

## 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 25 年 6 月 12 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21700451

研究課題名（和文）人工染色体ベクター搭載マウスによる個体レベルでのエピジェネティクス解析

研究課題名（英文）Epigenetic analysis in the individual level by mice engineered using artificial chromosome vectors

研究代表者

柏木 明子（KASHIWAGI AKIKO）

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：90335521

研究成果の概要（和文）：

発生や疾患とエピジェネティクスの関連性が明らかとなってきているが、これらの知見を個体レベルで検証するには、安定的に遺伝子改変を行ったモデル動物による解析が必要である。本研究では、個体レベルの生命現象の変動に伴う生理的な遺伝子発現を再現することが可能な、従来困難であった個体レベルのエピジェネティックな変動を安定的に解析できるマウス作製技術の基盤を人工染色体ベクターを用いて構築することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

Recently, the relevance between epigenetics and human development and diseases has been revealed. It is important to utilize model animals maintained stably the genetical modification to be verified further these findings in individual level. In this study, we succeeded the development of the novel basic technology to generate model mice maintained stably artificial chromosome vectors to monitor the variations of epigenetics in individual level. These mice models will be useful for analyses of changes of the epigenetics and physiological gene expression arising from various biological phenomena.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	0	0	0
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：エピジェネティクス、人工染色体、マウス

## 1. 研究開始当初の背景

従来のエピジェネティクス研究は、主に細胞細胞を用いた解析で進んできている。最近では発生や疾患とエピジェネティクスの関連性が明らかとなってきたが、これらの知見を個体レベルで検証するには、安定的に遺伝子改変を行ったモデル動物による解析が必要であった。

一方でヒトやマウスなどの動物細胞に外来遺伝子を発現させるためのベクターの開発は遺伝子機能を解析するためのツールであるばかりでなく、産業（医薬品生産やスクリーニング細胞作製など）や医療（遺伝子治療など）への応用面でも重要な役割を果たしてきた。従来の遺伝子導入には大腸菌/酵母を宿主としたクローン化DNAが用いられているが、しばしば導入されたベクターが細胞内で複製されずに分裂に伴って消失し、導入遺伝子の発現は一過性となる。薬剤耐性遺伝子を同時に導入し、選択培養条件下で培養して持続的に発現する細胞株を選別することは可能ではあるが、導入遺伝子は宿主染色体上にランダムに、多くの場合複数コピー挿入される。このことは導入遺伝子の発現が一定ではなく、宿主の染色体上の遺伝子機能を破壊する可能性を持っていることを意味している。

上記課題を克服するため、鳥取大学ではヒト人工染色体ベクターおよびマウス人工染色体ベクターを構築し、これをベクターとして遺伝子を導入することに成功してきた。これらの人工染色体ベクターの利点は 1) 宿主染色体に挿入されず独立して維持されることから、宿主遺伝子を破壊しない。 2) 一定のコピー数で安定に保持され、自己のプロモーターを含む遺伝子領域を導入することにより宿主細胞の生理的発現制御を受けることから、過剰発現や発現消失が起きない。 3) 導入可能な DNA サイズに制約がないことから、発現調節領域を含む遺伝子や複数遺伝子/アイソフォームの導入が可能となる。このように従来のベクター系（ウイルス、Yeast Artificial Chromosome, Bacterial Artificial Chromosome, P1 Artificial Chromosome, cosmid, plasmid など）にはない利点を有していることから新たな機能解析のためのベクター系として、さらに遺伝子治療用ベクターとしても有用であると期待されている。

## 2. 研究の目的

エピジェネティクスの研究の成果は細胞を用いたものがほとんどである。本研究では、これまで困難であった個体レベルでのエピジェネティクスの解析をバイオイメージン

グによって簡便に解析するシステムを提唱している。このシステムでは、細胞レベルの解析で明らかにしたことを個体で検証することが可能になる。疾患に関する治療法や予防法を開発するためには、実験動物を用いた個体レベルでの検証が必要になる。本研究結果により有効な個体レベルでの解析法を開発できる。本研究の目的は発生、分化、老化、疾患発症といった個体レベルの生命現象の変動に伴う生理的な遺伝子発現を外来遺伝子で再現することが可能な、従来困難であった個体レベルのエピジェネティックな変動を簡便に解析できるマウス作製技術の基盤を人工染色体ベクターを用いて構築することである。

## 3. 研究の方法

モニター用遺伝子を搭載した人工染色体ベクターを保持するマウスを作製するため以下のアプローチにより研究を行った。

### (1) 微小核細胞融合法の検討

ヒト人工染色体ベクターを保持するマウスの作製には、従来のトランスジェニックマウスを作製する方法のように受精卵へのベクター導入の方法が適用できず、マウス ES 細胞に染色体を導入し、8 細胞期胚へ移植することでキメラマウスを作製するアプローチをとっている。この方法を従来の受精卵へのインジェクションにより実施するためにはヒト人工染色体ベクターを保持する微小核細胞を高頻度に濃縮する方法が必要である。本項目ではインドホエジカ細胞を中間宿主としたヒト人工染色体ベクター濃縮法に関して検討した。インドホエジカ細胞の染色体数は 6 本と少なく、そのサイズはヒト人工染色体ベクターの数倍大きい。このためヒト人工染色体ベクターを含む雑種細胞の宿主として利用され、染色体サイズの差に基づく FACS を利用したヒト染色体の選択的単離が可能なが期待される。本研究項目ではインドホエジカ細胞を用いて、濃縮方法に関する条件検討を行った。

### (2) マウス人工染色体ベクターを保持するマウス系統の作製と解析

これまでにマウス個体においてはヒト人工染色体ベクターよりもマウス人工染色体ベクターが安定に維持されることが明らかとなってきた。そこで、本研究ではマウス人工染色体ベクター保持するマウス系統を用いて、C57BL/6 系統および ICR 系統の遺伝的背景を持つマウスを作製し、マウス人工染色体ベクター上に搭載されているモニター遺伝子である GFP 遺伝子発現を指標に性差、系統差、週齢差の解析を行った。

### (3) 複数遺伝子搭載マウス作製システムの開発

これまでに鳥取大学大林らはヒト人工染色体ベクター上に複数の遺伝子を搭載できるマルチインテグレーションシステムを開発してきた。このシステムを上述したマウス人工染色体に適用し、さらに簡便な遺伝子導入マウス作製システムを CHO 細胞、マウス ES 細胞を用いて開発した。

### (4) Cbx6 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス作製

ポリコム複合体の構成因子の1つである Cbx6 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス作製をマウス ES 細胞中で相同組換えにより試み、遺伝子組換えマウスを作製した。

## 4. 研究成果

### (1) 微小核細胞融合法の検討

GFP 遺伝子を搭載したヒト人工染色体ベクターをインドホエジカ細胞に微小核細胞融合法により導入したところ、数十クローン薬剤耐性クローンを取得できた。そのうち、3クローンについて FISH 解析を行ったところ、2クローンについて、インドホエジカの6本の染色体とは独立に1本ヒト人工染色体ベクターが保持されていることが確認できた。

次にインドホエジカ細胞にコルセミドおよびパクリタキセルの濃度と処理時間を変えることで微小核形成能を検討した。その結果、パクリタキセル 0.07ug/ml で48時間処理をすることで微小核細胞が効率的に形成できることが確かめられた。今後、インドホエジカ細胞からヒト人工染色体ベクターを濃縮することで、目的の細胞にヒト人工染色体ベクターを効率的に導入できるかを検討する予定である。この方法よりマウス受精卵やマウス ES 細胞へヒト人工染色体ベクターを効率的に導入することが可能になり、トランスクロモソミックマウス作製技術を遺伝子改変マウス作製技術として利用できるものと考えられる。

### (2) マウス人工染色体ベクターを保持するマウス系統の作製と解析

系統、加齢進行や性別にともなう個体レベルでの遺伝子発現を安定的に解析するために、EGFP を搭載したマウス人工染色体ベクターを保持するマウス系統を樹立した。10週齢、50週齢における♂♀の血液細胞における遺伝子発現をセルアナライザーにより解析したところ、いずれの場合も95%以上のGFP陽性率で系統差、性差、個体差、週齢差は観察されなかった。従って、マウス人工染色体ベ

クターを用いれば、安定的にエピジェネティクス解析を行うことが可能であることが示唆された。

一方で、子孫伝達の効率を検討したところ、♀由来では約50%、♂由来では約30%のGFP陽性個体が得られることが明らかとなった。従来のヒト人工染色体ベクターでは♀由来では約30%、♂由来では約20%の伝達率であったので、マウス人工染色体ベクターを用いることにより効率的にトランスクロモソミックマウスを作製できることが明らかとなった。

### (3) 複数遺伝子搭載マウス作製システムの開発

マウス人工染色体ベクターを保持する Hprt 遺伝子欠損 CHO 細胞にマルチインテグレーションプラットフォームを保持する plasmid ベクターと Cre 発現ベクターを遺伝子導入キット Lipofectamin 2000 を用いてコトランスフェクションすることで、Cre-loxP システムを用いてマルチインテグレーションプラットフォームをマウス人工染色体ベクター上に搭載した。このことから、マルチインテグレーションシステムをマウス人工染色体ベクターにも適用し、最大5つの環状DNAをマウス人工染色体ベクターに搭載することが可能となった。

次に上記マルチインテグレーションシステムをもつマウス人工染色体ベクターをマウス ES 細胞に微小核融合法により導入したところ、10クローン薬剤耐性クローンを取得することができた。それらの10クローンについて核型解析を実施したところ、5クローンについて染色体異常がなくキメラ作製に利用できることが明らかとなった。次にそれらの5クローンについてキメラマウスを作製したところ、2クローンからは高キメラマウスを取得することができた。

次に上記2クローンのマウス人工染色体ベクター上のマルチインテグレーションプラットフォームに目的遺伝子を搭載できるかを確認したところ、効率的に目的遺伝子を搭載できることが確かめられた。

今後は加齢進行に伴うエピジェネティクスの変動をモニターするために細胞老化特異的なクロマチン構造変換を蛍光観察するシステムや老化によって発現が変動する遺伝子の発現をモニターするシステムをマルチインテグレーションプラットフォーム上に搭載することでエピジェネティクス解析に有用なトランスクロモソミックマウスの作製を行う予定である。

### (4) Cbx6 遺伝子のコンディショナルノックアウトマウス作製

マウス Cbx6 遺伝子座に loxP 配列 2カ所お

よび薬剤耐性遺伝子を保持するターゲティングベクターを構築した。さらに、そのターゲティングベクターをリニアライズしたのちに、マウス ES 細胞にヌクレオフェクション法により導入し、薬剤耐性クローンを取得した。PCR 法により目的のターゲティングが起こったクローンを選別した。さらに、その ES 細胞を胚盤胞期胚へインジェクションすることでキメラマウスを取得した。高キメラマウスと正常マウスを交配することで、マウス Cbx6 遺伝子座にコンディショナルに遺伝子が破壊できるアレルを持つマウス系統の樹立に成功した。今後は Cre リコンビナーゼ発現マウスとの掛け合わせにより、Cbx6 遺伝子コンディショナルノックアウトマウスを完成させ、Cbx6 遺伝子の表現型解析を行いたい。

本研究で開発されたモニター用マウスや遺伝子導入技術は、将来的に、生殖細胞成熟、受精、発生、分化、個体老化など個体レベルでの生命現象の理解に向けた研究や、あるいはがん、感染症などの各種エピジェネティクス関連疾患の発症機序の解明、それらの治療法、予防法開発研究など、広範囲な分野の研究推進に貢献する可能性があると考えられる。

#### 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)

〔雑誌論文〕 (計 0 件)

〔学会発表〕 (計 0 件)

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

柏木 明子 (KASHIWAGI AKIKO)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：90335521

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし