

機関番号：32644  
 研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2008 ~ 2010  
 課題番号：20700368  
 研究課題名 (和文) in vivo RMCE 法の開発と、それを利用した疾患感受性遺伝子の機能解析  
 研究課題名 (英文) Development and application of novel transgenic technology by in vivo RMCE  
 研究代表者  
 大塚 正人 ( OHTSUKA MASATO )  
 東海大学・医学部・講師  
 研究者番号：90372945

## 研究成果の概要 (和文)：

本研究では、ES 細胞を介さず、狙った遺伝子座位へ目的遺伝子を導入する Tg マウス作製新手法 (in vivo RMCE 法) を開発した。既に樹立した種マウス (*Rosa26* 座位に変異 loxP 配列が挿入してあるもの) から得た受精卵に、変異 loxP 配列を有する導入ベクターを Cre ベクターと共導入し、目的の Tg 個体を得ることに成功した。これまでに 25 系統の Tg ラインを樹立しているが、得られたマウスの目的遺伝子発現は、強く、安定しており、再現性のあるものであった。本手法はノックダウンマウス作製にも有効であった。

## 研究成果の概要 (英文)：

This study established a targeted transgenesis system based on Cre-loxP site-specific recombination in fertilized eggs, but not in ES cells. A transgene, flanked by two mutant loxP sites, was integrated into target loci in the seed mice (containing loxP-site derivatives at *Rosa26* locus) by recombinase-mediated cassette exchange (RMCE) in fertilized eggs. By applying this method, we have established a total of 25 transgenic lines showing ubiquitous, strong, and reproducible transgene expression. We also demonstrated that knockdown mice can be readily generated by PITT by taking advantage of our reproducible and highly efficient expression system.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：遺伝子工学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：Cre-loxP システム、RMCE 法、トランスジェニックマウス、蛍光遺伝子、顕微注入法、*Rosa26* 遺伝子座位

## 1. 研究開始当初の背景

トランスジェニック (Tg) マウスは、遺伝子

機能解析や、病態解析・治療薬開発に有用な疾患モデル動物として幅広い分野で不可欠

なツールである。その作製法は、受精卵に目的遺伝子を顕微注入する方法が一般的であるが、この場合、遺伝子の挿入位置やコピー数を制御できないので、結果として、得られた Tg 系統間で導入遺伝子発現がばらつくことが多々ある。従って、複数系統の Tg ラインを樹立して表現型が統一しているかを調べるなどの必要があり、コスト、時間、労力を要する。これを回避する手法としては、ES 細胞内での相同組換えを利用した遺伝子ターゲティング法があり、これにより導入位置とコピー数をコントロール可能である。しかし、相同組換え効率が低い（数%）為に多くのコロニーを捨わなくてはならず、また、ES 細胞の品質次第では生殖系列に移行しないクローンもあるなどして、Tg ラインが確立されるまでに多くの時間、コスト、及び労力を要する。

申請者が所属していた研究室では、慢性関節リウマチや高血圧等ヒト疾患感受性遺伝子を、遺伝学的手法を用いて探索しており、既に幾つもの候補遺伝子を単離していた。それら遺伝子の個体レベルでの解析を行う上で、多種類の Tg マウスを作製し、DNA 多型の影響を含めた候補遺伝子の検証、機能解析や疾患モデル作製を行うことを考えていた。SNP 等の多型の微細な影響を比較解析するためには、導入遺伝子が再現性良く発現することが重要であるため、それを可能とする新たな Tg マウス作製法の開発が望まれていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、導入遺伝子の再現性良い発現が約束される Tg マウス作製技術の開発を目指した。その為には、予め決められた遺伝子座位に目的遺伝子を挿入することが望ましい。そこで、マウス受精卵への顕微注入法に Cre-loxP 部位特異的組換え系を応用することにより、ES 細胞を介さず、狙った遺伝子座位へ目的遺伝子を導入する Tg マウス作製新手法 (*in vivo* RMCE 法：図 1) を開発し、将来的に疾患感受性遺伝子の機能解析へ応用することを目指した。この新たな Tg マウス作製法を開発することにより、上述した既存の手法のデメリットを完全に回避することが可能となる。そこで、新手法の確立と効率の検証、作製された Tg マウスにおける遺伝子発現の検証、を目的として研究を進め、さらにノックダウン Tg マウス作製への応用、及び確立したシステムの改良を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 手法の確立と効率の検証

トランスジーンとして導入したい遺伝子発現カセットを、変異 loxP 配列 (JTZ17 と lox2272) を有したドナーベクターに挿入し、導入ベクターを作製した。全て CAG プロモ-

ターを含んだコンストラクトである。

既に作製してある種マウス (*Rosa26*、あるいは *H2-Tw3* 遺伝子座位に変異型 loxP 配列 [JT15 と lox2272] が挿入してあるもの) から得られた受精卵の前核に、上記導入ベクターと、Cre 発現ベクターを共注入した。得られた仔マウスについては、耳片からゲノム DNA を抽出し、PCR 法で Tg マウスか否かを確認した。目的のマウスが得られた場合には、野生型マウスと交配し、次世代にトランスジーンが伝わることを確認した。この段階では、目的遺伝子の他に、ベクター部分を含めて余分な配列が残っていることから (RMCE<sup>ex</sup> アリル)、FLPe 発現プラスミドを顕微注入するか、FLPe マウスと交配することにより、余分な配列の除去を行った (RMCE<sup>Δex</sup> アリル) (図 1)。

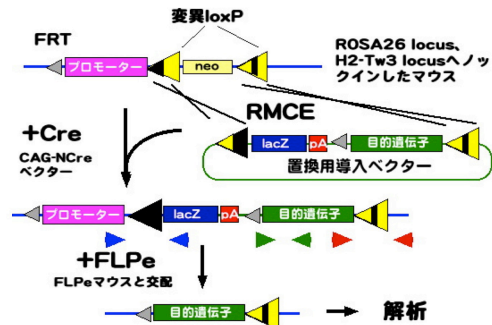


図1) システムの概略

### (2) 作製された Tg マウスにおける遺伝子発現の検証

様々な蛍光遺伝子を強発現する Tg マウスを本手法で作製し、その発現の強さ、安定性、再現性について、蛍光発現を指標に調べた。具体的には、脾臓細胞を採取して FACS により蛍光遺伝子発現の強度と系統間の差 (再現性) を検討した。また、各種臓器を採取し、蛍光顕微鏡下で蛍光遺伝子発現を調べた。これは、RMCE<sup>ex</sup> アリルと RMCE<sup>Δex</sup> アリルの両方に関して行った。さらに、いくつかの臓器に関しては、凍結切片を作成し、蛍光顕微鏡下で蛍光遺伝子発現の安定性を検証した。

### (3) ノックダウン Tg マウス作製への応用

毛色で容易にノックダウン効果が判別可能であると期待されるチロシナーゼ (*Tyr*) 遺伝子をターゲットとし、*in vivo* RMCE 法を用いて実際に *Tyr* ノックダウンマウス作製を行った。人工 miRNA 配列は、Invitrogen の BLOCK-iT<sup>TM</sup> Pol II *miR* RNAi デザイナーを利用し、ウェブサイト上で行った。得られた Tg マウスに関しては、毛色、及び miRNA 量 (qPCR による) を調べた。

### (4) システムの改良

RMCE<sup>Δex</sup> アリルを得るために必要であった、FLPe 発現プラスミドの顕微注入、あるいは

FLPe マウスとの交配のステップを省略するために、FLPe 発現カセットを導入ベクター内に組み込んだ新ベクターを作製した。大腸菌内での維持が不安定なゲノム領域を安定して維持するために、低コピーの pBR322 ベクターを用いた。また、1 回の顕微注射時に使用する雄マウスの数を減らすために、自然交配ではなく、体外受精卵を利用した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 手法の確立と効率の検証

11 種類以上の導入ベクターを作製した。多くは、Tg マウスを蛍光観察で容易に判定できるよう、目的遺伝子として各種蛍光遺伝子を強発現するベクターである。

種マウスの受精卵に、作製したベクターと Cre 発現ベクターとを同時に顕微注射して得られた仔マウスの遺伝子タイピングを行った結果、4% 強の個体で導入コンストラクトが目的の遺伝子座位に挿入されていた (表 1)。また、全てのコンストラクトについて、目的の Tg マウスを得ることができた。さらに、その中の 85% 以上のマウスについて、次世代に導入遺伝子が伝わることを確認している。この結果は、顕微注射法で様々な遺伝子コンストラクトを既知の領域に挿入し、複数の Tg マウス系統 (次世代への伝播を確認済み) を得た世界初の例となった。開発した *in vivo* RMCE システムは、従来の Tg マウス作製法と同様の労力でルーチンに実行可能であると考えられた。本手法を、我々は独自に pronuclear injection-based targeted transgenesis (PITT) 法と名付けた。

表 1: PITT 効率

Plasmids injected	Locus	Eggs injected	Embryos transferred	Pups obtained <sup>a</sup>	Random integration (%; b/a*100)	PITT <sup>b</sup>
pAMF	<i>H2-Tw3</i>	238	102	40	1	2 (5.0)
pAMG	<i>ROSA26</i>	296	127	42	3	1 (2.4)
pAMJ	<i>ROSA26</i>	273	199	40	0	1 (2.5)
pANQ	<i>ROSA26</i>	261	130	37	1	1 (2.7)
pAOB	<i>ROSA26</i>	51	36	16	0	1 (6.3)
pAOF	<i>ROSA26</i>	351	159	50	0	2 (4.0)
pAOK	<i>ROSA26</i>	364	158	44	1	1 (2.3)
pAOL	<i>ROSA26</i>	529	327	67	2	4 (6.0)
pAOM	<i>ROSA26</i>	311	171	31	0	3 (9.7)
pAOT	<i>ROSA26</i>	291	152	54	1	3 (5.6)
pAOU	<i>ROSA26</i>	291	232	71	1	2 (2.8)
<b>total</b>		<b>3256</b>	<b>1793</b>	<b>492</b>	<b>10</b>	<b>21 (4.3)</b>

##### (2) 作製された Tg マウスにおける遺伝子発現の検証

これまでに、様々な蛍光遺伝子を強発現する Tg マウスをライン化している。全て同じ遺伝子座位に同様のコンストラクトが挿入されたものであるが、その発現の強さ、安定性、再現性について、蛍光発現を指標に調べた結果、安定した強い蛍光が、全てのマウス系統で確認された。また数世代経ても安定したも

のであった。既存の蛍光遺伝子発現マウスよりも広範囲の組織で再現性よい発現パターンを示していたことから、従来の手法 (ランダム挿入によるトランスジェネシス) の欠点が大きく改善されたと言えるだけでなく、これらのマウスが移植実験やキメラ解析等に有用なリソースとなりうることも期待された (図 2)。ちなみに、上述した結果は、RMCE<sup>Δex</sup>アレルを用いて得られたものである。一方、ベクター配列等の余分な配列を含む RMCE<sup>ex</sup>アレルでは、蛍光遺伝子発現に再現性、及び安定性は見られなかったことから、余分な配列を除去し RMCE<sup>Δex</sup>アレルを作製することは必須であると考えられた。

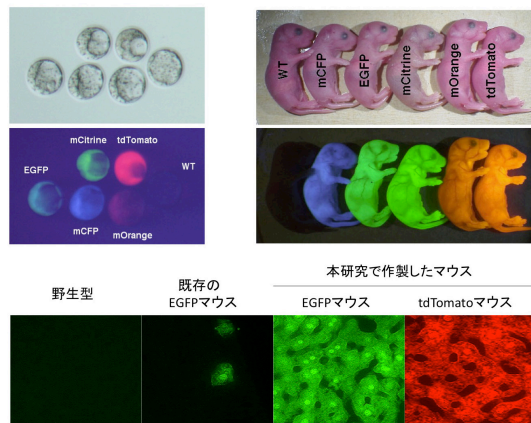


図 2) 得られた Tg マウスにおける蛍光遺伝子発現 (下は肝臓の凍結切片)

##### (3) ノックダウン Tg マウス作製への応用

導入遺伝子の再現性良い強発現が可能である本手法が、ノックダウンマウス作製に応用可能であることを示した。*Tyr* miRNA トランスジェニックマウスでは、野生型マウスと比較して薄い毛色を示していた (図 3)。*Tyr* 遺伝子 mRNA 量も 10-20% 程度に減少していた。内在性 miRNA 経路を飽和してしまうことによる致死的な影響もないようであった。この結果から、確立した *in vivo* RMCE 法とそれによる強発現システムは、個体レベルでの「gain-of-function」だけでなく、「



図 3) *Tyr* ノックダウンマウス



loss-of-function」解析を目指した遺伝子改変マウスを作製する上でも、強力な手法となりうると期待された。

#### (4) システムの改良

余分な配列を除去する為の FLPe 発現カセットを導入ベクター内に組み込むことにより、解析に使用しうるマウスを1世代早く得ることに成功した。また、この第二世代のベクター (3種類) を用いて、新たな Tg マウス作製を行ったが、全ての系統 (5 系統) で生殖系列に伝播する Tg 個体が得られたことから、PITT 法 (*in vivo* RMCE 法) の実用性を再確認することができた (図4、表2)。

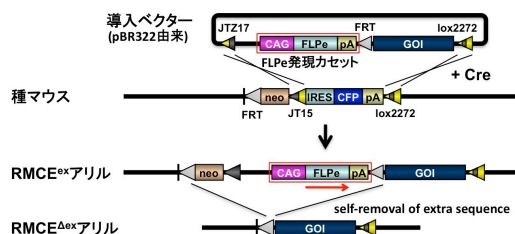


図4) 導入ベクターの改良

表2: 新たな導入ベクターを用いてのPITT効率

Plasmids injected	Eggs injected	Embryos transferred	Pups obtained*	Random integration (%; b/a*100 [95%CI])	PITT <sup>b</sup>	*RMCE <sup>ex</sup> allele
pAWK	304	170	9	0	1 (11.1 [0.3-48.2])	0
pAWV	290	172	30	1	3 (10.0 [2.1-26.5])	2
pAXV	305	186	54	N.D.	1 (1.9 [0.0-9.9])	1
<b>total</b>	<b>899</b>	<b>528</b>	<b>93</b>	<b>-</b>	<b>5 (6.4 [1.8-12.1])</b>	<b>3</b>

#### (5) まとめ

本研究では、マウス受精卵への顕微注入法を介して、予め指定された遺伝子座位に DNA コンストラクトを挿入させる新規 Tg マウス作製法”PITT 法”の開発に成功した。これは、従来のランダム挿入に基づく Tg マウスの欠点 (発現の安定性及び再現性が得られない) を克服し、マウス個体で非常に再現性良い遺伝子発現を実現するシステムであり、コスト・労力的にも優れている。目的遺伝子の強発現だけでなく、ノックダウンにもすぐに応用可能であり、次世代型の Tg マウス作製法として期待される。今後は、本手法の更なる効率改善、遺伝的背景の統一、組織特異的でコンディショナルな遺伝子発現への利用を目指し、各種疾患関連遺伝子の機能解析等に活用していきたい。

#### 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 6 件)

1. Ohtsuka M., Miura H., Nakaoka H. Kimura M., Sato M. and Inoko H. Targeted transgenesis through pronuclear injection of improved vectors into *in vitro* fertilized eggs. *Transgenic Res.* 査読有り in press (doi:10.1007/s11248-011-9505-y)
2. Ohtsuka M., Ogiwara S., Miura H., Mizutani A., Warita T., Sato M., Imai K., Hozumi K., Sato T., Tanaka M., Kimura M. and Inoko H. Pronuclear injection-based mouse targeted transgenesis for reproducible and highly efficient transgene expression *Nucleic Acids Res.* 査読有り 38, e198 (2010)
3. Kokubu C., Horie K., Abe K., Ikeda R., Mizuno S., Uno Y., Ogiwara S., Ohtsuka M., Isotani A., Okabe M., Imai K., and Takeda J. A transposon -based chromosomal engineering method to survey a large cis-regulatory landscape in the mouse genome. *Nat. Genet.* 査読有り 41, 946-952 (2009)
4. Ohtsuka M., Warita T., Sakurai T., Watanabe S., Inoko H. and Sato M. Development of CRTEIL and CETRIZ, Cre-loxP-based systems, which allow change of expression of red to green or green to red fluorescence up on transfection with a Cre expression vector. *J Biomed Biotechnol.* 査読有り 985140 (2009)
5. Ohtsuka M., Kimura, M., Tanaka, M. and Inoko, H. Recombinant DNA technologies for construction of precisely designed transgene constructs. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 査読有り 10, 244-251. (2009)
6. Nakamura S., Watanabe S., Ohtsuka M., Maehara T., Ishihara M., Yokomine T. and Sato M. Cre-loxP System As a Versatile Tool for Conferring Increased Levels of Tissue-Specific Gene Expression from a Weak Promoter. *Mol. Reprod. Dev.* 査読有り 75, 1085-1093 (2008)

[学会発表] (計 8 件)

1. 三浦浩美、木村穰、猪子英俊、大塚正人

Pronuclear injection -based targeted transgenesis for in vivo RNAi in the mouse  
第33回日本分子生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会、神戸ポートアイランド (兵庫)、2010年12月7日

2. Masato Ohtsuka, Hiromi Miura, Minoru Kimura, Hidetoshi Inoko  
Mouse targeted transgenesis through pronuclear injection  
Mouse Development, Genetics & Genomics 2010, CSHL Meetings, Cold Spring Harbor, USA, 2010年10月28日

3. 大塚正人、三浦浩美、木村穰、猪子英俊  
受精卵への顕微注入による、マウス部位特異的遺伝子導入法の開発  
第57回日本実験動物学会総会、京都テルサ(京都)、2010年5月12日

4. 三浦浩美、猪子英俊、木村穰、大塚正人  
人工 miRNA 発現コンストラクトの作製、検証とノックダウンマウス作製  
第 32 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009 年 12 月 11 日

5. 大塚正人、三浦浩美、荻原早苗、木村穰、猪子英俊  
マウス受精卵への顕微注入を介した、部位特異的遺伝子導入法の開発  
第 32 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、2009 年 12 月 11 日

6. 大塚正人、荻原早苗、三浦浩美、安藤美貴子、木村穰、猪子英俊  
Recombinase-mediated cassette exchange 法を用いた、各種蛍光遺伝子発現トランスジェニックマウスの作製  
第 56 回日本実験動物学会総会、大宮ソニックシティ、2009 年 5 月 15 日

7. 三浦浩美、荻原早苗、木村穰、猪子英俊、大塚正人  
RMCE法を用いた、赤色蛍光遺伝子tdTomatoトランスジェニックマウスの作製  
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、2008 年 12 月

8. 荻原早苗、木村穰、猪子英俊、大塚正人  
Recombinase-mediated cassette exchange 法の確立と、それによる eGFP トランスジェニックマウスの作製  
第 55 回日本実験動物学会総会、仙台、2008

年 5 月

[その他]  
ライカ顕微鏡フォトコンテスト 2010  
優秀賞受賞  
細胞工学 Vol130 No.2 2011 p194 に掲載

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大塚 正人 (OHTSUKA MASATO)  
東海大学・医学部・講師  
研究者番号：90372945