

博士学位申請論文内容の要旨

博士学位申請論文名

The kick-in system: A novel rapid knock-in strategy

(日本語訳) キックインシステム：迅速なノックインマウス作成法

博士学位申請論文キーワード

Animal model	Knock-in
BFNS	K _v 7.2
<i>Cre/lox</i>	

博士学位申請者氏名 友納優子

(平成 年 月 日提出)

【目的】ノックインマウスは、正常遺伝子を外来の変異遺伝子に組換えた動物であり、変異遺伝子による疾患の病態把握など、医学に大きな貢献をしている。方法としては、標的遺伝子と組換えベクターの相同組換えにより DNA 置換を行っているが、相同組換えの効率が低いため、長時間と多額の費用が必要となっているのが現状である。この問題に取り組むべく、新しいノックインシステムを開発した。

【方法と結果】遺伝子変異を導入する予定のエクソンを変異 *lox* 配列ではさんだターゲティングベクターを作成し、マウス ES 細胞に、相同組換えにより導入する。(アクセプターES 細胞の樹立) さらに、標的エクソン内に変異遺伝子と変異 *lox* 配列を導入した変異導入ベクターを作成し、アクセプターES 細胞に Cre リコンビナーゼ介在作用により組換えるというものである。

一旦、標的エクソンを変異 *lox* 配列ではさんだ部分をもつアクセプターES 細胞を樹立すると、そのエクソン内へ変異遺伝子を導入する段階は、Cre リコンビナーゼ作用により高い確率で行われる。今回は、良性新生児てんかんを発症する KCNQ2 遺伝子のエクソン 6 にある、二つの遺伝子変異 Y284C、A306T をもつノックインマウスをそれぞれ作成した。

① ベクターの構築

1) ターゲティングベクター

マウス *Kcnq2* のイントロン 1 からイントロン 7 に相当する 7.5 kb の遺伝子断片は、C57BL/6J マウスゲノム DNA-BAC クローン RPCI23-401L17 から PCR 増幅し、ジフテリア毒素 (DT-A) 遺伝子とともに pBluescript II ベクターにサブクローニングした。次いで、エクソン 6 の上流に *lox71* 断片を、下流にネオマイシン耐性 (PGK-neo) カセットと *lox2272* を挿入した。PGK-neo カセットの両端には、マウス樹立後に Flp リコンビナーゼ発現マウスとの交配によるカセットの抜去を可能にするための FRT 配列を配置した。これを ES 細胞への導入に用いた。

2) 変異導入ベクター

エクソン 6 の 5' 末端に *loxKMR3* 配列を、3' 末端に FRT 配列を付加した。良性家族性新生児てんかんで同定された *Kcnq2* 変異 Tyr284Cys および Ala306Thr にそれぞれ対応した塩基置換 A489C および G915A を、ligation-independent cloning 法の変法により、この DNA 断片に導入した。ピューロマイシン耐性 (PGK-puro) カセットと、*lox2272* を付加した DNA 断片を、変異遺伝子断片とともに pBluescript II に挿入し、2 種の変異ベクター pMtKCNQ2-YC および pMtKCNQ2-AT を作成した。

② アクセプターES 細胞の樹立

マウス ES 細胞を培養し、これに上記ターゲティングベクターを加え、エレクトロポレーション法による相同組換えにより、遺伝子導入を行った。その後、9 日間培養し、生じた neo 耐性細胞コロニーのうち 144 個を顕微鏡下で単離した。PCR およびサザンブロット解析を行なった結果、9 個で期待される相同組換えが検出され、これらをアクセプターES 細胞として *Kcnq2* への変異導入に用いた。(0.6%の組換え率)

③ 変異導入

アクセプターES 細胞を培養し、変異導入ベクターと Cre リコンビナーゼ発現ベクターを加え、エレクトロポレーション法による Cre リコンビナーゼ介在作用により、遺伝子導入を行った。その後、細胞はピューロマイシンを含む培地で 7 日間培養し、生じた puro 耐性細胞コロニーのうち、1 変異あたり 12 個を顕微鏡下で単離した。これらをさらに 3 日間培養したものの一部から DNA を抽出し、PCR および塩基配列解析により、すべてのクローンにおいて期待どおりの変異導入が確認された。(100%の組換え率)

④ 変異マウスの樹立

2細胞期のICRマウス胚の透明帯を除去し、変異ES細胞の懸濁液に浸漬した。細胞凝集を促進させるため一晩インキュベートし、得られたキメラ胚を偽妊娠雌マウスの子宮に移植した。出生したキメラマウスは一旦C57BL/6Jマウスと交配させてF1マウスを得、さらにF1をFlpリコンビナーゼ発現マウスと交配させて薬剤耐性遺伝子の除去を行なった。得られたTyr284CysおよびAla306Thrの2系統のマウスは、C57BL/6Jマウスとの戻し交配を10回以上重ねることによりコンジェニック系統を樹立した。

⑤ 疾患モデル動物としての正当性の確認

病理、行動、薬物誘発実験、c-Fos蛋白の発現、電気生理にて、ホモやヘテロにおいて、中枢神経の易興奮性が示され、従来のノックイン動物と比較し遜色がないことが示された。

脳の形態に奇形はなく、正常のKCNQ2たんぱく質の発現を示した。運動能力や知覚などの異常はみられなかった。自然発生のけいれんはホモのadultのマウスでみられ、全身けいれんや、ミオクロニー発作がみられた。ホモの仔マウスでは、興奮性をみるC-fosたんぱく質の発現で、海馬において興奮性がみられた。ペンチレンテトラゾールによる薬物誘発けいれんは、ヘテロマウスに易興奮性がみられた。電気生理ではホモマウスにMカレントの減少がみられた。

【結論】

一旦、変異lox配列ではさんだエクソンを導入したアクセプターES細胞を樹立できれば、その後、変異導入ベクターへの組換えはCreリコンビナーゼにより高い確率で組換えられる。変異導入ベクターの変異の部位はエクソン内に限られるが、複数作ることができ、短時間で数種類のノックインマウスが作成できることが利点である。

各種実験の結果は従来のノックインマウスでみられた所見と同様であり、キックインシステムで作ったマウスは、疾患モデルマウスに値すると考える。次世代シーケンサーが広まっている今日、新たな変異が発見される可能性が高く、同じエクソン内であれば新規変異に変更して作成することができ、病態把握や治療法の開発に役立つものと思われる。

審査の結果の要旨

本論文は、ノックインマウス作成システムの手法を、アクセプターES細胞を作成し、クレロックシステムを利用することにより効率化したキックインシステムを開発し、それにより作出したマウスの表現型を解析した論文である。

1. 斬新さ

今までのノックインシステムで、同一エクソン内の複数の種類の遺伝子変異マウスを、それぞれ作成する場合は、おのおの変異ベクターを作り、ES細胞を相同組み換えで導入し、同一過程を繰り返す必要があった。相同組み換えは効率が悪いので、労力と経費の負担が大きいものとなっている。

そこで、組換え効率のよいクレロックシステムを利用したノックインシステムの変法を作成した。この方法は、変異導入予定のエクソンをロック配列で挟んだES細胞を作り、その部位に、数種類の変異をそれぞれ導入することにより、従来のノックインより簡便にモデルマウスを作成できる、という点で斬新である。

2. 重要性

キックインシステムでは、複数の変異モデルマウス作成が簡便となるため、モデル動物解析により、遺伝子変異による疾患の病態把握、治療開発に重要な役割を果たすと思われる。

3. 研究方法の正確性

マウス作成にあたっては、電気泳動、サザンブロット、DNA直接シーケンスを用い、変異の有無の確認をしている。また、作成されたマウスに関しては、形態学、行動、脳波、薬理実験、電気生理の手法を用い、マウスの特徴や、中枢神経の易刺激性を確認しており、研究方法の正確性は高い。

4. 表現の明確さ及び結論

結論は明確で、キックインシステムは、アクセプターES細胞を作ることにより、クレロックシステムを利用して、迅速にノックインマウスを複数作成することができる方法である。キックインによる変異マウスは、従来のノックインマウスと比較しても、遜色ない表現型をしめし、遺伝子変異動物による解析に使用できるとした。

主な質疑応答

<黒木求副査>

Q.ES 細胞の培地に leukemia inhibitory factor を使用しているのは、なぜか？

A. ES 細胞の未分化状態を維持するために、上記を培地に加えた。

Q.実験に使ったマウスはコンジェニックになっているか、どれくらいかかったか。

A.10 世代以上であり、コンジェニックになっていると思われる。3 年ぐらいかかった。

Q.今後このマウスにはどのような使用方法があるのか。

A.KCNQ2 にてんかん性脳症を起こす新規変異がみつかっており、それを導入する予定である。

Q.さらに上流にロックスを置くことはできないか。

A.ベクターが大きくなると、組換えが難しくなると思われる。

<白澤専二副査>

Q.変異はたくさん報告されているにもかかわらず、エクソン 6 にした理由はなにか。

A.エクソン 6 はポアの付近をコードするエクソンであり、ポアはカリウムが通過するところであるため、マウスにその変異があれば、なんらかの症状が出るであろうと予想してエクソン 6 の変異マウスとした。

Q.人のヘテロは症状があるが、マウスでは症状がない、というのは、人とマウスで違うということなのか。

A.症状はその通りであり、人とマウスで何らかの違いがあるものと思われる。

Q.カリウムチャネルは、神経組織のどこの部分に発現している蛋白なのか。

A.錐体細胞全体に発現しており、主に軸索に発現している。

Q.クレリコンビナーゼはどのようにして機能させるのか。

A.クレリコンビナーゼ発現ベクターを導入させて、機能させている。最終的にクレリコンビナーゼ遺伝子が残っていないことは確認をしている。

<宮本新吾副査>

Q.共著者が多いが、どの部分を担当したのか。

A.マウスの行動、脳波測定の部分を担当した。

Q.キックインシステムのスピードの差や、コストの差は具体的にはどうなのか。

A.二種類のノックインを作る場合は、相同組み換えを2回せず、1回省略できることで、その部分の時間とコストが削減できる。

Q.変異の大きさが変わると、組換え効率は変わるのか。

A.変異を導入すべき部分が大きいと、効率は低くなる。

Q.キックインの言われはなにか。

A.早く変異が作成できる、という意味を、蹴り込むという表現でキックインとした。

Q.今後はこのベースを使って他の遺伝子についても行うのか。

A.現在のところは、てんかん性脳症でみつかった新規変異を導入する予定である。

【疾患に関する質問】

宮本副査：遺伝子変異は、両親にもやはりあるのか。

A.両親どちらかにあり、罹患者である。新生児期に発症してもその後は発作がとまり、ほぼ正常発達をとげる。

白澤副査：KCNQ2の浸透率は高いのか。変異があると必ず発症するのか。発症が予測しやすいのか。

A.家族性にみられるので、生まれてくる子どもにも発症する可能性はかなり高い。浸透率は80%ぐらいある。

黒木副査：ホモの変異は人でもみられるのか。

A.人ではみられず、おそらく生存できないと思われる。

宮本副査：治療法はないのか。

A.現在は対症療法のみで、抗てんかん薬の内服や静注で発作をとめるだけである。いずれ発作がとまる。

以上の様に、学位申請者は質疑に適切に対応し、本論文は、効率が良い遺伝子変異マウスの作成方法の開発を示して、その表現型でも従来法と変化がないことを明確にしめしており、学位論文に値すると評価された。