

## ジーントラップ法を用いた分化関連遺伝子の探索及び解析

### Isolation and analysis of developmental control gene with gene trap method

代表研究者 熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設助手 荒木喜美  
Institute of Molecular Embryology and Genetics, Kumamoto University School of  
Medicine. Kimi ARAKI

We have developed a new gene trap vector, pU-san. This vector contains  $\beta$ -geo, which has both  $\beta$ -galactosidase and neomycin phosphotransferase activities, as main element. But, the most remarkable feature of this vector is that loxP sites are placed at both ends of the  $\beta$ -geo. The loxP sequence is originally derived from bacteriophage P1 and target of Cre recombinase. In other words, Cre recombinase catalyzes conservative site specific recombination at loxP sites to excise the intervening gene. Therefore, by eliminating the long  $\beta$ -geo sequence from the trap vector, we can easily perform plasmid rescue to obtain trapped gene. We introduced the pU-san trap vector into ES cells, and picked up about 120 colonies in total. Then, the clones were examined the change of the  $\beta$ -geo expression during *in vitro* differentiation by formation embryo body. By difference of the expression pattern, the clones were classified into several groups, indicating that various genes have been trapped. We have chosen several clones for identification of the trapped gene, and performed elimination the  $\beta$ -geo sequence by Cre transient expression successfully. Now we are trying the plasmid rescue from the genomic DNA of the  $\beta$ -geo deleted clones.

#### 研究目的

遺伝子トラップ法とは、プロモーターを持たないレポーター遺伝子（トラップベクター）を培養細胞に導入し、それが偶発的にゲノム上の遺伝子内に挿入されると、そのレポーター遺伝子が発現するようになることを利用して、新しい遺伝子を単離する方法である。最初はショウジョウバエ等を用いておこなわれていたが、この方法に胚幹細胞 (ES 細胞)を用いることで、比較的容易かつ確実に哺乳類独自の発生関連遺伝子の単離と機能解析が可能になった。なぜなら、ES 細胞の使用により、*in vitro* の分化系を用いた解析やキメラマウス作製による個体レベルでの解析が容易に行え、さらに、キメラマウスを交配することにより、トラップベクターが挿入された突然変異マウスの系統を得ることが出来るからである。すなわち、ES 細胞を用いた遺伝子トラ

ップ法は、未知遺伝子のターゲッティングとも言える。未知遺伝子の構造と機能を個体レベルで解析できるこの方法は、発生・分化の仕組みを遺伝子レベルで解析するための非常に有効な手段である。

我々は本法の実施に必要な技術、特に効率的なトラップクローンの樹立及び選択法の確立を図り、未知の発生関連遺伝子、特に胚葉分化に関与する遺伝子の単離を試みることを目的として研究を行った。

#### 研究経過

まず、我々は、効率よく遺伝子トラップを行うために、トラップベクターの開発を行った。従来の方法の大きな問題点は、トラップされた遺伝子の広範囲な回収が容易でないことである。通常は、トラップベクター上のプラスミドの複製開始点等を利用したプラスミドレスキュー法で回収を行うが、レポーター遺伝子も一緒に回収するこ

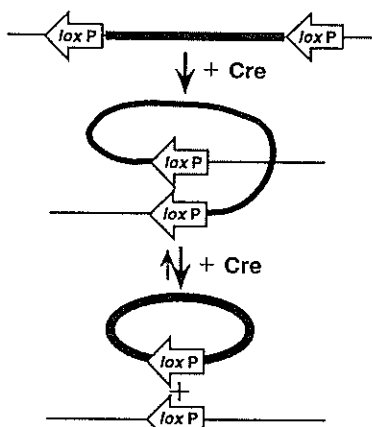


図1 Creを介した反応  
Creは2つのloxPの間で組換えを起こすので、loxPに挟まれた部分は切り出されることになる。逆反応、つまり挿入も起こるのであるが、その確率は低いので、小さな矢印で表している。

とになるため、目的とするゲノムDNAは最長2kbほどしか回収できない。また、特に、トラップベクターがタンデムに複数コピー挿入された場合の回収は極めて困難である。そこで、これを解決するために、バクテリオファージP1由来のCre-loxPシステムを利用した。CreはloxP配列を認識してその間で組換えを起こす酵素であり、従って、Creが働くと2つのloxP配列の間のDNA部分は脱落することになる(図1)。このloxP配列をトラップベクターに挿入しておけば、プラスミドレスキューの際に不必要な配列を除くことができる。レポーター遺伝子としては、lacZ遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子を融合させたβ-geoを用いた。このβ-geoが遺伝子内に挿入されて発現すると、大腸菌由来β-ガラクトシターゼ活性を示すと同時にネオマイシン耐性と

なるので、非常に高率にトラップクローンを得ることができる。最終的に完成したトラップベクターpU-sanを図2に示す。両端のスペーサーは、トラップベクターがゲノムに挿入される際に、loxPやポリリンカー部分が脱落するのを防ぐためのものである。

このpU-sanを直鎖化し、ES細胞にエレクトロポレーションにより導入した。全部で116個のコロニーをピックアップ、培養し、ストックを作製した。次に、これらのクローンの中から興味あるレポーター遺伝子の発現パターンを示すトラップクローンを選択するため、*in vitro*の分化系を用いて細胞を分化させ、その間のレポーター遺伝子の発現を調べた。ES細胞は集合塊を形成させて浮遊培養を行うと分化を開始する。約4.5日で、原始外胚葉と胚体外内胚葉に分化し、胚様体を形成し正常発生をある程度模倣する。培養を続けると中胚葉の分化も起こり、心筋・血球系細胞の分化もおこる。経時的に(未分化状態、分化開始後4日、6日、8日、11日)レポーター遺伝子の発現を観察し、その変化のパターンでトラップクローンのグループ分けを行った。それぞれのグループの中から比較的発現のよいものについて、サザンプロットでトラップベクターの挿入パターンを調べて極端な欠失やrearrangementのないものを選び、キメラマウス作製、Creによるレポーター遺伝子の削除、プラスミドレスキューを行った。



図2 トラップベクターpU-sanの構造。  
直鎖化したときの構造を示す(全長9.7kb)。コアとなる部分はマウスEn-2遺伝子由来のスプライスアクセプター(1.8kb)(SA)、Cap-independentに翻訳を開始させる働きを持つInternal Ribosomal Entry Site (IRES)、LacZとネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子であるβ-geo(4.4kb)の3つであり、それらはloxPに挟まれている。プラスミド部分はpUCであり、全体の両端には0.1-0.2kb程度のスペーサー(sp)を持つ。

表1 トラップクローンのグループ分け

型 変化パ ターン	分化後増加型		分化後減少型		不変型		山型	谷型
	発現量 EB stage	発現量 EB stage	発現量 EB stage	発現量 EB stage	発現量 EB stage	発現量 EB stage	発現量 EB stage	発現量 EB stage
116個中の クローン数	21	34	2	3	6	16	13	21
割合%	18.1%	29.3%	1.7%	2.6%	5.2%	13.8%	11.2%	18.1%

研究成果

表1にトラップクローンのグループ分けの結果を示す。最も多いパターンは分化に伴って発現が増加するものであり、全体の半分近くをしめた。β-geoを用いたトラップでは、ES細胞で発現しているものしかトラップ出来ないため、分化後に発現が増強する遺伝子が得られにくいのでは、という可能性もあったが、この結果から、そのような

遺伝子でも単離しうる事がわかった。そのほかにも、いろいろな強弱パターンがあり、さまざまな遺伝子がトラップされると期待される。

図3には、いくつかのトラップクローンのサザンプロットの結果を示す。このサザンプロットにより、まず、3-4割のクローンが複数コピーのインテグレーションをしていること、2番目に、5割近くのクローンにおいてloxP配列を含む前半のスプライスアクセプターが大きく欠失していることがわかった。1番目の結果については、予想されたことであったが、2番目については予想外であり、loxP配列を欠失してしまっているのでβ-geo部分を除くことが出来ないという問題が生じた。この点に関してはさらなるトラップベクターの改良が必要である。しかしながら、前後2つのloxP配列が残っているクローンもあるので、それらのクローンを用いて、Creによるタンデムリピート部分とβ-geo部分の削除を行った。Creの発現ベクターpCAGGS-Creを30μg環状のままエレクトロポレーション法でトラップクローンNo.1（このクローンは、X-galで染色される細胞である）に導入し、セクションなしでコロニーを形成させた。24個のコロニーをピックアップしたところ、そのうち、4クローンがX-gal染色陰性になっており、Creによる削除に成功したものと予想された。それを確認するため、サザンプロットを行った。図4に示すように、X-gal染色陰

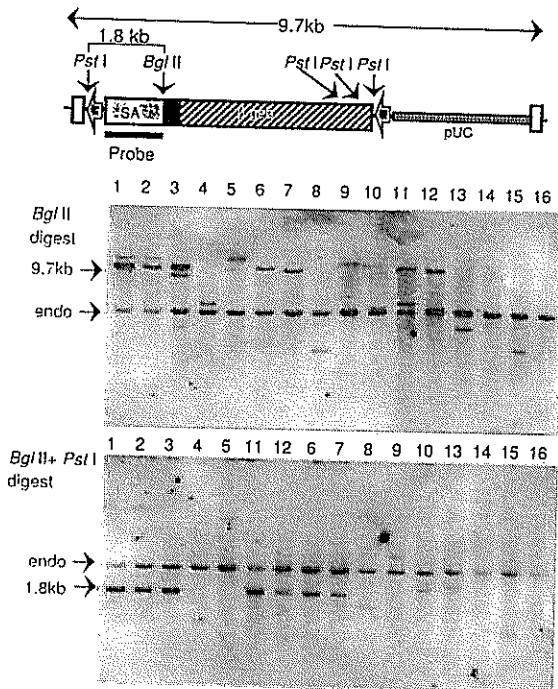


図3 トラップクローンのサザンプロット  
トラップクローンのgenomic DNAをBglII消化(上の写真)またはBglIIとPstI消化(下の写真)し、SAの部分を探としてサザンプロットを行った。endoで示してあるのは、内在性のEn-2遺伝子由来のバンドである。BglII消化で9.7kbのバンドがあるということはタンデムに複数コピー挿入されていることを示し(上の写真:1, 2, 3, 11)、BglIIとPstI消化で1.8kbのバンドがあるということはloxPを含むSAが完全に残っていることを示す(下の写真:1, 2, 3, 6, 7, 11, 12)。

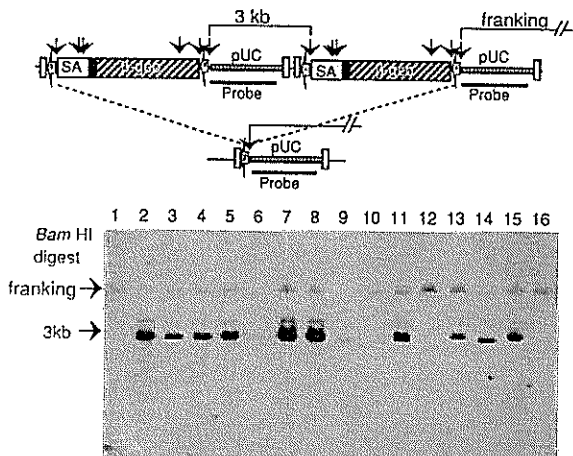


図4 Creを作用させたNo.1トラップクローンのサブプロット No.1トラップクローンでCreをtransientに発現させた後コロニーを形成させ、サブクローンを得た。それぞれのサブクローンの genomic DNAをBamHIで消化し、pUC部分をプローブにサブプロットを行った。マップの矢印はBamHIのサイトを示す。6, 9, 14はDNAが分解してしまっている。3 kbのバンドがタンデムリピート由来のバンドである。Creによる削除の成功した1, 10, 12, 16はflankingのバンドのみが見られ、3 kbのバンドは消失している。

性になったクローンはタンデムリピート部分に由来するバンドが消失しており、期待通りプラスミド部分が1コピーのみ残ったことがわかった。

現在、他のクローンについても同様のCreによるタンデムリピート部分と $\beta$ -geo部分の削除を行っており、また、成功したものについては、プラスミドレスキューも行っている。実際、6kb程度のflanking regionの回収に成功したクローンもあり、このCre-loxPシステムを利用した方法は有効であると結論できた。同時に、キメラマウスの作製も進行中である。

#### 今後の課題と発展

pU-sanには5'側のloxP配列が欠失してしまうことが多いという欠点があることがわかったので、スプライスアクセプターの直後にもloxP配列を挿入したベクターを作製する予定である。また、既に得られているトラップクローンについては、今後、プラスミドレスキューで得られた配列を解析していくことでトラップされた遺伝子を同

定する予定である。また、作製したキメラマウスを掛け合わせてトラップクローン由来のラインを確立し、発生途中におけるレポーター遺伝子の発現を解析も行う。

このように解析を続けていくことで、今後数多くの初期発生に関わる遺伝子を単離できるものと期待される。

#### 発表論文リスト

1. Araki, M., Araki, K., Miyazaki, Y., Iwamoto, M., Izui, S., Yamamura, K. and Vassalli, P. E-selectin binding promotes neutrophil activation in vivo: A study of blood leukocytes in E-selectin transgenic mice. *Biochem. Biophys. Res. Com.* in press.
2. Biancone, L., Araki, M., Araki, K., Vassalli, P. and Stamenkovic, I. Reduction of tumor metastasis by expression of E-selectin in vivo. *J. Exp. Med.* 183: 581-587, 1996.
3. Iwamoto, M., Ibnou-Zekri, N., Araki, K. and Izui, S. Prevention of murine lupus by an I-E  $\alpha$  chain transgene: protective role of I-E  $\alpha$  chain-derived peptides with a high affinity to I-Ab molecules. *Eur. J. Immunol.* 26: 307-314, 1996.
4. Osanai, T., Feizi, T., Chai, W., Lawson, A. M., Gustavsson, M. L., Sudo, K., Araki, M., Araki, K. and Yuen, C.-T. Two Families of Murine Carbohydrate Ligands for E-Selectin. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 218: 610-615, 1996.
5. 荒木喜美, 山村研一: 遺伝子トラップ法による挿入変異マウスの作製と未知遺伝子の検索 蛋白質核酸酵素 (増刊) 40: 2017-2024, 1995.
6. Garcia, I., Miyazaki, Y., Araki, K., Araki, M., Lucas, R., Grau, G. E., Milon, G., Belkaid, Y., Montix, C., Lesslauer, W. and Vassalli, P. Transgenic mice expressing high levels of soluble TNF-R1 fusion protein are protected from lethal septic shock and cerebral malaria, and highly sensitive to *Listeria monocytogenes* and *Leishmania major* infections. *Eur. J. Immunol.* 25: 2401-2407, 1995.
7. Miyazaki, Y., Araki, K., Vesin, C., Garcia, I., Kapanci, Y., Whitsett, J. A., Pigué, P.-F., Vassalli, P. Expression of a tumor necrosis factor- $\alpha$  transgene in murine lung causes lymphocytic and fibrosing alveolitis. A mouse model of progressive pulmonary fibrosis. *J. Clin. Invest.* 96: 250-259, 1995.
8. Araki, K., Araki, M., Miyazaki, J. and Vassalli, P. Site specific recombination of transgene in fertilized eggs by transient expression of CRE recombinase. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 92: 160-164, 1995.