

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23650235

研究課題名（和文） バーコード導入型ベクターによる変異動物細胞解析システムの構築

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of mutant mammalian cells using barcode vector

研究代表者

堀江 恭二 (HORIE KYOJI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30333446

研究成果の概要（和文）：申請者はこれまで、多数のホモ変異体マウス ES 細胞を迅速に単離する方法を開発してきた。しかし、個々のホモ変異体を個別に解析するのでは、網羅的遺伝子機能解析は達成困難と痛感した。そこで本研究では、固有の塩基配列（バーコード）を有すベクターのライブラリーを作製し、個々の変異細胞を異なるバーコードでラベルした。これにより、プールした変異細胞集団における各変異体の存在比率が、各バーコードの出現率で定量できるようになった。この結果、細胞をプールした状態での迅速な表現型解析が可能となった。

研究成果の概要（英文）：We previously developed a method for rapid isolation of a large number of homozygous mutant mouse ES cell lines. However, we realized that phenotypic analysis of each mutant cell line is a labor-intensive process. In the current study, we have constructed a barcode vector library in which each vector contains a unique nucleotide sequence, and labeled each homozygous mutant cell line with different barcode sequence. This allowed us to evaluate the ratio of each mutant cell line among entire population of a pool of mutant cells using each barcode sequence as an index to represent the corresponding mutant cell line, leading to a rapid phenotypic analysis with pooled cells.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：発生工学、ES 細胞、バーコード、変異体

1. 研究開始当初の背景

変異体を用いた研究は、遺伝子機能を解析する上で、最も一般的かつ有効な手法のひとつである。変異体を用いる研究手法は、特定の遺伝子を破壊して、その表現型を解析する逆遺伝学 (reverse genetics) と、多数の変異体の中から目的の表現型を有すものを選択する順遺伝学 (forward genetics) に大別される。大腸菌や酵母等のモデル生物では、これら2つのアプローチが共に広く用いられているが、マウスをはじめとする哺乳動物のモデル生物においては、多数の変異体を作製すること自体が困難なため、順遺伝学が大きく立ち遅

れている。順遺伝学では、はじめに遺伝子を仮定していないために、予期せぬ遺伝子機能が明らかとなるケースが多い。このため、新たな研究分野の創出に繋がる可能性も高く、哺乳動物においても進展の望まれる分野である。

哺乳動物における順遺伝学的手法の進展を図るために、申請者はこれまでに、マウスをモデルとした技術開発に携わってきた。とりわけ、線虫や植物等で変異原として実績のあるトランスポゾン、マウス個体レベルでも変異原として用いることを試みた。その結果、fish ゲノムに存在する不活性型のトラン

スポゾンを変換することで活性化させた Sleeping Beauty トランスポゾンが、マウス個体内で効率良く転移することを見出した (*PNAS* 98:9191-9196, 2001)。さらに、この知見を応用して、変異マウス大量作製技術の開発や、変異ラット作製への応用を行ってきた (*MCB* 23:9189-9207, 2003; *Nat Methods* 2:763-769, 2005; *Nature Methods* 4:131-133, 2007; *Nat Genet* 41: 946-952, 2009)。この結果、予期せぬ遺伝子変異が、ヒト疾患の病態に関与する知見も得られ (*PLoS One*. 5: e11602, 2010; *PLoS One* 5: e13447, 2010; *Am J Hum Genet* 88: 30-41, 2011)、順遺伝学における本手法の有効性が示された。

一方、この過程で、動物個体を扱う限りは、個人レベルで解析できる変異体の数には限界があることも痛感した。これは、トランスポゾンにより導入できる変異は、1対の遺伝子のうちの片方であり、両アレルを破壊するには、マウスの交配過程を経ねばならないことによる。そこで、「マウス個体を介さずに、培養細胞レベルでホモ変異体を作製する」方法の開発に着手した。この方法では、マウス ES 細胞において、*Bloom* 遺伝子をジーンターゲット法によりあらかじめ改変してテトラサイクリンシステムにより制御可能な状態にしておく。一方のアレルを、トランスポゾン、レトロウイルス、化学変異原等により破壊後、*Bloom* 遺伝子を一過性に抑制することで、細胞周期の 4n 期での相同染色体間の組換えを誘発し、その後の細胞分裂で両アレルに変異の導入されたホモ変異体を取得する。この原理自体は、我々が以前に報告済みであったが (*Nature* 429: 896-899, 2004)、我々は最近、この方法をさらに発展させ、より迅速なホモ変異体 ES 細胞の単離を可能にした (*Nat Methods* 8: 1071-1077, 2011)。既に、約 2,000 株のヘテロ変異体、約 200 株のホモ変異体を取得済みであり、現在急速に進展している ES 細胞の分化誘導系を適用することで、マウス個体実験を相補する様々な表現型解析が、培養細胞レベルで可能になると考えている。しかし、これらのホモ変異体の表現型解析において、個々の変異体を個別に扱っていたのでは効率が低く、膨大な数の変異体のリソースを活用しきれないことも痛感した。このため、多数の変異体を解析するための、新たな方法が必要であると考えているに至った。

変異体の表現型解析を迅速化する方法のひとつとして、多数の変異体をプールして、まとめて表現型解析を行う方法がある。この場合、プールの中に存在する各変異体の増減をモニターする方法が必要となる。その方法として、バーコードを使用する方法がある。バーコードとは、各々の変異体に固有の塩基

配列であり、通常は、外部から細胞内へ導入する。バーコードによる変異体解析は、とりわけ、酵母の遺伝子破壊ライブラリーにおいて広く用いられており、その有用性は証明されている (*Nature* 418: 387-391, 2002)。この方法では、各々の遺伝子破壊用ベクターに、あらかじめバーコード配列が導入されている。バーコードの長さは、通常は、30 - 60 塩基程度である。酵母の実施例では、多くの変異体をプールした上で、様々な条件での培養前後にゲノム DNA を抽出し、バーコード配列を PCR 法で増幅する。その後、PCR 産物を蛍光色素等でラベルし、カスタム・メイドのマイクロアレイで各バーコードの増減を定量している。しかし、哺乳動物細胞の遺伝子破壊株においては、申請者の知る限りでは、この手法が適用された例は無く、shRNA ベクターによるロックダウンにおいて類似の方法が適用されているに留まる。そのみならず、哺乳動物細胞においては、変異体で表現型解析を行うには、酵母とは異なって、1対の遺伝子の両方を破壊する必要があるため、そもそも変異体の大量取得自体が困難である。たとえ片アレルの遺伝子に対してさえも、酵母と比べて遺伝子破壊に要す労力は遥かに多いので、酵母の場合のように、個々の遺伝子破壊用ベクターにバーコード配列を導入しておく手法は、現実的では無く、新たな手法の開発が必要である。

本研究では、これらの問題点を解決するために、バーコード導入に関する新たな実験系の開発と、バーコードの定量法の確立を試みた。

2. 研究の目的

哺乳動物細胞変異体の表現型解析の問題点である迅速性を解決するための新たな手法として、本研究では、バーコード配列を有すベクターライブラリーの作製、変異体へのバーコード配列の導入方法の確立、バーコード配列の迅速な定量と、定量結果の情報解析による、変異体の表現型解析システムの構築を試みる。

変異体としては、上記に記述の、我々がこれまでに単離してきた、ホモ変異体マウス ES 細胞を用いる。バーコードの導入には、バーコード配列を有すレトロウイルスベクターのライブラリーを作製し、ホモ変異体 ES 細胞へ感染させることで導入する。酵母においては、遺伝子破壊用ベクターにバーコードが導入されているが、今回は、バーコード配列導入用のライブラリーを、遺伝子破壊用ベクターと切り離して作製する。この結果、本研究対象の変異体に限らず、様々な変異体に対してバーコードの導入が可能になり、より一般性の高い方法になると考えている。バーコードのデザインに際しては、実験に応じて、

様々な方法でバーコードを検出できるようにした。即ち、酵母で行われているマイクロアレイ以外に、バーコード配列内にプライマーをデザインしての定量 PCR や、バーコード配列自体を PCR で増幅して次世代型シーケンサーで read 数をカウントする方法も可能なようにデザインした。

我々が開発してきた、ホモ変異体マウス ES 細胞の大量取得技術は、国際的にもユニークなものであり、主要誌における遺伝学的新手法に関する最近の review でも言及されている (*Nature Methods* 9: 121, 2012)。この成果を世界中の研究者と共有できるように、現在、これらの変異体の、国際コンソーシアムへの登録を進めている。本研究によるバーコード技術が適用可能になれば、変異体を利用した解析が、より簡便になり、その有用性はさらに高まるものと期待される。

3. 研究の方法

(1) バーコード配列導入用レトロウイルスベクターのライブラリーの作製

60 塩基の異なるバーコード配列を有すレトロウイルスベクターを作製した。本研究で用いるレトロウイルスは、最も広く用いられている、Molony Murine Leukemia Virus を骨格とした、非増殖性のものである。バーコード配列は、各ベクターに 2 コピーずつ導入した。これにより、各変異体あたり、2 種類のバーコードを用いた、独立した評価が可能となり、データの信頼性が高まると期待した。また、2 コピーのバーコードが存在することで、各々のバーコード領域へ PCR プライマーを設定することが可能となり、定量 PCR によるバーコードの評価も可能になると考えている。

バーコードの配列は、オリゴヌクレオチドの合成時に、ランダムな配列として導入し、それを鋳型にして PCR で増幅した。PCR 産物をレトロウイルスベクターへ ligation で導入後、大腸菌へトランスフォーメーションし、個々のベクターをクローン化した。さらに、シーケンスによりバーコード領域の塩基配列を決定することで、個別のバーコードを有すベクターを得た。

(2) ホモ変異体の、バーコードによるラベル化

レトロウイルスベクターを、packaging 細胞である Plat-E 細胞へ、リポフェクタミン 2000 を用いてトランスフェクトし、2 日後に、ウイルスを含有する培養上清を回収し、フィルターで濾過した上で、 -80°C にて凍結保存した。このウイルスを、我々が単離済みのホモ変異体に対して、各バーコードと各変異体が 1 対 1 の対応関係になるように感染させた。本研究に用いたレトロウイルスベクター

には、プラストサイジン耐性遺伝子がコードされている。そこで、感染細胞を、プラストサイジンで選択し、すべての細胞へバーコードが導入された状態を得た。バーコード導入細胞のクローンは行っていないので、レトロウイルスベクターの挿入が周辺遺伝子へ与える影響は無視できると考えている。

ホモ変異細胞の中には、増殖速度が極めて遅いものも含まれている。このような細胞株は、プール後に培養する過程で、その細胞株のみがプールから消失してゆく可能性がある。そこで、各変異体の増殖速度を、あらかじめ測定し、すべての細胞株からなるプールと、増殖速度の遅い細胞株のみからなるプールを調製した。

(3) 表現型解析を行うための細胞培養

バーコードの導入されたホモ変異体マウス ES 細胞のプールに対して、薬剤等の刺激や、分化誘導実験を行った。これらの培養の前後で、プールした細胞集団からゲノム DNA を抽出した。バーコード領域を PCR 法にて増幅し、PCR 産物の両側に Illumina 社のシーケンサー用のアダプター配列を連結後、バーコード領域の塩基配列を決定した。バーコード配列を reference に用いて、各バーコードの read 数を算定した。

4. 研究成果

(1) バーコードを導入したベクターのライブラリーの作製

60 塩基のバーコード配列を 2 コピーずつ有すベクターを、約 90 種類作製した。バーコード配列以外の領域でも、オリゴヌクレオチドの合成の対象となった領域は、すべてシーケンシングを行い、合成や PCR 時のエラーが生じたクローンは、すべて除外した。60 塩基の配列を 2 コピー導入するため、合成オリゴヌクレオチドの長さが、通常のカスタム・メイドの範囲外となった。このため、オリゴヌクレオチドの品質も予想以上に低かったと思われる、PCR での増幅効率も低かった。この点については、増幅に用いる酵素や、PCR 時の条件を検討することで、問題を回避できた。

(2) バーコード配列の PCR による増幅条件の検討

Illumina 社のシーケンサーによりバーコード配列を決定するには、バーコードを増幅した PCR 産物の両側に、Illumina 社のシーケンサー用のアダプター配列が付加されている必要がある。アダプター配列の導入には、PCR プライマーの 5' 側にアダプター配列を導入する方法と、PCR 産物に対してアダプター配列を含むリンカー DNA を ligation 反応により付加する方法の 2 通りがある。当初は、

前者の方法を試みたが、十分な効率の増幅を得られなかった。このため、後者の ligation による方法に変更し、十分な read 数を得ることに成功した。

(3) バーコードの検出効率の検討

バーコードベクターを等量ずつ混合して、マウスゲノム DNA で希釈することで、「バーコード導入後の細胞集団からゲノム DNA を抽出した状況」を模倣した鋳型 DNA を調製した。この鋳型に対して、PCR によるバーコード領域の増幅を、独立して3回行った。アダプター配列を、各 PCR 産物の両側に連結後、Illumina 社の次世代型シーケンサーを用いて、各バーコードの出現率を比較した。一部のバーコードでは、read 数が明らかに少なかったことから、バーコード配列に応じて PCR での増幅効率に差があると考えられた。しかし、各バーコードにおける read 数自体は、3回の PCR でほぼ一定であった。よって、各細胞の増減を、バーコードの read 数で推測できることが示された。Read 数が極端に少ないバーコードにおいても、同じベクターが有している、もう一方のバーコードにおいて、十分な read 数が得られていた。よって、2コピーのバーコードの結果を総合的に評価することで、より精度の高い定量が可能になることがわかった。

(4) バーコードを利用したホモ変異体の表現型解析

各バーコードを有すレトロウイルスベクターをホモ変異体へ個別に導入してブラストサイジンで選択した。ほぼすべてのベクターにおいてバーコード配列による感染効率の低下は認めず、容易に細胞を標識できた。バーコードで標識した、これらのホモ変異体を、あらかじめ測定済みの、変異体の増殖速度を考慮して、プールした。

プールした細胞集団に対して、薬剤の投与や分化誘導を行い、その前後でゲノム DNA を抽出して、上記の方法により各バーコードの存在比率を定量した。

分化誘導実験においては、既知の分化抵抗性変異株が、未分化性の細胞分画中に濃縮されていることが確認され、分化誘導自体が期待通りに進行したことが示唆された。さらに、分化抵抗性としての報告の無い変異体も濃縮されていた。これより、本研究の目的であった、順遺伝学による新たな遺伝子機能の同定が達成されたと考えられた。

5. 主な発表論文等

[その他]

変異 ES 細胞については、研究室のホームページにおいて、リストを公開している。

www.med.osaka-u.ac.jp/pub/mr-envi/www/e

nglish/homo/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀江 恭二 (HORIE KYOJI)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30333446