

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20710152

研究課題名 (和文) 新型遺伝子トラップ法による未知遺伝子の発掘と機能解析

研究課題名 (英文) Discovery and analysis of novel genes using a gene-trap approach

研究代表者

重岡 稔章 (SHIGEOKA TOSHIAKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号：40457148

研究成果の概要(和文)：

遺伝子トラップ法は、外来DNA断片をゲノムに挿入させることによって、網羅的に遺伝子を破壊する手法である。我々は、mRNA品質管理機構である nonsense-mediated mRNA decay (NMD)を抑制することにより、標的細胞での遺伝子の発現の有無に関わらずランダムに遺伝子を破壊する新型遺伝子トラップ法を開発した。この手法により多数の変異体 ES 細胞クローンを蓄積すると共に、破壊された遺伝子の部分配列を解読し、その配列情報の解析を行った結果、新型遺伝子トラップ法は未知遺伝子の網羅的な探索および機能破壊において非常に有用な手法であることが示された。

研究成果の概要(英文)：

Gene trapping is a mutagenesis technique by which an exogenous DNA fragment is randomly inserted into the genome to disrupt gene function. We developed a novel gene-trap strategy which suppresses nonsense-mediated mRNA decay (NMD) of the selectable-marker mRNA and permits the trapping of transcriptionally silent genes. By using this method, genes in mouse ES cells were randomly disrupted, and the cDNA fragments derived from the trapped genes were analyzed. In the result, we found that these cDNAs contain a significant number of novel cDNAs that show no homology to previously characterized genes in any database, indicating that our novel gene-trap strategy is a powerful tool for discovery and analysis of novel genes.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000円	510,000円	2,210,000円
2009年度	1,600,000円	480,000円	2,080,000円
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000円	990,000円	4,290,000円

研究分野:生物学

科研費の分科・細目:ゲノム科学・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

1. 研究開始当初の背景

(1) ノックアウトマウス・プロジェクトと UPATrap の開発

ポスト・ゲノムシーケンス時代の国際的な共同研究計画である「ノックアウトマウス・プロジェクト」が発表され、マウス ES 細胞中の全遺伝子を5年以内に破壊するべく、世界中の研究者に協力が呼びかけられた(文献1)。この計画の初期段階では、ノックアウトマウスを迅速かつ効率的に作製するために、網羅的な変異体作製技術である「遺伝子トラップ」の手法を用いて、マウスゲノムのできるだけ多くの遺伝子を破壊することが提唱されている。しかし、現在広く行われている遺伝子トラップは、ES 細胞で発現していない遺伝子を破壊することが困難であり、そのような遺伝子は大変な労力を要する「遺伝子ターゲティング」により個別的に破壊されなければならないと考えられていた。こうした問題点を踏まえ、私は標的細胞での遺伝子発現の有無に関らず、ランダムにマウスゲノム中の遺伝子を破壊することができる新しい遺伝子トラップの手法「UPATrap」を開発した(文献2)。この手法の開発により、ES 細胞で発現のみられない組織特異的遺伝子も遺伝子トラップにより網羅することが可能になり「ノックアウトマウス・プロジェクト」のボトルネックの解消が可能になった。UPATrap は現在、カナダの国家プロジェクトである CMHD (<http://www.cmhd.ca/genetrap/>) を含む複数の国内外のグループにより採用されている。

(2) 遺伝子トラップにより破壊された遺伝子の同定

遺伝子トラップは、DNA 断片(トラップベクター)をゲノムに挿入させることにより、ランダムに挿入変異を引き起こす手法である。トラップベクターがゲノム上の遺伝子コード領域に挿入されると、ベクター内部の構造により、遺伝子機能が破壊される。新たに開発した UPATrap 法は、mRNA の品質管理機構である nonsense mediated mRNA decay (NMD) に注目することにより、「Poly A トラップ」と呼ばれる手法の欠点を克服したものである(文献2)。このベクターが、ゲノム中

の遺伝子外部の領域に挿入された場合、ベクター内部から転写される薬剤耐性遺伝子の mRNA に poly A 鎖が付加されず、薬剤耐性とはならない。一方、内在性遺伝子の内部に組み込まれると、その遺伝子が持つ poly A 付加シグナルの働きにより mRNA が安定化され、薬剤耐性を獲得する。したがって、ベクターを細胞に導入後、薬剤選択を行うことによって遺伝子内部にベクター挿入を持つ変異体株を単離することができる。

(3) 遺伝子トラップ型マイクロアレイの開発

標的遺伝子の発現状態に左右されないランダムな遺伝子トラップ法により破壊された遺伝子(候補)の部分配列を、Rapid Amplification of cDNA Ends (3' RACE)・PCR 法およびダイレクト・シーケンシングにより解読し、公共のデータベースに対して相同性検索を行った。その結果、38%のものは、データベース中のいかなる既知遺伝子あるいは expressed sequence tags (ESTs) に対しても、相同性を示さない配列 (Unkown) であることに気づいた。しかし、それらの全てが実験上の artifact だとは考えられなかったので、トラップした遺伝子の部分配列をプローブとして載せた DNA アレイを作製し、それぞれの遺伝子(候補)の発現プロファイルを調べたところ、これまで全く未同定であった配列中の約 30%は、マウスの生体内において、RNA レベルの発現がはっきりと確認できることが判明した(文献3)。これらは、従来の研究手法の中で見逃されてきた「未知遺伝子」であり、未解明の生命現象に関与している可能性がある。申請者のグループは、これらの変異体 ES 細胞クローンをを用い、既にノックアウトマウスの樹立に成功している

(文献 1)

Austin, C. et al. Nat. Genet. 36, 921-924, (2004).

(文献 2)

Shigeoka, T. et al. Nucleic Acids Res. 33, e20, (2005).

(文献 3)

Matsuda, E. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101, 4170-4174, (2004).

2. 研究の目的

標的組織での発現の有無に依存せずにランダムに遺伝子を破壊することができる新型遺伝子トラップ法を用いることによって、これまで見逃されてきた「未知遺伝子」を網羅的に発掘することが可能であることを示す。また、遺伝子トラップベクターにさらなる改良を加えることにより、未知遺伝子の発掘により適した遺伝子トラップ法を開発する。

3. 研究の方法

(1) 新型遺伝子トラップベクターをマウス ES 細胞に導入し、大規模な遺伝子トラップを行うことにより、大量の変異体クローンを樹立、保存する。

(2) それぞれのクローンから RNA を抽出し、3' RACE により、ベクター挿入部位より下流領域に相当する cDNA を増幅した後、ダイレクト・シーケンシングにより塩基配列の解読を行う。3' RACE により、ピックアップしたクローンのうち、最低でも約 50% のものからは、トラップした遺伝子(候補)に関するクオリティの高い塩基配列の情報を得ることができる。

(3) トラップされた遺伝子(候補)断片の配列を既存のデータベースに対して相同性検索を行うことにより、未知遺伝子の候補配列の選別を行う。3' RACE とダイレクト・シーケンシングにより明らかにされた塩基配列は、まずマウスゲノムのデータベース(UCSC・BLAT を利用する) に対する検索を行うことにより、得られた塩基配列のクオリティと、ゲノム上の挿入部位を調べる。

(4) ゲノム上の挿入部位が明らかにされたクローンに関しては、さらに既知遺伝子および EST のデータベース(主に NCBI・BLAST を利用する) に対する相同性検索を行い、未知遺伝子の候補配列を選び出す。トラップされた遺伝子に関する情報は、これまでと同様に「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。

(5) 未知遺伝子の生理機能上の重要性を推測するため、ヒト等の近縁生物種の公共ゲノム・データベースを活用し、他の生物種のゲノム中における保存された配列の有無を調べる。

(6) これらの解析で、明らかにされた未知遺伝子候補に対して、RT-PCR、マイクロアレイ等による発現パターンの解析を行う。

4. 研究成果

(1) 遺伝子トラップによる未知遺伝子の探索および解析

UPATrap ベクターおよび、その改良型ベクター(研究成果(2)を参照)により作製された多数の変異体 ES 細胞クローン中で破壊された遺伝子を解析するため、3' RACE 法によりトラップされた遺伝子/遺伝子候補の cDNA を増幅し、塩基配列を解読した後、公共データベース(NCBI GenBank, UCSC genome browser)に対する相同性検索を行った。その結果、約 31% のクローンにおいて、公共データベースに登録されているいかなる遺伝子配列とも一致しない未知遺伝子の候補配列がトラップされていることが判明した。また、3' RACE で増幅された cDNA 配列とマウスゲノム配列を比較した結果、未知遺伝子候補 cDNA の約 15% がエクソン-イントロン構造を持ちスプライシングを受けていることが明らかになった。これらの候補配列の中から、機能的に重要な未知遺伝子を発掘するため、生物種間における塩基配列上の保存性の有無を検証した。未知遺伝子候補配列中でヒトゲノム上の塩基配列と高い保存性を示すものは約 19% であったが、open reading frame (ORF) あるいはアミノ酸配列レベルでの保存性が見出される例は非常に少なかった。しかし、RT-PCR 等による発現解析の結果、遺伝子トラップにより得られた未知遺伝子の候補配列中で、実際に組織特異的発現を示す遺伝子が複数存在することが確認されており、アミノ酸レベルでの保存性を持たない cDNA 配列中に、non-coding RNA として機能する未知遺伝子が含まれる可能性が示唆されている。本研究により新型ベクターを用いた遺伝子トラップ法により、効率的な未知遺伝子の探索が可能であることが示されたが、この手法の最大の利点は、「未知遺伝子を発見した時点で既に、

その遺伝子が破壊された ES 細胞クローンを手に入れることが出来る」という状況が作り出される点にある。従来の研究手法の中で見逃されてきた未知遺伝子の発掘と、その変異体の作製を同時並行的に実現する研究手法の確立は、「ノックアウトマウス・プロジェクト」においても大きな意味を持つと考えられる。

(2) 遺伝子トラップ法の改良

従来は、標的細胞における発現の有無に関わらず遺伝子をトラップする手法として「Poly A トラップ」が用いられていた。しかし、Poly A トラップ型のベクターが遺伝子の上流に挿入されると、mRNA 品質管理機構である NMD によって薬剤選択マーカーをコードする mRNA が分解されるため、この手法により遺伝子機能を完全に破壊することは困難であった。NMD は本来の停止コドンよりも上流に異常な停止コドンが生じた mRNA を選択的に破壊する過程であるが、Poly A トラップの場合、薬剤選択マーカーの停止コドンが「異常な停止コドン」であるとみなされることにより、mRNA の分解が生じていることが判明している。この欠点を克服するために開発された UPATrap ベクターにおいては、薬剤選択マーカー遺伝子の停止コドンの下流に internal ribosome entry site (IRES)が挿入されており、IRES からの翻訳が内在性遺伝子中の正常な停止コドンまで到達することによって NMD が回避されると考えられていた。しかしながら、このベクターが持つ原理上の欠点として、エクソン-イントロン構造を含む non-coding RNA の上流領域に挿入された場合 NMD を回避することができないため、未知遺伝子の多くを占めることが予想される non-coding RNA の探索・破壊が困難であった。この問題点を解決するためには、IRES に依存しない新たな NMD 抑制手法の開発が必要であると考えられたため、モデル mRNA を用いた NMD 抑制因子の探索を試みた。リアルタイム RT-PCR による mRNA の定量実験により、IRES 下流の開始コドンが除去された変異型 IRES も NMD 抑制効果を発揮することが明らかになり、さらに IRES の代わりに RNA 上で強固な二次構造を形成する配列を挿入した場合においても、部分的に NMD が抑制されることが示された。NMD の標的となる mRNA が含んでいる異常な

停止コドンの下流に強固な RNA 二次構造が挿入されると、NMD 経路の活性化に必須な二種の mRNA 結合タンパク質複合体の相互作用が阻害され、その結果 NMD が抑制されていることを明らかにしている(論文投稿準備中)。

これらの研究結果に基づき作製された新しいベクターを用いると、IRES からの翻訳に依存することなく、ランダムに遺伝子を破壊することが可能であることが確認された。この新しい NMD 抑制型遺伝子トラップベクターの開発によって、non-coding RNA を含む未知遺伝子群の効率的な探索、解析が可能になると考えられる。

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)

6. 研究組織

(1)研究代表者

重岡 稔章(SHIGEOKA TOSHIAKI)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・研究員

研究者番号:40457148