

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25年5月31日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23700514

研究課題名（和文） 独自の *in vivo* 部位特異的遺伝子導入法による、コンディショナル発現系の開発

研究課題名（英文） Development of conditional expression system in mice generated by site-specific gene integration method

研究代表者

大塚 正人 (OHTSUKA MASATO)

東海大学・医学部・講師

研究者番号：90372945

研究成果の概要（和文）：本研究計画では、申請者が開発したターゲットトランスジェニック（Tg）マウス作製法（PITT法）の有用性、汎用性の向上を目指し、1）組織特異的プロモーターの使用と有用性の証明、2）Dre-rox組換え系への応用、3）floxedコンストラクトを挿入可能とする新たな種マウス作製、4）誘導遺伝子発現系の構築、を実行し、技術的可能性を評価すると同時に、学術的研究に有用なマウスリソースの開発を行った。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to make our targeted transgenesis method (PITT) more versatile by developing a conditional and tissue-specific expression system applicable to it. For this purpose, we conducted: 1) generation of PITT mice exhibiting tissue-specific transgene expression, 2) development of Dre reporter mouse useful for evaluation of Dre expression, 3) development of new seed mouse line that allows to integrate floxed allele, and 4) development of inducible expression system using KRAB repressor.

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	3,300,000	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

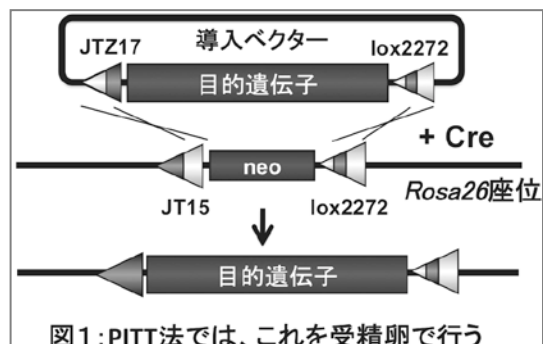
キーワード：トランスジェニックマウス、顕微注入法、Cre-loxP、PITT、コンディショナル発現

1. 研究開始当初の背景

トランスジェニック (Tg) マウスは、遺伝子機能解析、疾患解析の為の実験動物として広く利用されており、遺伝子改変 Tg マウスとして多くの疾患モデルマウスも作製されている。Tg マウス作製法としては、受精卵の前核内に目的遺伝子を顕微注入法で直接的に導入する方法が一般的であるが、目的遺伝子の挿入位置やコピー数を制御できない。その

結果、導入遺伝子の発現量にばらつきが生じたり、他の遺伝子を潰している恐れもあるため、複数の Tg 系統を樹立して表現型が統一しているかを調べる必要がある。これを回避する手法として、ES 細胞内での相同組換えを利用した遺伝子ターゲティング法があるが、マウス作製に時間、コスト、労力を要する。申請者はこれまでに、マウス受精卵への顕微注入法に Cre-loxP 部位特異的組換え系を

応用し、ES細胞を介さず、特定遺伝子座位へ目的遺伝子を導入する Tg マウス作製新手法、“Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis (PITT)法”を開発した(図1)。



従来の顕微注入法と同じ手順で、*Rosa26* 遺伝子座位に1コピーのコンストラクトをルーチンに導入することが可能である。これは、受精卵への顕微注入法で部位特異的 Tg マウス系統(生殖系列伝播も確認済み)を得た世界初の報告であり、また、遺伝子強発現 Tg だけでなく RNAi による個体レベルのノックダウンにも応用できることを実証した(Ohtsuka et al. 2010)。

2. 研究の目的

これまで PITT 法は、ユビキタスな遺伝子発現を目的とした Tg マウス作製に用いてきた。他の研究者からは、「これを是非利用したいのだが、組織特異的、あるいはコンディショナルな遺伝子発現に応用できないか」との要望が非常に多く、申請者も是非それを確立したいと考えた。しかし、A. *Rosa26* 領域上での組織特異的プロモーターの活性については殆ど知られていない、B. コンディショナル発現に頻繁に使われる Cre-loxP 系は、PITT 法を行う際に既に用いているため利用困難である、と言った疑問点・問題点があった。そこで本研究でこれらを解決し、組織特異的、コンディショナル遺伝子発現 Tg マウス作製を可能とすることにより、PITT 法の有用性、応用性を高めることを目的として本研究計画を立案した。

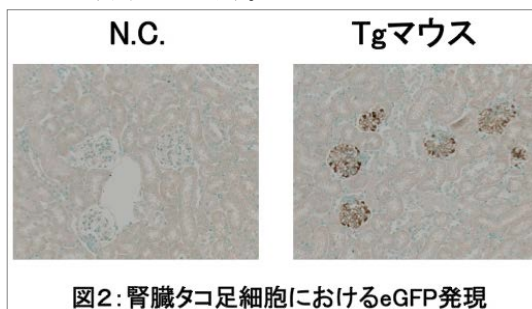
3. 研究の方法

本研究計画では、申請者が開発したターゲット Tg マウス作製法 (PITT 法) について、(1) 組織特異的プロモーターの使用、(2) Dre-rox 組換え系への応用、(3) floxed コンストラクトの挿入系の確立、(4) 誘導遺伝子発現系の構築、を実行する。そのために、(a) 導入コンストラクトの作製、(b) 培養細胞へコンストラクトを導入することによる検証、(c) PITT 法による Tg マウス作製、(d) 得られた Tg マウスの解析、の流れで実験を進める。

4. 研究成果

(1) 組織特異的プロモーターの使用

これまでの PITT 法は全てユビキタスな遺伝子発現を目的としたものであったが、これが組織特異的発現に応用できれば、その汎用性はさらに向上する。そこで今回、組織特異的プロモーターを用いた Tg マウス作製を目指した。これにより、これまでに殆ど報告のない“*Rosa26* 座位における組織特異的プロモーター活性”の解明にも繋がること期待される。そこで、まず腎臓のタコ足細胞での遺伝子発現を目的とした Nephtrin プロモーターと、脳神経系での発現を目的とした Thy-1 プロモーターを使用した Tg マウス作製を試みた。その結果、両方のコンストラクトで目的の PITT Tg マウスを得ることに成功した。先に作製された Nephtrin プロモーター Tg マウスから発現解析を行ったが、この Tg マウスでは腎臓のタコ足細胞で特異的に遺伝子 (eGFP) が発現することを確認できたことから(図2)、PITT 法が組織特異的発現にも応用可能であることが示された。またこの結果は、各種プロモーター解析に *Rosa26* 座位が有用である可能性も示唆している。Thy-1 プロモーターに関しては、現在解析に使用可能なマウスが産まれてきたところであり、現在解析を進行中である(下記2参照)。



(2) Dre-rox 組換え系への応用

Dre-rox 系はマウス遺伝子工学の新たなツールとして期待されているが、まだ使用例の報告は少ない。Dre-rox 系がマウス個体内で使用できれば、Cre-loxP 系と組み合わせることにより、より厳密な遺伝子発現系を構築することが可能となる。今回、その為に有用なリソース開発(二色蛍光 Dre レポーターマウス)と、実験系の検証を行った。

まず二色蛍光 Dre レポーターコンストラクトを作製し、PITT 用導入ベクターにクローニングした。次に作製された pAXV (14-kb) を用い、PITT 法で Tg マウス作製を行った。まず pAXV について 305 個の受精卵に顕微注入した。1晩培養後に正常に2細胞期に発生した 186 個の卵を偽妊娠マウスの卵管に移植した。その後、54 個体の仔マウスを得ることができ、そのうちの1個体が目的の組換え体であった。この個体はトランスジーンを次世代に伝えるものであったため、Dre レポーター

マウスとして系統化した後に、Dre 組換え酵素を導入することによる赤蛍光発現の有無を検討した。具体的には、Dre レポーターマウスの 1 細胞期胚に Dre 発現ベクターを注入し、胎胚期胚まで発生させて蛍光を観察した。その結果、Dre 発現ベクターを注入した場合のみ赤蛍光を発する胚が生じることを確認した (図 3)。これにより、Dre-rox の系が期待通りに働くことを確認できたと同時に、PITT 法で作製したマウスでは、僅か 1 系統しか得られない場合でも予想通りの発現パターンを示すことが確認された。この Dre-rox 系は、頻繁に使用される Cre-loxP 系と併用して使用することが可能であり、2 種類の遺伝子をそれぞれコンディショナルに発現させる等、複雑な遺伝子機能解析への応用が期待される。

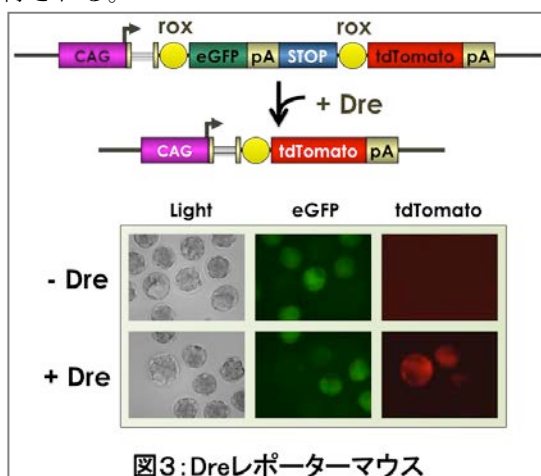


図3: Dreレポーターマウス

また Dre に関しては、Thy-1 プロモーター下で Dre 酵素を発現する Tg マウスの作製も行った。調製した PITT 用コンストラクト (pBFD) を iCre mRNA と共に 311 個の受精卵に顕微注入した。1 晩培養後に正常に 2 細胞期に発生した 226 個の卵を偽妊娠マウスの卵管に移植した。その後、15 個体の仔マウスを得ることができ、そのうちの 4 個体が目的の組換え体であった。得られたマウスは 1 系統が出生後に死んでしまったものの、他の 3 系統は全て次世代にトランスジーンを伝えるものであった。現在、Thy-1 プロモーター-Dre マウスを上記 Dre レポーターマウスと交配してダブル Tg マウスを作製しているところである。これにより、Dre-rox 系を用いたコンディショナル遺伝子発現が実現するものと期待される。

(3) floxed コンストラクトの挿入系の確立

floxed コンストラクト Tg マウスは、Cre ドライバーマウスと交配することにより、目的遺伝子をコンディショナルに発現させることが可能である。しかし、これまでに floxed コンストラクトを PITT 法で挿入したことはなかった。PITT 法では遺伝子挿入のた

めに Cre-loxP 系を使用しているため、導入の際に floxed カセットも抜けてしまう恐れがある。当初は floxed カセット中の loxP の CpG 部位を *in vitro* でメチル化しておくことによって、これを回避することを予定していたが、ベクター作製がやや煩雑になると考えられたことから、floxed カセットを挿入可能なタグを有する種マウスを新たに作製することとした。

新しい種マウスを作製する際に、現システムで使用している変異 loxP 配列 (Cre-loxP 用) だけでなく、他の組換え系 (FLP-FRT 系、 ϕ C31 integrase 系) 用の目印も同時に組み込むこととした。導入の際に用いる組換え系の選択の幅を広げて汎用性を拡張するためである。また、世界的標準系統である純系の C57BL/6N で作製し、有用性の向上を目指した。

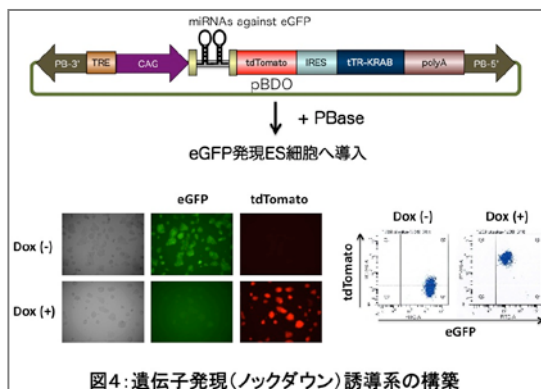
BAC 改変法で作製した遺伝子ターゲティングベクター (pBDT) を用い、大阪大学の発生工学研究会との共同研究で C57BL/6N 系統での遺伝子ターゲティングを行った。ES 細胞を顕微注入して作製されたキメラマウスから、新しい種マウスの仔を得ることに成功した。この新たなマウスリソースを実際に PITT 法に用いる為に、クリーニングを行って飼育室に移動した後、ホモマウスを得るためにヘテロマウス同士の交配を進めた。その結果、無事にホモマウスを得ることができた。今後、全てをホモマウスで維持することとし、PITT 法を用いて floxed カセット Tg マウス作製に使用する予定である。既に、この新しい種マウスを用いた PITT 法、及びその条件設定に着手しており、一部結果も出つつある (下記 4 参照)。

(4) 誘導遺伝子発現系の構築

哺乳類 Kox1 遺伝子の KRAB リプレッサードメインを用いたドキシサイクリン誘導系の確立を目指した。この系は、まだ広くは利用されていないものの、1 種類のカセットで遺伝子発現誘導が可能となる (通常は、2 種類のカセットを使用する必要がある)、遺伝子発現に漏れが生じにくい、遺伝子ノックダウンにも応用可能である、といった利点がある。マウスの細胞と個体においては、レンチウイルスを使用した系が用いられているが (Szulc et al. Nat. Methods 2006)、我々はこれを通常のプラスミドベクター系に組み込み、最終的に PITT 法への応用することを目指している。

まず、Szulc らのレンチウイルスベクターを入手し、TRE 配列や tTR-KRAB 配列を我々のプラスミドベクターにクローニングした。同時に、赤蛍光遺伝子 tdTomato と、eGFP に対する microRNA を付加した。こうして作製された発現カセット「TRE-CAG-miR

eGFP-tdTomato-IRES-tTR-KRAB-polyA」を、遺伝子挿入効率の高い（ランダム挿入ではあるが）piggyBac トランスポゾンベクターに組み込むことにより、pBDO ベクターを完成させた（図4）。次に、ES 細胞への pBDO 導入を行った。使用した ES 細胞は、我々が過去に独自に樹立した eGFP 安定発現細胞株（1D4）である。3×10⁵ 個の細胞にリポフェクタミン 2000 を用いて pBDO トランスポゾンベクターを導入（piggyBac 発現ベクター、及びネオマイシン耐性遺伝子トランスポゾンベクターと共導入）した結果、数多くのコロニーを得ることができた。24 クローンを拾い、そのうちの 2 クローンの解析を行った結果、1µg/ml のドキシサイクリンで tdTomato 遺伝子発現が誘導できること、また同時に eGFP 遺伝子がノックダウンできること、が分かった（図4）。これにより、新たな遺伝子誘導系を独自に構築することができたと言え、今回作製したベクターは、細胞レベルでの様々な遺伝子発現誘導や、ノックダウンに有用なリソースとなると期待される。



次に、上述した C57BL/6 背景の種マウスを利用して本誘導系遺伝子発現 Tg マウスを PITT 法で作製した。無事に目的の Tg マウスを得ることができたため、現在その検証を個体レベルで行っている。本発現誘導系は Cre-loxP によるコンディショナル発現系と併用可能な独自のデザインとなっており、今後この万能なシステムを世界に先駆けて完成させたい。

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 16 件)

1. Ohtsuka M., Miura H., Hayashi H., Nakaoka H., Kimura M., Sato M., Gurumurthy C. B. and Inoko H. Improvement of pronuclear injection-based targeted

transgenesis (PITT) by iCre mRNA-mediated site-specific recombination. *Transgenic Res.*, in press DOI:10.1007/s11248-013-9703-x 査読有

2. Miura H., Inoko H., Inoue I., Okada Y., Tanaka M., Sato M. and Ohtsuka M. piggyBac-mediated generation of stable transfectants with surface HLA expression from a small number of cells. *Anal. Biochem.*, 437, 29-31 (2013) DOI:10.1016/j.ab.2013.02.003 査読有
3. Sato M., Akasaka E., Saitoh I., Ohtsuka M., Nakamura S., Sakurai T. and Watanabe S. Targeted Toxin-Based Selectable Drug-free Enrichment of Mammalian Cells with High Transgene Expression. *Biology*, 2, 341-355 (2013) DOI:10.3390/biology2010341 査読有
4. Sato M., Kubota N, Inada E, Saitoh I., Ohtsuka M., Nakamura S., Sakurai T., Watanabe S. HeLa cells consist of two cell types, as evidenced by cytochemical staining for alkaline phosphatase activity: A possible model for cancer stem cell study. *Advances in Stem Cells*, 2013, 208514 (2013) DOI:10.5171/208514.767448 査読有
5. Sato M., Ohtsuka M., Nakamura S., Sakurai T., Watanabe S. and Yasuoka Y. Functional recovery of a whole ovary transplanted into syngenic testis in mice. *Cloning & Transgenesis*, 1, 1000102 (2012) DOI:10.4172/2168-9849.1000102 査読有
6. Ohtsuka M., Miura H., Gurumurthy C. B., Kimura M., Inoko H., Yoshimura S. and Sato M. Fluorescent transgenic mice suitable for multi-color aggregation chimera studies. *Cell Tissue Res.* 350, 251-260 (2012) DOI:10.1007/s00441-012-1470-0 査読有
7. Sato M., Akasaka E., Saitoh I., Ohtsuka M., Nakamura S., Sakurai T. and Watanabe S. A simplified protocol for the semi-large scale recovery of plasmids from Escherichia coli grown on agar plates. *J Biomed*

- Sci Eng. 5, 406-408 (2012)
DOI:10.4236/jbise.2012.57051 査読有
8. Ohtsuka M., Miura H., Sato M., Kimura M., Inoko H. and Gurumurthy C. B. PITT: Pronuclear Injection-based Targeted Transgenesis, a Reliable Transgene Expression Method in Mice. *Exp. Anim.* 61, 489-502. (2012)
DOI:10.1538/expanim.61.489 査読有
 9. Sato M., Akasaka E., Saitoh I., Ohtsuka M. and Watanabe S. In vivo gene transfer in mouse preimplantation embryos after intraoviductal injection of plasmid DNA and subsequent in vivo electroporation. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58, 278-287 (2012)
DOI:10.3109/19396368.2012.688088 査読有
 10. Sato M., Ohtsuka M., Miura H., Miyoshi K. and Watanabe S. Determination of the optimal concentration of several selective drugs useful for generating multi-transgenic porcine embryonic fibroblasts. *Reprod. Domest. Anim.* 47, 759-765 (2012)
DOI:10.1111/j.1439-0531.2011.01964.x 査読有
 11. Sato M., Akasaka E., Saitoh I., Ohtsuka M. and Watanabe S. Development of a technique for efficient gene transfer to antral follicular cells in the mouse ovary. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 58, 136-141 (2012)
DOI:10.3109/19396368.2012.656796 査読有
 12. 桑島幸紀、大塚正人、石崎明、藤村朗 赤色蛍光強発現遺伝子導入マウスにおける蛍光発現部位の形態学的検討. *岩手医科大学歯学雑誌.* 37, 24-37. (2012)
査読有
 13. Ohtsuka M., Miura H., Nakaoka H. Kimura M., Sato M. and Inoko H. Targeted transgenesis through pronuclear injection of improved vectors into *in vitro* fertilized eggs. *Transgenic Res.* 21, 225-226 (2012)
DOI:10.1007/s11248-011-9505-y 査読有
 14. Yoshii Y., Otomo A., Pan L., Ohtsuka M. and Hadano S. Loss of glial fibrillary acidic protein marginally accelerates disease progression in a SOD1^{H46R} transgenic mouse model of ALS. *Neurosci. Res.* 70, 321-329 (2011)
DOI:10.1016/j.neures.2011.03.006 査読有
 15. 大塚正人:PITT法—マウス受精卵での部位特異的遺伝子導入法. *実験医学.* 29, 2687-2692. (2011) 査読無
 16. Miura H., Inoko H., Inoue I., Tanaka M., Sato M. and Ohtsuka M. Simple cloning strategy using GFPuv gene as positive/negative indicator. *Anal. Biochem.* 416, 237-239 (2011)
DOI:10.1016/j.ab.2011.04.040 査読有
- [学会発表] (計 18 件)
1. 三浦浩美、佐藤正宏、大塚正人 PITT法を利用して作製したノックダウンマウスにおけるノックダウン効果の比較解析 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月
 2. 大塚正人、佐藤正宏、三浦浩美 iCre mRNA 注入による次世代型トランスジェニックマウス作製法 (PITT) の効率改善 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月
 3. 佐藤正宏、赤坂恵理、斉藤一誠、大塚正人、渡部聡 マウス成熟卵胞細胞への生体内遺伝子導入法の開発 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月
 4. 大塚正人 受精卵への顕微注入法を介したターゲットトランスジェニックマウス作製_第14回REG部会、東京、2012年11月
 5. 安岡有紀子、大塚正人、佐藤雄一、木村穰、河原克雅 腎近位尿細管Kチャンネル (TASK2) の酸塩基調節における役割 第42回日本腎臓学会東部学術大会、新潟、2012年10月
 6. 佐藤正宏、赤坂恵理、斉藤一誠、大塚正人、渡部聡 プラスミドDNAの卵管内注入、続く電気穿孔によるマウス着床前胚への遺伝子導入法の開発 第59回日本実験動物学会総会、別府、2012年5月
 7. 大塚正人、三浦浩美、木村穰、猪子英俊 Recombinase及びIntegraseによる部位特異的遺伝子導入効率の比較検討 第59回日本実験動物学会総会、別府、2012年5月
 8. 城戸直人、高橋沙世、菊池光太、鈴木綾、大久保直登、鄒 鶴、田邊千晶、劉俊俊、劉姝余、前田智司、大塚正人、藤村朗、佐原資謹、石崎明、駒野宏人 間葉系幹細胞の経鼻脳内ホーミングの解析 第78回日本生化学会東北支部例会、山形、2012年5月

9. 佐藤正宏、大塚正人、中村伸吾、櫻井敬之、渡部聡 選択用薬剤を使わない簡便な遺伝子高発現細胞株の取得方法 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月
10. 三浦浩美、佐藤正宏、猪子英俊、大塚正人 GFPuv遺伝子とTypeIIS制限酵素を用いた遺伝子発現ベクターの簡便な構築法とその応用 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月
11. 吉井康裕、大友麻子、潘雷、大塚正人、岩崎泰雄、秦野伸二 遺伝子トランスジェニックALSマウスモデルにおいてグリア線維性酸性蛋白の欠損は疾患進行に若干の影響を与える 第34回日本分子生物学会年会、横浜、2011年12月
12. 桑島幸紀、古川真司、安藤禎紀、佐原資謹、石崎明、大塚正人、藤村朗、清野幸男、三浦廣行 赤色蛍光強発現Tgマウスの歯科領域研究における有用性 第53回歯科基礎医学会学術大会・総会、岐阜、2011年9-10月
13. Dilidaer Kudereti, Fujio Miyawaki, Hiroki Haremake, Tomohiro Yoshizawa, Masato Ohtsuka, Jun Hasegawa Vibratory Microinjection System Facilitates Injection of BAC Transgene Mouse Molecular Genetics, Wellcome Trust Genome Campus, Hinxton, Cambridge, UK., 20 - 23 September 2011
14. 秦野伸二、吉井康裕、大友麻子、潘雷、大塚正人、岩崎泰雄 SOD1^{H46R}遺伝子トランスジェニックALSマウスモデルにおいてグリア線維性酸性蛋白の欠損は疾患をわずかに進行させる 第54回日本神経化学学会大会、石川、2011年9月26~28日
15. 三浦浩美、猪子英俊、木村穰、大塚正人 再現性良いノックダウン効率を示す、miRNA 発現トランスジェニックマウス作製法の確立 第104回日本繁殖生物学会大会、盛岡、2011年9月
16. 大塚正人、三浦浩美、木村穰、猪子英俊 受精卵への顕微注入法を介した、部位特異的トランスジェニックマウス作製法 第104回日本繁殖生物学会大会、盛岡、2011年9月
17. 吉井康裕、大友麻子、Pan L.、大塚正人、川邊清一、池田憲、岩崎泰雄、池田穰衛、秦野伸二 SOD1H46R遺伝子組み換えALSマウスモデルにおいてグリア線維性産生蛋白の欠損は疾患をわずかに進行させる 第52回日本神経学会学術大会、名古屋、2011年5月
18. 大塚正人、三浦浩美、木村穰、猪子英俊

受精卵への顕微注入法を介した、部位特異的トランスジェニックマウス作製法 第58回日本実験動物学会総会、東京、2011年5月

〔図書〕(計1件)

1. Ohtsuka-M., Takeda H., and Shimada A. *Double anal fin (Da)*: a medaka mutant exhibiting a mirror-image pattern duplication of the dorsal-ventral axis. in *Medaka: Model for Organogenesis, Human Diseases and Evolution*. Chapter 13, 201-215 (Springer press) (2011)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

名称: 標的遺伝子のノックダウン方法およびそのためのRNAi用発現ベクター

発明者: 大塚正人、三浦浩美

権利者: 東海大学

種類: 特許

番号: 2012-259950

出願年月日: 平成24年11月28日

国内外の別: 国内

名称: 部位特異的組換え系を利用した遺伝子導入方法およびそのためのキット

発明者: 大塚正人

権利者: 東海大学

種類: 特許

番号: 2012-259951

出願年月日: 平成24年11月28日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 正人 (OHTSUKA MASATO)

東海大学・医学部・講師

研究者番号: 90372945