

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 5 月 16 日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21500388
 研究課題名（和文）トランスポゾン技術を用いた男性型脱毛症ゲノム領域の機能解明

研究課題名（英文） Functional analysis of the male-pattern baldness susceptibility locus by using transposon technology

研究代表者
 國府 力（KOKUBU CHIKARA）
 大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師
 研究者番号：70379238

研究成果の概要（和文）：ゲノムワイド関連解析にてヒト男性型脱毛症との相関が報告された *PAX1-FOXA2* 遺伝子座間の非コードゲノム領域の機能を明らかにするため、マウスの当該ゲノム領域に対してトランスポゾンベクターを用いた機能解析を行った。その結果、広大なシス調節ゲノム領域の地図を作製し、多様なエンハンサーエレメントを同定した。またこれまでのところ、マウスの系では *Pax1* と脱毛との関連を支持する確実な所見は得られなかった。

研究成果の概要（英文）：An intergenic non-coding region between human *PAX1* and *FOXA2* gene loci has been reported as a susceptibility locus for human male-pattern baldness by genome-wide association studies. To elucidate the function of the genomic region, we performed transposon-based functional analysis of the corresponding genomic region in the mouse. This allowed mapping of long-range genomic *cis*-regulatory regions and identification of a wide-variety of enhancer elements. No conclusive evidence has so far been obtained from the mouse to support an association between the *Pax1* gene and the hair loss phenotype.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：遺伝学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：疾患モデル、ゲノムエンジニアリング、トランスポゾン

1. 研究開始当初の背景

疾患モデル動物としてのマウスは、全ての遺伝子をノックアウトする国際共同プロジェクトの進展により数年以内にひとつの到達点を迎えるようとしていた (Gondo Y, *Nature Review Genetics* 2008)。しかし一方で「遺伝子」はゲノム全体から見るとせいぜい約 3% の領域を占めるに過ぎないことも、21 世紀の幕開けとともに完成したゲノムプロジ

ェクトの成果として分かっていた。したがって次世代のマウス・ミュタジェネシスは、ゲノムの残り 97% を占めている広大な「非」遺伝子ゲノム領域のはたらきをどのように解析してゆくかが 1 つの焦点になると考えられた。

本研究代表者らは、2000 年代初めからヒト及びマウスの *NKX2-2-PAX1-FOXA2* ゲノム領域に注目して研究を行ってきた (Kokubu *et al*,

Genetics 2003)。これら3つの遺伝子はいずれも個体発生・器官形成を制御する重要な転写因子をコードする遺伝子群であり、いわゆる Developmental genes の範疇に属するものとされている。しかもこれらの転写因子は構造的な出自を互いに異にするにもかかわらず、いずれも発生過程の枢要なシグナル経路として知られる Shh シグナルの下流プレイヤーとして機能するという注目すべき共通点を持つものであった。さらにヒト 20 番染色体あるいはマウス 2 番染色体に位置するこれら3遺伝子のゲノム上での並びは、実は鳥類・両生類・魚類を含め広く脊椎動物全般にわたってシンテニーが保存されており、さらにナメクジウオ等の無脊椎動物においても一部シンテニーの保存が認められることが分かった。したがってこれら3遺伝子 *NKX2-2*・*PAX1*・*FOXA2* は、遺伝子間領域を含めゲノム上での配置 (genomic organization) そのものが機能的・進化的に重要な意義をもつものと考えられた。

以上のような特徴から、我々はこの *NKX2.2-PAX1-FOXA2* ゲノム領域の構造と機能に注目し、主として遺伝学の実験手法による解析を開始した。ところが本ゲノム領域のもう1つの特徴として遺伝子密度の低い所謂 gene-poor region であるため、遺伝子間領域に存在するシス機能エレメントを探索するためには数百 kb に及ぶ広大な「非」遺伝子ゲノム領域をスキャンする実験技術が必要であった。当時、マウス遺伝学で一般的な ES 細胞に基づくジーンターゲットング技術では、一度に改変できるゲノム領域のサイズがターゲットングベクターそれ自体のサイズに規定されるため、せいぜい 30kb までにとどまるという制約があった。つまり上記のような数百 kb に及ぶゲノム領域を効率的に操作する遺伝学実験は、哺乳動物では最も先進的なゲノムエンジニアリング技術が使えるマウスの実験系においても未だ困難であった。

そこで我々は、合成 DNA トランスポゾン Sleeping Beauty (SB) が同一染色体上の近傍に転移し易い性質 (=ローカルホッピング特性) を持つことを実験的に確認し、それを利用して広範囲なゲノム領域の改変を行う新たなゲノムエンジニアリング技術の開発を着想した (Keng *et al*, *Nature Methods* 2005)。そして前研究課題 (H18-19 基盤研究(C)) において、“ローカルホッピング・ベクター”と名付けた実験システムを確立し、マウス ES 細胞の *Nkx2.2-Pax1-Foxa2* ゲノム領域 (約 1Mb の範囲) に集中的にトランスポゾン・ベクターを挿入する実験に成功した (Ikeda *et al*, *Mol. Cell. Biol.* 2007)。すなわち、少なくともマウスにおいては数百 kb に及ぶ広範囲のゲノム領域を自在に操作する遺伝学実験

のツールを整備することができた。

折しも国際ヒト HapMap プロジェクトを初めとするゲノム情報の充実に伴い、2005 年頃より主としてヒト遺伝学の分野でゲノムワイド関連解析 (Genome-wide association study, GWAS) が盛んになり、単一遺伝子疾患のみならず多くの形質や多因子疾患の関連ゲノム領域がゲノム上にマップされるようになった。このような GWAS 研究の成果の1つとして、2008 年になって欧米の2つの研究グループが我々の注目するヒト常染色体 20 番の *PAX1-FOXA2* 遺伝子間領域にヒト男性型脱毛症 (Androgenic alopecia: AGA) と強い相関を示すゲノム領域があることをそれぞれ独立に報告し、にわかに注目を集めた (Richards *et al*, *Nature Genetics* 2008; Hillmer *et al*, *Nature Genetics* 2008)。

一般に成人男女の約 40% に発症するとされる男性型脱毛症 (AGA) は、社会的・心理的関心が高いばかりでなく冠動脈性心疾患やメタボリックシンドロームとの関連も示唆されている。従来 AGA の代表的な原因遺伝子として X 染色体の *Androgen Receptor* (AR) が知られていたが、今回、それに次ぐ候補領域として常染色体上の *PAX1-FOXA2* 遺伝子間ゲノム領域が指摘されたことは、多因子形質と考えられる AGA の発症機構を理解する上で重要である。ところが今回マップされたゲノム領域は、*PAX1-FOXA2* 間で数百 kb にわたって既知遺伝子の存在しない「非」遺伝子ゲノム領域であるため、AGA の発症に関わるメカニズムに関しては全く分かっていないというのが現状であった。

2. 研究の目的

(1) *Pax1-Foxa2* ゲノム領域の多様な変異マウスを作製・活用して独自のローカルホッピング法によるゲノム機能解析を推進し、男性型脱毛症との相関を示す本領域のゲノム機能を明らかにするとともに、脱毛の発症メカニズムの探索を行う。

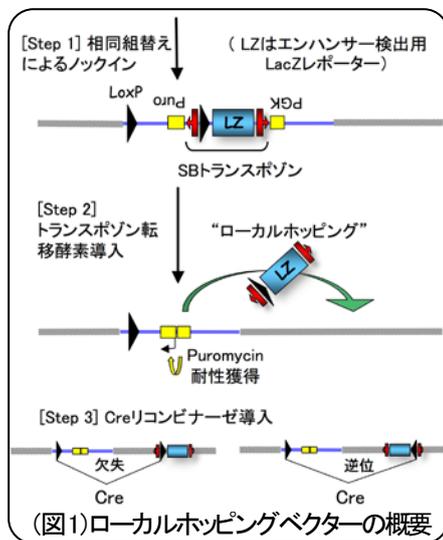
(2) 本研究の実験手法を一般化することにより、「非」遺伝子ゲノム領域に関連する疾患の汎用的なモデル実験系を提案する。

3. 研究の方法

(1) ローカルホッピング法によるマウス ES 細胞の *Pax1-Foxa2* ゲノム領域へのベクター導入

LacZ レポーター遺伝子を Hsp68 最小プロモーターにつないで作製した「エンハンサー検出カセット」を SB トランスポゾンの内部に組み込み、マウス ES 細胞の *Pax1* 遺伝子座近傍に相同組換えによりノックインする。続いて、このノックイン ES 細胞にトランスポゾン転移酵素 (トランスポゼース) 発現プラ

スミドをリポフェクション法により一時的に導入し、ノックイン部位からのトランスポゾン転移を誘導する。SBトランスポゾンのローカルホッピング特性により、起点から飛び出したトランスポゾンは近傍ゲノム領域のさまざまな位置に再挿入される。ベクター構築により、トランスポゾンが転移したES細胞のみがピューロマイシン耐性を獲得するので、選択培養が可能である。トランスポゾンの再挿入サイトをスプリンカレット型アダプターとPCRを用いた方法 (Keng, V. W. et al, *Nat. Methods*. 2005) により同定し、トランスポゾンの挿入位置毎にES細胞をクローン化する。またトランスポゾンの内部に組み込んだ loxP とノックインサイトの loxP との間で Cre/loxP 組換えを誘導することにより、ゲノム領域に欠失や逆位を導入することも可能である (図1)。

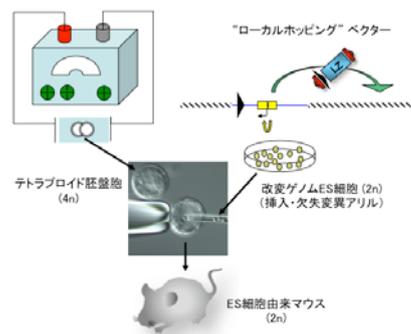


(2) テトラプロイド・レスキュー法によるES細胞由来のマウス作製

上記(1)で作製した改変ES細胞(2倍体)を二細胞期胚を電気融合した胚盤胞(4倍体)に打ち込むと、全身組織のほぼ100%近くがES細胞に由来しているマウス個体(2倍体)を迅速に作製することができる(図2)。テトラプロイド・レスキュー法と呼ばれるこのマウス作製法は、ホモ接合体を得る必要のないシス調節解析に特に適している。

(3) トランスジェニック・エンハンサーアッセイ

ローカルホッピング法によるマッピングと比較ゲノム解析の結果からリストアップされたエンハンサー候補領域のDNA断片をレポーターDNAカセットに接続し、通常受精卵前核インジェクションによるトランスジェニックアッセイにより個体における発現ドメインの観察を行う。



4. 研究成果

(1) ローカルホッピング・トランスポゾンベクターによるマウス Pax1-Foxa2 周辺ゲノム領域の探索

前研究課題(H18-19 基盤研究(C))で作製したローカルホッピング法によるトランスポゾン挿入ES細胞ライブラリに加えて、本研究課題でさらにライブラリ作製を続行しクローンのレパートリーを増大させた。その結果、*Nkx2.2-Pax1-Foxa2* ゲノム領域の遺伝子間非コード領域に関して高い密度でエンハンサー活性解析を行うことが可能となった。

今回新たに得られたライブラリについても適切な挿入サイトをもつES細胞クローンを選び、必要に応じて Cre/loxP 組換え反応による欠失変異導入を行った後、テトラプロイド・レスキュー法によりマウス胚を作成した。マウス胚は回収後に X-gal 染色によるレポーター遺伝子の発現観察や Whole-mount in situ hybridization 法による内在性遺伝子の発現解析に供した。

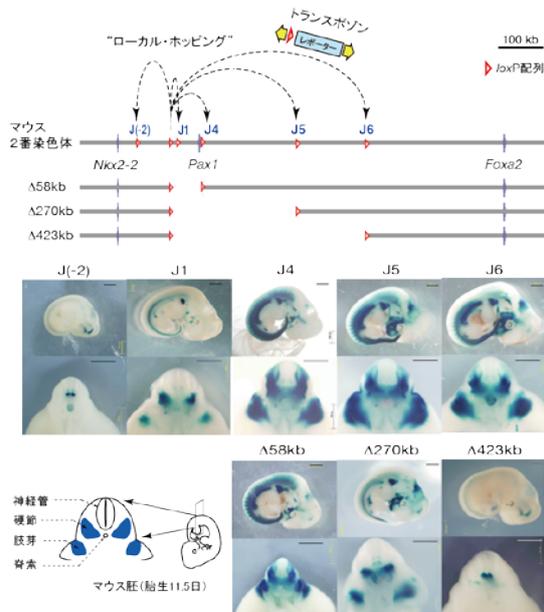
本実験の結果、マウス *Nkx2.2-Pax1-Foxa2* ゲノム領域の広大なシス調節領域地図を作製することができた。また *Pax1-Foxa2* 間の遺伝子間領域に新規のエンハンサー・エレメントを同定することができた。結果の一部を図3に示す(図3)。これらの結果を前研究課題の結果と合わせて論文にまとめ、*Nature Genetics* 誌に発表した (Kokubu C. et al, *Nature Genetics* 2009)。

また、論文発表後もさらにゲノム機能解析の精度を上げるため、トランスポゾンの転移誘導による挿入クローンの収集を続行した。

(2) マウス個体の生殖細胞系列におけるトランスポゾンベクターの転移誘導

ES細胞でのゲノム改変とテトラプロイド・レスキュー法によるマウス作製のプロセスをさらに迅速・簡便化するため、マウス個体の生殖細胞系列(主として精子)におけるトランスポゾンベクターの転移誘導を試みた。

実際の実験は、*Pax1* ゲノム領域へのトランスポゾン・ノックインES細胞から作出して



(図3) ローカルホッピング・ベクターシステムによるマウス *Nkx2.2-Pax1-Foxa2* ゲノム領域のシス調節活性マッピング (Kokubu C. et al, *Nature Genetics* 41(8), 946-952, 2009 より改変)

ライン化したノックインマウス (*Pax1^{LHED}*) と別途作製したトランスポゼース強発現ノックインマウスとを交配し、得られた産仔の尾から抽出したゲノム DNA のトランスポゾン挿入サイトを調べた。その結果、数パーセントの産仔においてトランスポゾンの転移が検出された。

(3) マウス *Pax1-Foxa2* 周辺ゲノム領域に位置するエンハンサーエレメントの機能解析
 公的データベースの異種ゲノム情報増大に伴い、ニワトリ (*G. gallus*), 軟骨魚類 (Elephant Shark) 等との比較ゲノム解析を追加し、進化的に保存された非コードゲノム領域の検索を強化した。これらの中から、トランスジェニックアッセイによるエンハンサー解析を行ったところ、*Pax1-Foxa2* の両遺伝子間領域に位置するにも拘らず両者のいずれの内在性発現とも異なる活性をもつエンハンサー断片が同定された。

(4) 成体マウス皮膚組織における *Pax1* 遺伝子発現の検索

ヒト *PAX1* 遺伝子は大腿部皮膚毛組織での微弱な発現と頭皮での比較的強い発現が報告されている (Hillmer A. M. et al, *Nature Genetics* 2008)。これに対してマウスの *Pax1* 遺伝子の発現は、これまで胎児期に比べて成体での解析が遅れていた。そこで、成体マウスの皮膚・毛組織切片における *Pax1* 遺伝子の発現を RNA in situ hybridization 解析により検索した。その結果、これまでに検出された皮膚・毛組織での *Pax1* 発現は微弱であり、*Pax1* と脱毛の表現型との関連を示唆する

確実な所見を本課題の期間内にマウスの系で得るには至らなかった。

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 5 件)

- ① 堀江恭二, 國府 力, 竹田潤二.
 「ES/iPS 細胞研究のための遺伝学的手法の新展開」実験医学 2012 年 6 月増刊号「進展する幹細胞のサイエンスから再生医療へ」(2012). 査読無。(印刷中)
- ② Horie K., Kokubu C., Yoshida J., Keiko Akagi K., Isotani A., Oshitani A., Yusa K., Ikeda R., Huang Y., Bradley A. and Takeda J. A homozygous mutant embryonic stem cell bank applicable for phenotype-driven genetic screening. *Nature Methods* (2011); 8: 1071-7. 査読有.
- ③ Horie K., Kokubu C., Takeda J. Functional Genomics in the Mouse using the Sleeping Beauty Transposon System. In Wassarman PM and Soriano PM (Ed.), *Guide to Techniques in Mouse Development, Part B: Mouse Molecular Genetics, 2nd Edition, Methods Enzymol.* (2010);477C:71-89. 査読無.
- ④ Castelo-Branco G, Andersson ER, Minina E, Sousa KM, Ribeiro D, Kokubu C., Imai K, Prakash N, Wurst W, Arenas E. Delayed dopaminergic neuron differentiation in *Lrp6* mutant mice. *Dev Dyn.* (2010); 239: 211-21. 査読有.
- ⑤ *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 mice. *Nature Genetics* (2009); 41: 946-952. (* Co-corresponding author) 査読有.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 國府 力. 哺乳類と魚の背骨はどこが違うのか: 異種間ゲノム工学による脊椎形成の分子機構の研究. 京都大学再生医科学研究所「再生医学・再生医療の先端融合的共同研究拠点」平成 23 年度学術講演会. 芝蘭会館稲森ホール. 京都大学医学部. 京都 (26 Dec. 2011)
- ② 國府 力. マウス・ゲノムエンジニアリ

- ングの進歩. 第 29 回日本骨代謝学会学術集会 *Meet the Experts*. 大阪国際会議場. (July 30, 2011)
- ③ 國府 力. 骨格組織構築に關与する幹細胞群の移動と局在. 平成 22 年度共同研究会. 京都大学再生医科学研究所. 京都. (9 June, 2011)
- ④ 國府 力, Xingya Xu. トランスポゾン飛跡追跡による 3 次元ゲノム構造解析の試み. 次世代シーケンサー現場の会第 1 回研究会. 熱海ニューフジヤホテル. 熱海. (28-29 May, 2011)
- ⑤ 國府 力. ベクター挿入部位の網羅的同定. 第 53 回共同研テクニカルセミナー. 大阪大学大学院医学系研究科. (15 Dec. 2010)
- ⑥ 吉田純子、國府 力、竹田潤二、堀江恭二. レトロウイルスおよび DNA 型トランスポゾンベクターのゲノムワイドな挿入部位の比較解析. 第 33 回日本分子生物学会大会. 神戸. (7-10 Dec. 2010)
- ⑦ 國府 力. トランスポゾンベクターを用いたマウスゲノム制御領域の機能解析. 定量生物の会. 第 2 回年会. 大阪大学吹田キャンパス. (9-11 January, 2010)
- ⑧ 國府 力. トランスポゾンベクターによるマウス長距離ゲノム制御領域の探索. 京都大学再生医科学研究所特別セミナー. 京都大学再生医科学研究所. 京都. (December 21, 2009)
- ⑨ 國府 力. トランスポゾンベクターによるマウス長距離ゲノム制御領域の探索. 東海医学会講演会. 東海大学医学部. 伊勢原. (December 1, 2009)
- ⑩ 國府 力. トランスポゾンベクターによる長距離ゲノム制御領域の探索. 第 4 回 *Skeletal Research Meeting*. からすま京都ホテル. 京都. (November 21, 2009)
- ⑪ 國府 力. トランスポゾンを用いたローカルホッピング・ベクターの開発とマウス機能ゲノミクスへの応用. 日本遺伝学会第 81 回大会. 信州大学. 長野. (September 18, 2009)
- ⑫ **Kokubu C**, Horie K and Takeda J. Scanning a Shh-Responsive Gene Cluster With Transposon-Based Local Hopping Vector. *Mouse Genetics & Genomics, Development and Disease*. Wellcome Trust Conference Centre. Cambridge, UK. (2-6 September, 2009)
- ⑬ **Kokubu C**. Mapping by Hopping: A Transposon-Based Genome Engineering Method to Survey a Large *Cis*-Regulatory Landscape in a Model Organism. *The IHG seminar*.

International Centre for Life,
Newcastle University, Newcastle upon
Tyne, UK. (1st September, 2009)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/mr-envi/www/japanese/member/detail/kokubu.html>

http://www.osaka-u.ac.jp/en/research/annual-report/volume-11/100_select_paper/copy6_of_science02.html

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/jpn/activities/results/2009/005.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

國府 力 (KOKUBU CHIKARA)

大阪大学・大学院医学系研究科・特任講師
研究者番号：70379238

(2) 研究分担者

吉良 正浩 (KIRA MASAHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・講師
研究者番号：90314335

刈野 善弘 (UNO YOSHIHIRO)

大阪大学・大学院医学系研究科・助手
研究者番号：80252683

(3) 連携研究者

(無し)