

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：14603
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21310128
 研究課題名（和文）NMD抑制に基づく新しい遺伝子破壊法をTリンパ球の研究に応用する
 研究課題名（英文）Application of a novel gene-disruption technique based on the suppression of NMD for the T-lymphocyte research
 研究代表者
 石田 靖雅（Yasumasa Ishida）
 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（和文）：

ランダムな遺伝子破壊の技術革新を目指し、NMD抑制を利用したポリAトラップ法「UPATrap」の基盤を、当初のレトロウイルスからDNAトランスポゾン*Tol2*に変更した。その結果、マウスES細胞中で発現しない遺伝子群（免疫系遺伝子などを含む）のトラップ効率が大きく改善し、コンディショナルな遺伝子破壊が可能となった。さらに、差別化タグで標識された15種類のトランスポゾンを混合して実験に供する新しい手法を開発し、トランスポゾン・ベクターの致命的な欠点を克服した。これらの研究成果は、Tリンパの機能解析に大きく貢献する。

研究成果の概要（英文）：

In order to improve the efficiency of random insertional mutagenesis, the backbone of an NMD-suppressing poly(A)-trap technique “UPATrap” has been changed from a standard retrovirus to a DNA transposon *Tol2*. This modification increased the disruption rate of transcriptionally silent genes in mouse embryonic stem (ES) cells and permitted conditional inactivation of trapped genes. In addition, we solved a long-standing problem associated with the transposon vector system by incorporating a mixture of 15 differentially tagged *Tol2* transposons. These developments will certainly accelerate the analyses on the nature of T lymphocytes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,000,000	1,500,000	6,500,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	12,700,000	3,810,000	16,510,000

研究分野：ゲノム科学

科研費の分科・細目：応用ゲノム科学・機能ゲノミクス

キーワード：遺伝子トラップ、マウス、ES細胞、nonsense-mediated mRNA decay、リンパ球

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細胞中で破壊することになった。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、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、確実に破壊することが決まった。

(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」という大きなメリットを持つ。

(3) 従来のポリ(A)トラップ法の限界

しかし我々は、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欠損の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破壊されない可能性が非常に高くなる。さらに我々は、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の mRNA が nonsense-mediated mRNA decay (NMD) と呼ばれる mRNA 品質管理機構により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) 理想的な遺伝子トラップ法 UPATrap の開発

2005年、我々は、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、マウス ES 細胞中で発現(転写)され

ない遺伝子群(免疫系遺伝子はここに含まれる)の機能を、ランダムな挿入型変異導入法によって「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(Shigeoka, T. et al. *Nucleic Acids Res.* **33**, e20, 2005)。

(5) 世界のノックアウトマウス・プロジェクト

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が解消されることを意味したため、マウス・ゲノム科学分野の研究者からは好意的に受け止められた。

< 欧米の場合 > カナダの国家的ゲノム・プロジェクト NorCOMM (トロント大のJ. Rossantら) は2005年後半より、UPATrap法を利用し、マウスES細胞中でランダムな遺伝子破壊を行った。

< 日本の場合 > 2007年の夏より、我々の研究は文科省ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)による支援を受けた。この中で、2005年に発表されたUPATrap法の有効性が再検証・再確認され、同手法に新たな機能が付与された。その一方、UPATrap法を用いて多数の変異型ES細胞クローンが産出され、理研バイオリソースセンター(BRC)に寄託された。それらに関する情報は、理研BRCのウェブサイトにて公開されている(http://www2.brc.riken.jp/lab/mouse_es/)。

2. 研究の目的

ヒトやマウスのゲノム・シーケンスが決定された今、生物医学系研究の次なる大目標は「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 細胞中で全遺伝子をノックアウトし、作製されたおびただしい数の 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(2008 年後半)。この大規模計画では欧米諸国が先行したが、我々が開発した新しい遺伝子破壊法「UPATrap」は、カナダの国家プロジェクトにおいて広く活用された。我が国では文科省 NBRP によって我々の研究がサポートされ、多数の変異型 ES 細胞クローンの産出が行われた。本研究では、ランダムな遺伝子トラップによって免疫学における「T リンパ球の研究」を促進することを目指す。そのための第一歩として、UPATrap 法を改良し、免疫系の遺伝子群を高い頻度でトラップし、確実にコンディショナルな破壊を達成するテクノロジーの確立を目指す。さらに樹立した新しい遺伝子トラップの手法を利用して T リンパ球で特異的に発現される

遺伝子をマウス ES 細胞で網羅的に破壊する。最終的には、樹立した ES 細胞クローンからノックアウトマウスを作製し、そこに現れる表現型を解析する。

3. 研究の方法

(1)従来型 UPATrap ベクター

本研究に用いる UPATrap ベクター (レトロウイルス型) の内部は二つの機能ドメインに分割される。前半は、トラップした遺伝子の機能を破壊するための「ターミネーター・カセット」であり、後半は、NMD 抑制型の遺伝子捕捉[ポリ(A)トラップ]を行うための「トラップ・カセット」である (Shigeoka, T. et al. *Nucleic Acids Res.* **33**, e20, 2005)。

(2)コンディショナル型 UPATrap ベクター

UPATrap ベクターによりコンディショナルな (組織特異的な、あるいは時期特異的な) 遺伝子破壊を実行するため、2種類の相同組換え酵素 (Cre & Flp recombinases) とその標的配列のシステムを採用する。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なく、*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、*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 ベクターの内部に適切に配置する (それぞれの標的配列のペアは、inverted orientation で配置される)。

(3)Flp recombinase による「無害 allele」の形成

ES 細胞中でトラップされた直後の内在性遺伝子は、常時その機能が破壊された状態にある。そこへ 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 カセットを欠失させる。最終的に組換え反応は、トラップした遺伝子の「無害 allele」が形成されるところまで進行し、そこで最終 (収束) する。

(4)Cre recombinase によるコンディショナル・ノックアウト

上記のような「無害 allele」を持つ ES 細胞を用い、常法に従いノックアウトマウスを作製する。得られたマウスと、組織 (あるいは時期) 特異的に Cre recombinase を発現するノックイン (あるいはトランスジェニック) マウスとを交配させた場合、目的の組織 (あるいは時期) のみでターミネーター・カセット (SA-IRES-EGFP-pA) が反転して

「遺伝子破壊 allele」が形成され、組換え反応が最終 (収束) する。これにより、コンディショナル・ノックアウトが完成する。

(5) Tol2トランスポゾンの採用

当初、コンディショナル UPATrap ベクターはレトロウイルスの基盤上に構築されたが、ベクター内部の small deletion や予期せぬ再構成が (7 割以上の ES 細胞株で) 多発した。この深刻な問題を解決するため、トラップのための必須エレメントを DNA 型トランスポゾンのひとつである *Tol2* へ移植する。

(6)トランスポゾン・ミックスチャー法の開発

しかし、トランスポゾンは万能ではない。例えばレトロウイルスに比べ、トランスポゾンは標的細胞ゲノムに複数コピー挿入されやすいという欠点を持つ。この性質に対処するため、約 60 塩基のタグ付きトランスポゾンを多種類 (15 種類) 用意し、それらを混合して実験に供する「トランスポゾン・ミックスチャー法」を開発する。

4. 研究成果

(1)ベクター安定性の向上は、コンディショナルな遺伝子破壊を保証する

UPATrap ベクターの骨格 (バックボーン) を、レトロウイルスから *Tol2* トランスポゾンに変更したところ、遺伝子をトラップされた 7 割以上の ES 細胞株で当初観察されたトラップベクター内部の small deletion や予期せぬ再構成の発生が完全に抑制された。コンディショナル型 UPATrap ベクターには、2種類の相同組換え酵素 (Cre & Flp recombinases) の標的配列 *loxP*、*lox5171*、*FRT*、*F3* が 2 コピーずつ inverted orientation で配置されているが (合計 8 個。前述)、ベクター骨格の *Tol2* への変更によりベクターの安定性が飛躍的に向上したため、*loxP*、*lox5171*、*FRT*、*F3* の inverted pairs が、ベクター導入細胞の中で完全な状態で保存されることになった。これにより、トラップした遺伝子のコンディショナルな破壊を確実に遂行することが初めて可能になった。

(2)非発現遺伝子のトラップ頻度の向上

我々の解析によれば、マウスの未分化 ES 細胞中では、全タンパク質コード遺伝子のうち約 55% が様々なレベルで (弱く、あるいは強く) 恒常的に発現する一方、約 45% のものは全く発現しないことが分かった。しかしながら、レトロウイルスベクターを用いた場合、マウス ES 細胞中で非発現遺伝子をトラップする頻度は約 10% に過ぎなかった。今回、トラップベクターの基盤を

Tol2 トランスポゾンに変更したところ、非発現遺伝子をトラップする頻度が約 25%まで上昇した。この改善により、マウス ES 細胞中で免疫系遺伝子群(その大半が非発現遺伝子である)をトラップするチャンスが大きくなった。

(3) T 細胞特異的遺伝子に関するノックアウトマウスの作製

コンディショナル型 *Tol2* トランスポゾン UPATrap ベクターを利用し、1,000 株以上の ES 細胞クローンが樹立され、トラップされた遺伝子が同定された。NCBI(米国)の各種 EST データベース、UniGene データベース、放射線医学総合研究所(千葉)の HiCEP データベースなどを利用し、それぞれのトラップされた遺伝子がマウス未分化 ES 細胞で発現されているかどうか、マウス個体ではどの臓器・組織で発現されているか、という点が網羅的に解析された。その結果、未分化 ES 細胞では発現が完全にシャットオフされているものの、マウス胸腺で特異的に発現されている遺伝子(あるいはその候補)がトラップされた ES 細胞クローンが複数個見出された。それらを C57BL/6J マウス由来の blastocyst に注入し、キメラマウスが作製された。現在、それらのキメラマウスと野生型 C57BL/6J マウスを交配し、いわゆる F1 マウスを多数得つつある。

(4) 複数コピー挿入の問題とその解決

前述のように、*Tol2* トランスポゾンは完璧なベクター・システムではない。レトロウイルスに比べ、トランスポゾンは標的細胞ゲノムに複数コピー挿入されやすいという欠点を持つ。この性質に対処するため、約 60 塩基のタグ付きトランスポゾンを多種類(15 種類)用意し、それらを混合して実験に供する「トランスポゾン・ミックスチャー法」を開発した。この新手法を利用した場合、各ベクター導入細胞(クローン)からゲノム DNA を抽出し、単純な PCR とその産物のシーケンシング反応を 1 サイクル実施するだけで、そのクローンのゲノムに何個のベクターが挿入されており、それらは 15 種類のうちの何番と何番なのかを、迅速に判別することができる。その結果に基づき、それぞれのベクターのゲノム挿入部位を極めて簡単に解析することが可能になった。

(5) 新しい NMD 抑制法の発見

現在の UPATrap 法では、ポリ(A)トラップのための薬剤耐性マーカー遺伝子 NEO の終止コドンの下流に EMCV 由来の IRES 配列を置き、NEO に加えて「第二の翻訳」を人工的に引き起こすことで NEO mRNA の NMD による分解を抑制している。しかしこの手法では、もともと open reading

frame (ORF) を持たない non-coding RNA をトラップした場合には、その NMD による分解を抑制することが出来ない可能性がある。そこで我々は、遺伝子トラップとは独立した研究を行い、IRES 以外の RNA エレメントでも、複雑な高次構造を形成するものは、Upf1 RNA helicase の mRNA 上の(5'側から 3'側への)進行を阻止することにより、NMD を抑制することが出来ることを見出した。この知見を遺伝子トラップに応用すれば、タンパク質をコードする遺伝子に加え、多くの non-coding RNA 遺伝子をトラップする新しい手法を開発することが可能となるに違いない。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

[1] Evidence that the Upf1-related molecular motor scans the 3' -UTR to ensure mRNA integrity.

Shigeoka, T., Kato, S., Kawaichi, M., and Ishida, Y.
Nucleic Acids Res. in press. (査読有)

[2] Mixture of differentially tagged *Tol2* transposons accelerates conditional disruption of a broad spectrum of genes in mouse embryonic stem cells.

Mayasari, N. I., Mukougawa, K., Shigeoka, T., Kawakami, K., Kawaichi, M., and Ishida, Y.
Nucleic Acids Res. in press. (査読有)

[3] CtBP-interacting BTB zinc finger protein (CIBZ) promotes proliferation and G1/S transition in embryonic stem cells via Nanog.

Nishii, T., Oikawa, Y., Ishida, Y., Kawaichi, M., and Matsuda, E.
J. Biol. Chem. Vol. 287, 12417-12424 (2012). (査読有)

[4] The methyl-CpG-binding protein CIBZ suppresses myogenic differentiation by directly inhibiting myogenin expression.

Oikawa, Y., Omori, R., Nishii, T., Ishida, Y., Kawaichi, M., and Matsuda, E.
Cell Res. Vol. 21, 1578-1590 (2011). (査読有)

[学会発表] (計 2 件)

[1] Yasumasa Ishida (石田靖雅),
“Mixture of differentially tagged *To12*
transposons accelerates conditional
disruption of a broad spectrum of genes in
mouse embryonic stem cells.”
The Company of Biologists Workshop “New
Technologies and Applications for Genome
Engineering”
2012 年 3 月 25 日、The Wiston House,
Steinyning, UK (英国)。

[2] N. I. Mayasari、田畑海渡、石田靖雅、
「条件的遺伝子改変 ES 細胞株の量産とデー
タベース化」
第 34 回 日本分子生物学会 年会
2011 年 12 月 13 日～16 日 (ポスター発表)、
パシフィコ横浜。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 靖雅 (Yasumasa Ishida)
(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：1 0 2 2 1 7 5 6