.111) 21-W85 (Ube2n), 21-W116 (Cirh1a), 21-W126 (Elov16), 21-W128 (Raly), 21-W134 (Mphosph9), 21-W138 (Ubiad1), 21-W140 (Notch2), 21-W174 (Cops4), 21-W189 (Cox4i1), 21-W191 (Cab391), 21-W194 (Ipo11), 21-W196 (Rpl30), 21-W199 (Dicer1), 21-W201 (Stag1), 21-W205 (Stag1), 21-W229 (B4gal15), 21-W230 (Lrrc8d), 21-W244 (Dcakd), 21-W246 (Eif2c1), 21-W247 (Nfyb), 21-W254 (Sorbs1), 21-W256 (1110059E24Rik), 21-W265 (Tex2), 21-W266 (Ywhag), 21-W267 (Hdac4), 21-W270 (Polr2j), 21-W282 (Arf3), 21-W286 (Map2k2), 21-W290 (Nbr1), 21-W303 (Parvb), 21-W315 (Rail4), 21-W333 (Wbscr16), 21-W358 (Svil), 21-W359 (Nhej1), 21-W371 (Ang), 21-W373 (Slc38a2), 21-W377 (Zfp13), 21-W392 (6820), 21-W399 (Sreb2), 21-W411 (Ndufa12), 21-W414 (St3gal4), 21-W419 (Slc45a3), 21-W456 (Ppat), 21-W473 (Slc38a4), 21-W478 (Epn2), 21-W480 (Wdr20a), 21-W496 (Cd9), 21-KBW60 (Tcf12), 21-KBW75 (Ptprg), 21-KBW90 (Etfb), 21-KBW100 (Chd11), 21-KBW110 (Traf3ip2), 21-KBW131 (Suclg2)

#### (5) 考察

2割程度のラインについて、組織特異的な発現パターンが検出された (図5)。しかしながら、より多くのラインはユビキタスまた

は中間の発現パターンを示した (図3 & 4)。図8は発現パターンの特異性をまとめたものである。縦軸は検査した全ての組織の中で X-gal 染色で染まった組織の割合を示している。横軸は個々のマウスラインを表し、左側がユビキタスな発現パターン、右側が特異的な発現パターンのラインになる。

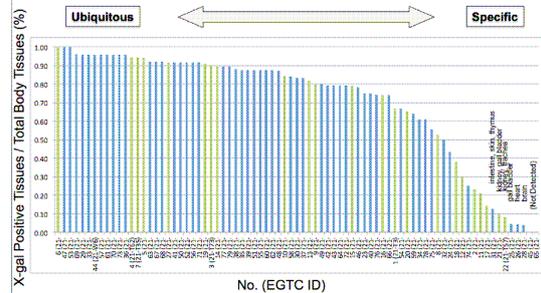


図8 発現の特異性

解析した 84 ラインの中で、2 ラインはアダルトマウスの各種臓器の X-gal 染色で全く染まらなかった。このことは、ES 細胞及び胎児期に発現しアダルトでは発現しない遺伝子である事を示唆している。

また、9 ラインにおいて、♂と♀で異なる発現パターンが確認された。



図9 ♂と♀で発現パターンが異なる例 (21-W126)

さらに X-gal 染色で得られた結果は、EST profile (Unigene) の TPM (transcripts per million) 値と相関していなかった。このことは、可変型遺伝子トラップクローンをプロモーターリソースとして考える場合に、実際にレポーター遺伝子の発現パターンを調べる事が重要である事を示している。Cre-driver など、組織特異的に目的の遺伝子を発現させたいと考えている研究者にとって、大変重要なデータベースであると考えられる。

#### (6) 今後の展望

本研究の成果を踏まえて、基盤研究 B 『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』 (H23~25) を申請し、採択された。組織特異的な発現パターンを示したラインを中心に、レポーター遺伝子を Cre 遺伝子に置換し、Cre-driver マウスラインを樹立し、新たなデータベースを構築・公開する予定である。

また、EGTC データベースの中には、Non Coding RNA をトラップしているクローンや、遺伝子とは考えられない部分にマップされるクローンも数多く存在する。今後、このようなトラップクローンについてもマウスラインを樹立し、プロモーター活性を解析し、興味深い発現パターンを示すクローンについては表現型の解析も進めたいと考えている。

#### 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 3 4 件)

- ① The anaphase-promoting complex /cyclosome Activator Cdh1 modulates Rho GTPase by targeting p190 RhoGAP for degradation., Naoe, H., Araki, K. (9 人省略、2 番目), *Mol. Cell Biol.*, 30, 3994-4005 (2010). (査読有)
- ② Comparative analysis of right-element mutant lox sites on recombination efficiency in embryonic stem cells. Araki, K., Okada, Y., Araki, M., Yamamura, K., *BMC Biotechnol.*, 10, 29 (2010) (査読有)
- ③ Role of endogenous retroviruses in murine SLE., Baudino, L., Yoshinobu, K., Morito, N., Santiago-Raber, M. L., Izui, S., *Autoimmun. Rev.*, 10, 27-34 (2010). (査読有)
- ④ Basonuclin 2 has a function in the multiplication of embryonic craniofacial mesenchymal cells and is orthologous to disco proteins., Vanhoutteghem, A., Araki, M., Araki, K. (8 人省略、8 & 9 番目), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 106, 14432-14437 (2009). (査読有)
- ⑤ HMG1 is induced by Wnt/beta-catenin pathway and maintains cell proliferation in gastric cancer., Akaboshi, S., Araki, K. (9 人省略、6 番目), *Am. J. Pathol.*, 175, 1675-1685 (2009). (査読有)
- ⑥ International Gene Trap Project: towards gene-driven saturation mutagenesis in mice., Araki, M., Araki, K., Yamamura, K., *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 10, 221-229 (2009). (査読有)
- ⑦ Inconsistency between hepatic expression and serum concentration of transthyretin in mice humanized at the transthyretin locus., Zhao, G., Araki, K., Araki, M. (6 人省略、3 & 6 番目) *Genes to Cells*, 13, 1257-1268 (2009). (査読有)
- ⑧ 『IGTC: ノックアウトマウスを作製する前にチェックすべき変異ESデータベース』、荒木正健、荒木喜美、細胞工学別冊『バイオ

リソース&データベース活用術: Webでキャッチ!! 実験材料・インフォマティクス』、72-80(2009). (査読なし)

- ⑨ Selective up-regulation of intact, but not defective env RNAs of endogenous modified polytropic retrovirus by the Sgp3 locus of lupus-prone mice., Yoshinobu, K., (7 人省略、1 番目), *J. Immunol.*, 182, 8094-8103 (2009). (査読有)
- ⑩ Suppression of cardiac troponin T induces reduction of contractility and structural disorganization in chicken cardiomyocytes. Toyota, N., Takano-Ohmuro, H., Yoshida, L. S., Araki, M., Yoshinobu, K., Suzuki-Toyota, F., *Cell Struct. Funct.*, 33, 193-201 (2008). (査読有)
- ⑪ Early pre-implantation lethality in mice carrying truncated mutation in the RNA polymerase 1-2 gene., Chen, H., Li, Z., Haruna, K., Semba, K., Araki, M., Yamamura, K., Araki, K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 365, 634-642 (2008). (査読有)
- ⑫ Dissection of Genetic Mechanisms Governing the Expression of Serum Retroviral gp70 Implicated in Murine Lupus Nephritis., Baudino, L., Yoshinobu, K., (12 人省略、2 番目), *J. Immunology*, 181, 2846-2854 (2008). (査読有)

[学会発表] (計 3 3 件)

- ① 可変型遺伝子トラップマウスのプロモーター発現プロファイル解析。吉信公美子、第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月 7 日～10 日 (神戸ポートアイランド)。
- ② EGTC マウスラインの KEGG パスウェイ解析。荒木正健、第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月 7 日～10 日 (神戸ポートアイランド)。
- ③ 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効率の検討。荒木喜美、第 33 回日本分子生物学会、2010 年 12 月 7 日～10 日 (神戸ポートアイランド)。
- ④ 可変型遺伝子トラップマウス of X-gal 染色による発現解析。荒木正健、第 57 回日本実験動物学会、2010 年 5 月 12 日～14 日 (京都テルサ)。
- ⑤ 可変型遺伝子トラップマウスを利用した遺伝子発現プロファイル解析。吉信公美子、第 32 回日本分子生物学会、2009 年 12 月 9 日～12 日 (パシフィコ横浜)。

[図書] (計 1 件)

- ① ナショナルバイオリソースプロジェクト情報運営委員会 (代表 山崎由紀子 & 荒木正健) 監修、秀潤社、細胞工学別冊『バイオ

リソース&データベース活用術』Web でキャッチ！！実験材料・インフォマティクス、2009年、294 ページ。

熊本大学・生命資源研究・支援センター・助教

研究者番号：20274730

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

①名称：ヘルパーES細胞を用いることで多能性幹細胞から効率良く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

番号：特願 2010-194910

出願年月日：平成22年8月31日

国内外の別：国内

②名称：EGTC

発明者：荒木正健、荒木喜美、山村研一

権利者：国立大学法人熊本大学

種類：商標

番号：商願 2009-086791

取得年月日：平成21年11月16日

国内外の別：国内

○取得状況（計1件）

①名称：EGTC

発明者：荒木正健、荒木喜美、山村研一

権利者：国立大学法人熊本大学

種類：商標

番号：登録第5320753号

取得年月日：平成22年4月30日

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

① EGTC <http://egtc.jp>

② 熊本大学 生命資源研究・支援センター  
遺伝子実験施設 <http://gtc.egtc.jp>

## 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)