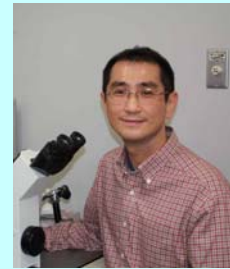


レンチウイルスベクターを用いた新しい遺伝子機能解析 システムの構築とその応用

In vivo gene function analysis using lentiviral vector

伊川 正人 (IKAWA MASAHIITO)

大阪大学・微生物病研究所・准教授



研究の概要

高次生命現象の解明には、個体レベルで遺伝子機能を解析する手法や、遺伝子組換え動物そのものが不可欠である。本研究は、レンチウイルスベクターを用いて個体レベルでの遺伝子機能解析システムを構築すると共に、遺伝子破壊マウスライブラリーを構築する。さらに遺伝子破壊マウスの約1割でみられる生殖不全の解析を通して哺乳類生殖メカニズムを解き明かす。

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：発生工学、リサーチバイオリソース、疾患モデル、動物実験技術

1. 研究開始当初の背景

ヒトやマウスの全ゲノム配列が明らかにされた21世紀はポストゲノム時代と言われるが、ゲノムに秘められた無数の遺伝情報を生理機能と結びつけるには、個体レベルで遺伝子機能を解析する手法や、遺伝子組換え動物そのものが不可欠となる。

代表者は遺伝子治療用に開発されたレンチウイルス (LV) ベクターに着目し、個体レベルでの遺伝子操作法の開発を進めていた。研究開始前に LV ベクターを受精卵に感染させることで効率的にトランスジェニックマウスが作製できる手法 (LV-TG 法) や、胚盤胞に感染させることで胎盤特異的に遺伝子導入できる手法を開発していた。

2. 研究の目的

LV ベクターの特長を生かしたジーントラップ遺伝子破壊法や遺伝子置換システム、胎盤特異的遺伝子操作法など、個体レベルでの遺伝子機能解析システムを開発する。遺伝子破壊したマウスは、バイオリソースとして公開し広く生命科学研究者に提供する。

ところで遺伝子を破壊したマウスの約1割で生殖不全が認められる。本研究で作製したマウスを中心に、生殖不全を示す遺伝子破壊マウスについて重点的に解析を進めることで、哺乳類の生殖メカニズムについて理解を深め、社会問題にもなっている不妊・不育の診断・治療法開発を目指す。

3. 研究の方法

【遺伝子破壊マウスライブラリーの構築】

内在性遺伝子内に挿入された場合には、そのポリ A シグナルを利用して CAG プロモーターにより EGFP を発現すると同時に内在性遺伝子を破壊するジーントラップ用の LV ベクターを開発する。

ジーントラップ用 LV ベクターを生殖系列に寄与できる Embryonic Stem (ES) や Germ line Stem (GS) 細胞、もしくは受精卵に感染させることで、遺伝子破壊したマウスを効率良く作製する。LV ベクターの挿入位置を LAM-PCR 法により同定し、遺伝子破壊マウスはバイオリソースとして公的機関に寄託し、広く公開・提供する。

【LV ベクターを用いた遺伝子機能解析法の開発】

薬剤耐性遺伝子をゲノム相同領域で挟んだ相同組み換えカセットを搭載した LV ベクターを構築する。ES 細胞に感染させて相同組み換えによる標的遺伝子組み換えが可能かどうかを検討するが、インテグレース欠損型 LV ベクターを用いてランダム挿入を抑制する工夫を施す。

LV ベクターを胚盤胞期胚に感染させれば胎盤特異的に遺伝子操作できる系を利用して、胎盤形成・機能に関与すると予想される因子群について順次、過剰発現させて妊娠に及ぼす影響を検討する。

【生殖不全マウスの解析】

交配試験により生殖不全が認められたマ

ウスについて、性行動、配偶子形成、射精・排卵、受精・着床、妊娠というステップに分けて表現型を解析する。

4. これまでの成果

【遺伝子破壊マウスライブラリーの構築】

ジーントラップ用LVベクターをES細胞に感染させて薬剤選択を行った。これまでにLVベクター挿入株を1000近く樹立し、内292株について、LAM-PCR法によりベクター挿入位置を同定した。また受精卵への感染ではGFP蛍光選別によりLVベクターが挿入されたマウスを200系統近く作製した。内82系統について挿入位置を同定するとともに、57系統を公的バイオリソースセンターに寄託・公開し、譲渡可能とした。

【LVベクターを用いた遺伝子機能解析法の開発】

ES細胞を用いて*Clgn* 遺伝子座の標的遺伝子組み換え率を検討した。薬剤選択後の相同組み換え率は、野生型LVベクターを用いた場合0% (0/512)に対し、インテグレース欠損型のLVベクターを用いた場合には約1% (9/941)であった。しかしエレクトロポレーションなどの従来法と同程度であり、改善の余地が認められた。

胎盤特異的な遺伝子操作技術を応用して、血管新生阻害因子である可溶性のVEGF受容体(sFLT1)を胎盤特異的に発現させることを試みた。その結果、妊娠マウスの血圧が上昇すると共にタンパク尿を発症し、妊娠高血圧症候群のモデルとなることを見出した。さらにこのモデルマウスを用いてsFLT1が胎盤の血管新生不全や子宮内胎児発育不全を引き起こすことを明らかにした。またプラバスタチン投与によりVEGF様のPGF (Placental Growth Factor)が誘導され、治療効果を示すことを明らかにした。

【生殖不全マウスの解析】

遺伝子破壊したマウスで見られる生殖不全について解析を進めた。3年の間に9系統について生殖に関する表現型を解析し、内6系統について雄性不妊を認めた。例えば精細胞に特異的に発現する小胞体シャペロンであるCalsperin (*Calr3*) を欠損すると、精子の形態や運動性は正常であるにも関わらず、精子が子宮から卵管に移行できないために雄性不妊となった。その後の解析から、CALR3は精子膜タンパク質であるADAM3の品質管理に関与するシャペロンであることを明らかにした。これらを含めて18系統の遺伝子破壊マウスの表現型について論文発表した。

5. 今後の計画

遺伝子破壊マウスライブラリーの構築については、特段の予定を変更することなく進めることで目的を達成できると考えている。効率的な遺伝子置換システムの開発につい

ては、インテグレース欠損型LVベクターを用いても、エレクトロポレーションなどの他方法による遺伝子導入と大差ないものであったことから、Zinc Finger Nuclease (ZFN)を用いた標的部位2重鎖DNA切断による効率化などを予定している。

自ら開発して特許化した胎盤特異的な遺伝子操作法や妊娠高血圧症候群モデルマウスについては、その応用研究を進めることで診断・治療法の開発などを通して社会還元を目指す。

生殖不全マウスの解析については、これまで作製の容易なストレートノックアウトマウスを中心に解析を進めてきた。今後は作製に時間のかかるコンディショナルノックアウトマウスにも重点を置いて解析を始める。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- ① Kumasawa K*, Ikawa M *#, Kidoya H, Hasuwa H, Saito-Fujita T, Morioka Y, Takakura N, Kimura T, Okabe M. From the Cover: Pravastatin induces placental growth factor (PGF) and ameliorates preeclampsia in a mouse model. **Proc Natl Acad Sci USA** 108: 1451-1455 (2011)
- ② Ikawa M *#, Tokuhiko K*, Yamaguchi R, Benham AM, Tamura T, Wada I, Satouh Y, Inoue N, Okabe M. Calsperin Is a Testis-specific Chaperone Required for Sperm Fertility. **J Biol Chem** 286: 5639-5646 (2011)
- ③ Ikawa M, Inoue N, Benham AM, Okabe M#. Fertilization: a sperm's journey to and interaction with the oocyte. **J Clin Invest** 120: 984-994 (2010)
- ④ Morioka Y, Isotani A, Oshima RG, Okabe M, Ikawa M #. Placenta-specific gene activation and inactivation using integrase-defective lentiviral vectors with the Cre/LoxP system. **Genesis** 47: 793-798 (2009)
- ⑤ Okada Y, Ueshin Y, Hasuwa H, Takumi K, Okabe M, Ikawa M #. Targeted gene modification in mouse ES cells using integrase-defective lentiviral vectors. **Genesis** 47: 217-223 (2009)

* equal contribution

corresponding author

ホームページ等

<http://kumikae01.gen-info.osaka-u.ac.jp/members/ikawa/index.htm>