

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 6 月 12 日現在

機関番号：82508
 研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23700519
 研究課題名(和文) マウス個体における人工染色体を用いた新たな遺伝子機能解析システムの開発
 研究課題名(英文) Development of gene functional analysis system using human artificial chromosome in mouse
 研究代表者
 岡村 佳明 (OKAMURA YOSHIAKI)
 公益財団法人かずさ DNA 研究所・ヒトゲノム研究部・プロジェクト研究員
 研究者番号：90569831

研究成果の概要（和文）：

セントロメア領域由来反復 DNA 配列(アルフォイド DNA)から構成されるヒト人工染色体(HAC; Human Artificial Chromosome)は、宿主染色体とは独立かつ安定的に分配・維持される。tetO 配列を組込んだ合成アルフォイド DNA からなる HAC(tetO-HAC)は脱落制御が可能であることが当研究グループにより証明されている。本研究は、マウス個体における新たな遺伝子機能解析手法の開発を目指した tetO-HAC の開発を目的とする。現在までに、遺伝子発現カセット搭載可能な tetO-HAC を作製し、この tetO-HAC の脱落が確認されたことから、マウス個体レベルの遺伝子機能解析に必須な tetO-HAC の基盤が構築出来たといえる。

研究成果の概要（英文）：

Human Artificial Chromosome (HAC) is a chromosomal vector that has repetitive DNA sequence derived from centromere region, which can be segregated independently with host chromosome and stably maintained within the cells. Recently, we demonstrated that HAC introduced tetO sequences (tetO-HAC) can be eliminated from cells by inducing excess heterochromatin using transcriptional repressor, tTS. To develop the gene functional analysis system using tetO-HAC in mouse, we generated tetO-HAC that can be integrated gene expression cassettes. Then, GFP or tTS-EYFP expression cassettes was integrated into the tetO-HAC. In the case of the tetO-HAC that has tTS-EYFP cassette, tetO-HAC was eliminated from cells in the absence of Dox, which induce heterochromatin into the tetO-HAC. These data provide an important basis for development of the gene functional analysis system using tetO-HAC in mouse.

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：動物実験技術

1. 研究開始当初の背景

(1) トランスジェニックマウスを用いた遺伝子機能解析系の問題点

現在、マウス個体を用いた遺伝子機能解析ではトランスジェニックマウスによる過剰

発現等の系がよく使用されている。しかしながら、トランスジェニックマウス個体の作製に際しては、発現制御配列を含む線状化した DNA 配列を宿主ゲノムへランダムに挿入させることで達成されている。この方法では以

下の問題点から、予想通りの発現を示すマウス個体を得ることが困難な場合が存在することが周知の事実である。

問題点①;挿入部位によって周囲の発現制御領域の影響を受け、必ずしも cis 配列による発現制御が起こせないことや無関係な発現制御が起こることがある。

問題点②; transgene を受け継いでも、次世代では発現がなくなる。

問題点③; transgene の宿主ゲノムへの挿入による表現型への影響が、常に付きまとう。

上記の問題点を含みながら研究が行われているのが現状である。

(2) ヒト人工染色体 (HAC) の性質

ヒト 21 番染色体セントロメア領域由来反復 DNA 配列 (アルフォイド DNA) をタンデムに連結した de novo HAC は、宿主ゲノムに無害、かつ安定的に分配・維持されることが証明されている (Ikeno et al, *Nat. Biotech.*, 1998, Ohzeki et al. *JCB*, 2002, Okada et al. *Cell*, 2007)。また、この HAC には 200kb のゲノム配列を導入することも可能である (Suzuki et al, *JBC*, 2006)。また近年、当研究グループにより、培養細胞において人工染色体にヘテロクロマチン化を過剰に誘導すると、細胞増殖と共に急速に細胞から脱落していくことが判明した (Nakano et al, *Dev. Cell*, 2008)。HAC への過剰なヘテロクロマチンの誘導には、アルフォイド DNA の繰り返し単位中に tet オペレーター配列 (tetO) を組込んだ合成アルフォイド DNA を有する HAC (tetO-HAC) に、転写サイレンサー-tTS (Dox 依存的に結合の制御が可能) を結合させることで達成されている。しかしながら今現在、このように様々な利点を有する HAC を、特にマウス個体レベルの解析へと応用することはほとんど試みられていないのが現状である。また、トランスジェニックマウスの作製に HAC を利用することで、上記の問題点が解消されることが期待できる。

(3) マウス個体を用いた遺伝子機能解析の現状

現在、マウス個体を用いて遺伝子機能を解析する際は、ノックアウトマウスとトランスジェニックマウスを組み合わせた遺伝学的解析が主な手法である。条件付きノックアウトマウスの利用することで、目的遺伝子の組織、時期特異的な機能喪失を引き起こすこと

が可能である。しかし、ショウジョウバエで既に開発されているモザイク解析は遺伝子機能解析の強力なツールとして知られるが、マウスにおいては未だ開発されていない。tetO-HAC を用いたマウス個体レベルの新たな遺伝子機能解析手法の開発により、マウス個体レベルのモザイク解析も可能であると考えられる。

2. 研究の目的

HAC は宿主染色体とは独立かつ安定に維持分配されることから、トランスジェニックマウスを作製する際に HAC を用いることで、今までのトランスジェニックマウス作製時に起こっていた問題点が解消することが期待できる。さらに、今後脱落制御可能な HAC 保有マウス個体の解析は、新たな遺伝子機能解析技術の開発に大きく貢献することが予想される。そこで本研究では、脱落制御可能な HAC のマウス個体における性状解析を目指した tetO-HAC の開発を目的とする。

3. 研究の方法

脱落制御可能な HAC をマウス個体へ導入・利用することは、今後のマウス個体を用いた新たな遺伝子機能解析システムへ大きく貢献することが期待される。本研究では、培養細胞で実績のある tetO-HAC をマウス個体へ導入し、その性状を解析するため、以下の事柄について焦点をあてて研究を進めて行く。

- ① 遺伝子発現カセット搭載可能な tetO-HAC の作製
- ② tetO-HAC へのマーカー遺伝子発現カセットの搭載
- ③ tetO-HAC 保有マウスの作製と搭載したマーカー遺伝子の発現解析
- ④ 脱落制御用 tTS 発現マウスの作製と、tetO-HAC 脱落の確認

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現カセット搭載可能な tetO-HAC の作製

アルフォイド DNA の繰り返し単位中に tetO 配列を組込んだ合成アルフォイド DNA と共に CAG プロモーター下流に loxP 変異体 lox71 と薬剤耐性遺伝子を含むベクターを同時に培養細胞へ導入することで、target 可能な tetO-HAC を作製した。

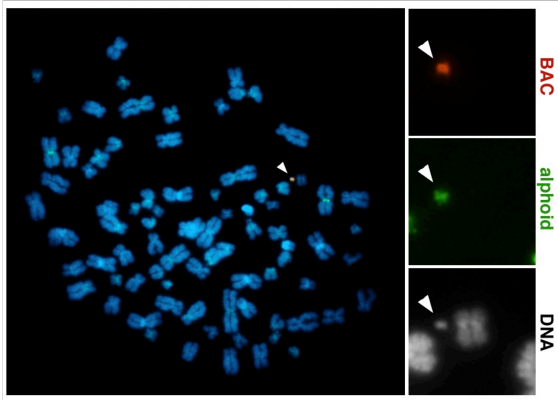


図 1. 遺伝子発現カセット搭載可能な tetO-HAC の FISH 解析。導入 BAC に対する probe を赤、アルフォイド DNA に対する probe を緑で示す。

その結果、宿主染色体とは独立に維持される tetO-HAC が得られた (図 1; 矢頭)。

(2) tetO-HAC へのマーカー遺伝子発現カセットの搭載

新規に作製された tetO-HAC 株に対し、lox66 GFP IRES puro プラスミドと Cre 発現プラスミドを導入し、薬剤耐性株を得ることで tetO-HAC 上の CAG プロモーターから GFP を発現する株を複数得た。

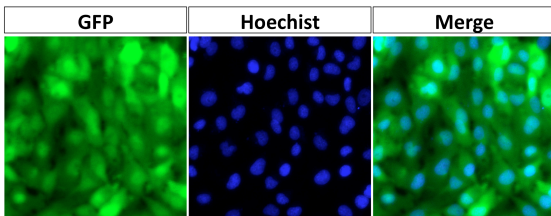


図 2. GFP 発現カセット搭載 tetO-HAC 株。

その結果、ほぼ全ての細胞で GFP を発現する tetO-HAC 株が得られた。

また、同様に lox66 tTS-EYFP IRES BS プラスミドと Cre 発現プラスミドを Dox 添加培地で培養した tetO-HAC 株へ導入し、薬剤耐性株を複数得た (図 3)。

この株について、Dox を培地中から取り除き培養することで、tetO-HAC 上から発現する tTS-EYFP によって tetO-HAC の脱落が誘導出来るかどうかを検討した。その結果、Dox 除去 3 日目から tTS-EYFP と HAC の両方が検出されない細胞が観察され始め、Dox 除去後 7、14 日目を観察すると、最終的に HAC 保持細胞の割合は 1 割以下に減少した。この結果は、tetO-HAC 株に tTS-EYFP 発現レトロウイルスを感染させた以前の報告 (Nakano et al, *Dev. Cell*, 2008) のものと同様であった。

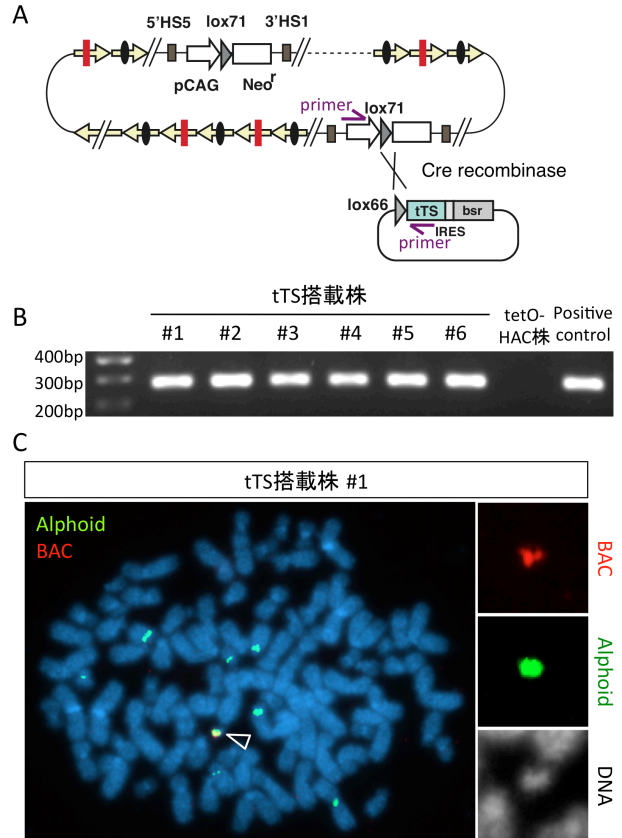


図 3. tetO-HAC への tTS-EYFP カセット搭載。A; tetO-HAC へのカセット搭載の模式図。B; カセット搭載の PCR による確認。C; tTS 搭載株の FISH 解析。カセット搭載後も tetO-HAC は宿主染色体とは独立に維持されている (矢頭)。

これらの結果から、tetO-HAC から発現する tTS により自己脱落制御も可能であるという新たな性質が明らかとなった。また、これまで得られている成果から、マウス個体レベルの遺伝子機能解析に必須な tetO-HAC の基盤が構築できたといえる。

現在、GFP 遺伝子発現カセット搭載 tetO-HAC 保有マウス個体の作製へ向けて、ES 細胞への tetO-HAC の導入を進めている。HAC の ES 細胞への導入については先行研究による実績があり、実現可能である。今後、tTS 発現トランスジェニックマウスと掛合わせ、マウス個体内での tetO-HAC の脱落制御と HAC に搭載した GFP 遺伝子の発現の相関を詳細に調べていくことで、tetO-HAC を用いたマウス個体レベルの新たな遺伝子機能解析手法の開発を目指す。

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 2 件)

1. Yoshiaki Okamura, Tsukasa shimojima, Megumi Nakano, Jun-ichirou Ohzeki, Yoshinori Hasegawa, Masashi Ikeno, William C. Earnshaw, Vladimir Larionov and Hiroshi Masumoto.

Generation of induced Pluripotent stem cells (iPSCs) using conditional human artificial chromosome (HAC)

第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、マリンメッセ福岡

2. Yoshiaki Okamura, Tsukasa Simojima, Megumi Nakano, Jun-ichirou Ohzeki, Yoshinori Hasegawa, Masashi Ikeno, William C. Earnshaw, Vladimir Larionov, Hiroshi Masumoto.

Generation of induced Pluripotent stem cells (iPSCs) using conditional human artificial chromosome (HAC)

第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡村 佳明 (OKAMURA YOSHIAKI)

公益財団法人かずさ DNA 研究所・ヒトゲノム研究部・プロジェクト研究員

研究者番号 : 90569831

(2) 研究協力者

中野 めぐみ (NAKANO MEGUMI)

公益財団法人かずさ DNA 研究所・ヒトゲノム研究部・研究員

研究者番号 : 50542825

(3) 研究協力者

大関 淳一郎 (OHZEKI JUN-ICHIROU)

公益財団法人かずさ DNA 研究所・ヒトゲノム研究部・研究員

研究者番号 : 30514088