

# 表皮細胞の増殖・分化・細胞死に影響を与える遺伝子群の機能解析システムの構築

大阪大学医学系研究科社会環境医学

竹田 潤二

Somatic cells from patients with Bloom (Blm) syndrome show an increased rate of homologous recombination and therefore, results in generation of bi-allelic mutation from mono-allelic mutation. We have used a tetracycline-regulated Blm allele ( $Blm^{tet}$ ) to introduce bi-allelic mutations in ES cells (5). Phenotype-based genetics is now achievable and raises new possibilities for identifying novel gene functions.

Although we would like to apply this system in mice or their somatic cells, addition of doxycycline (dox), an analogue of tetracycline, to  $Blm^{tet}$  mice did not result in sufficient reduction of Blm expression because of leaky Blm expression in vivo. This leaky expression has been markedly reduced in vitro by using a tetracycline-controlled trans-silencer. A new tetracycline cassette containing the trans-silencer gene was constructed and inserted into the Blm gene to generate a new Blm allele ( $Blm^{tet-new}$ ) in ES cells. We tested the dox-dependent regulation of Blm expression and possible introduction of bi-allelic mutations in mice or their somatic cells derived from the ES cell line bearing  $Blm^{tet-new}$  and found that sister chromatid exchange (SCE), a hallmark of Bloom gene deficiency, was markedly increased in lymphocytes derived from mice bearing  $Blm^{tet-new}$  alleles, suggesting that efficient bi-allelic mutations have been introduced in mice.

We reported that Sleeping Beauty transposon (SB) jumps efficiently in mouse genome (1) and SB-mediated mutagenesis is possible (3). Moreover, we have been recently reported potential of SB for comprehensive mutagenesis (6). Since the SB transposon system has a unique feature that can introduce various mutations in somatic tissues, this allows us to search for many novel gene functions in a single mouse.

Combination of the two systems described above opens a new research field for “**somatic cell genetic biology**”. In this system, SB-mediated transpositions cause many mono-allelic gene disruptions in somatic cells followed by the introduction of bi-allelic mutations from them.

## 1. 緒言

表皮は直接外界に接している組織であり、外界からの刺激から生体を防御している<sup>2)</sup>。表皮細胞一つ一つを解析できれば皮膚疾患の病態解明に多大な効果を及ぼすことが期待される。

そのために我々は、二つの手法を組合わせて個体の表皮細胞などの体細胞での遺伝子機能を効率良く解析するための手法を開発しようとしている。

一つ目はランダムに変異を効率良く導入する手法であり、二つ目は、導入された変異をもう片方のアレルにも導入し(両アレル変異導入)、遺伝子機能解析に供するというものである。

ランダム変異導入は、我々が世界に先駆けてマウス個体で効率良く動き回ることを報告したSBトランスポゾンシステムを用いる<sup>1)</sup>。トランスポゾンシステムは生殖細胞だけでなく、体細胞でも効率良く動き回ることが知られている。

一方、両アレル変異に関しては、ブルーム遺伝子を利用する。

ブルーム遺伝子が欠損したブルーム症候群と呼ばれる患者では高頻度に癌が発症する。患者由来の細胞を観察すると、高頻度に相同組み換えが起こり片アレル変異から両アレル変異に移行しやすく、このことが癌発症に密接に関連していると考えられる。

遺伝子の機能を個体で解析するときには、遺伝子が欠損しているアレルをホモにする必要がある。通常それは、ヘテロマウス同士を交配することにより達成される。我々は、ブルーム遺伝子を欠損させることにより交配をしなくても遺伝子の機能を解析できる手法を開発しようとしている。ES細胞を利用してその原理が正しいことを証明できた<sup>5)</sup>。上記で述べた二つの手法を組み合わせ、マウス個体の体細胞で遺伝子の機能を効率良く解析しようとするものである。

## 2. 実験

### 2-1 マウストランスポゾンが表皮細胞でも効率良く動き回るかどうかの検討

我々はこれまでに生殖細胞系列でSBトランスポゾンが効率良く動き回り、内在性遺伝子を破壊できることを報告してきた。そこで体細胞である表皮細胞でも効率良く遺伝子移動を可能にするためにKeratin-5トランスポーゼーストランスジェニックマウスを作製した。このマウスとトランスポゾン保有マウスを交配したダブルトランスジェニックマウスを作製し、表皮細胞でその移動効率を測定した。



Generation of a novel system for functional analysis of genes involved in growth, differentiation, and cell death in epidermal cells

Junji Takeda

Department of Social and Environmental Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine

2005年、アメリカの二つのグループがSBトランスポゾンで体細胞で移動させ癌遺伝子の同定に成功したことがNature誌に報告された。その際、体細胞（表皮だけでなく体細胞全体）での移動効率を高めるために、トランスポナーゼ遺伝子をRosa-26遺伝子座にノックインしたマウスが作製されていた。我々も同様のマウスを独自に作製したのでそのマウスを用いて表皮細胞で移動効率が高まっているかテストした。

## 2-2 ブルーム遺伝子欠損による表皮細胞における両アレル変異導入効率の検討

我々は、これまでES細胞においてブルーム遺伝子を条件付き（テトラサイクリン類似体を添加した時だけで遺伝子がオフになるいわゆるtetシステム）で破壊することにより両アレル変異導入が可能であることを示してきた。そこでそのES細胞からマウスを樹立し、体細胞を取り出しES細胞と同様両アレル変異導入が可能か検討した。

## 3. 結果および考察

### 3-1 マウストランスポゾンの表皮細胞での移動効率

実際の移動効率は、遺伝子の挿入で検討しなければならないが、マウストランスポゾンはランダムに移動するので挿入効率を測定するのは困難である。そこで挿入する前のトランスポゾン切断効率で移動効率を類推した。他の実験でトランスポゾンが切断されたもののうち、半分は実際に遺伝子挿入が起きていることが証明されている。Keratin-5トランスポナーゼトランスジェニックマウスとトランスポゾン保有マウスを交配したダブルトランスジェニックの表皮細胞での移動は10～100個の細胞に一個ぐらゐの頻度で起こっていることが想像された。この頻度は、表皮での遺伝子機能解析が可能であることが考えられる。

### 3-2 表皮細胞における両アレル変異導入効率

表皮細胞を培養することが簡単ではないためモデル系として初期線維芽細胞での両アレル変異導入効率を検討した。ブルーム遺伝子欠損は、両アレル変異導入だけではなくて姉妹染色体間の組み換え頻度も同時に上昇するので我々は実際には初期線維芽細胞での姉妹染色体間の組み換え頻度で両アレル変異導入効率を検討した。しかし、ES細胞でみられた組み換え頻度の上昇は見られなかった。その原因がブルーム遺伝子のLeakyな発現によるものだと考えられたので、それを押さえるためにtetシステムのサプレッサーを新たにシステムに加えてテストしたところ姉妹染色体間の組み換え頻度の上昇がみられた。

そこで、サプレッサーを組み込んだコンストラクトを新たに作製し、ES細胞にノックインし、それ由来のマウス

を作製し、その後ホモマウスを作製した。そのホモマウスからリンパ球を取り出し、組み換え頻度が上昇しているかどうかを姉妹染色体間の組み換えで測定したところ、顕著に頻度が上昇していることが観察された<sup>7)</sup>。

## 4. 結語および今後の展開

二つのシステムを融合して表皮細胞で遺伝子の機能を解析するものであるが、それぞれのシステムは完成に近づきつつあると考えられる<sup>4) 8)</sup>。それらが融合できた時にこれまでにない新しいシステムが誕生し、今後新規遺伝子群が多数同定されることが期待される。

### (参考文献)

- 1) Horie, K., A. Kuroiwa, M. Ikawa, **ほか4名**: Efficient chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like transposon Sleeping Beauty in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9191-9196, 2001
- 2) Takagi, S., H. Tojo, S. Tomita, **ほか9名**: Alteration of the 4-sphingenine scaffolds of ceramides in keratinocyte-specific Arnt deficient mice affects skin barrier function. *J. Clin. Invest.* 112 (9) : 1372-1382, 2003
- 3) Horie, K., K.Yusa, K.Yae, **ほか10名**: Characterization of Sleeping Beauty transposition and its application to genetic screening in mice. *Mol.Cell.Biol.*23(24): 9189-9207, 2003
- 4) Yusa, K., **J. Takeda**, and K. Horie; Enhancement of Sleeping Beauty Transposition by CpG Methylation: Possible Role of Heterochromatin Formation, *Mol. Cell. Biol.*, 24; 4004-4018, 2004
- 5) Yusa, K., K. Horie, G. Kondoh, **ほか4名**: Genome-wide phenotype analysis in ES cells by regulated disruption of the Bloom's syndrome gene. *Nature* 429, 896-899, 2004
- 6) Keng, V.W., K. Yae, T. Hayakawa, **ほか10名**: Region-specific saturated germ-line mutagenesis in mice using the Sleeping Beauty transposon system. *Nat. Methods.* 2; 763-769, 2005
- 7) Hayakawa T, Yusa K, Kouno M, **ほか2名**: Bloom's syndrome gene-deficient phenotype in mouse primary cells induced by a modified tetracycline-controlled trans-silencer. *Gene.*, 369; 80-89, 2006
- 8) Ikeda R., C Kokubu, K Yusa, **ほか3名**: Sleeping Beauty transposase has an affinity for heterochromatin conformation, *Mol. Cell. Biol.*, 27 : 1665-1676, 2007