

熊本大学学術リポジトリ

Kumamoto University Repository System

Title	可変型遺伝子トラップベクター-pU-17を用いたトラップラインの樹立と解析
Author(s)	谷脇, 琢也
Citation	
Issue date	2008-03-11
Type	Thesis or Dissertation
URL	http://hdl.handle.net/2298/11144
Right	

学位論文

Doctor's Thesis

可変型遺伝子トラップベクターpU-17を用いたトラップラインの樹立と解析
(Characterization of an exchangeable gene trap using pU-17 carrying a stop
codon- β geo cassette)

谷脇 琢也

Takuya Taniwaki

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻運動骨格病態学

指導教員

高木 克公 前教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻運動骨格病態学

山村 研一 教授

熊本大学大学院薬学教育部博士課程生命薬科学専攻臓器形成学

紹介教授

水田 博志 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻運動骨格病態学

2007年度

学 位 論 文

Doctor's Thesis

可変型遺伝子トラップベクターpU-17を用いたトラップラインの樹立と解析
(Characterization of an exchangeable gene trap using pU-17 carrying a stop
codon- β geo cassette)

谷脇 琢也

Takuya Taniwaki

指導教員

高木 克公 前教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻運動骨格病態学

山村 研一 教授

熊本大学大学院薬学教育部生命薬科学専攻臓器形成学

審査委員名	:	形態形成学担当教授	<u>嶋村 健児 教授</u>
		初期発生学担当教授	<u>永瀨 昭良 教授</u>
		器官制御学担当教授	<u>中尾 光善 教授</u>
		機能病理学担当教授	<u>伊藤 隆明 教授</u>

2007年度

目次

- 1) 要旨
- 2) 発表論文リスト
- 3) 謝辞
- 4) 略語一覧
- 5) 序論
- 6) 材料と実験方法
 - 6-1) **Plasmids**
 - 6-2) 培養とエレクトロポレーション
 - 6-3) **genomic DNA**の解析
 - 6-4) **RNA**解析
 - 6-5) キメラマウスの樹立
 - 6-6) 組織学的解析
 - 6-7) 免疫組織化学
- 7) 結果

- 7-1) pU-17の構造
- 7-2) IRESの有無によるコロニー形成効率の比較
- 7-3) エレクトロポレーションの条件検討
- 7-4) pU-17の挿入部位の検討
- 7-5) EGFP geneの組換え実験
- 7-6) 置換クローンの子メラマウス作製とCAGGS-Flp miceとの交配
- 7-7) EGFP遺伝子の発現パターン
- 8) 考察
- 9) 結語
- 10) 参考文献

1) 要旨

これまで遺伝子解析のツールとして遺伝子トラップ法が開発され、使用されるベクター：トラップベクターもその目的に応じ多種開発されてきた。今回新しい可変型遺伝子トラップベクターとして現在まで使用してきたトラップベクターを改良し、pU-17 : intron-*lox71*-splicing acceptor(SA)-*βgeo-loxP*-pA-*lox2272*-pSP73-*lox51*を作製した。ベクター内のSAには、*galactosidase/neomycin-resistance fusion gene (βgeo)*の開始コドンと同一フレームで終止コドンが存在し、プロモータートラップとして機能することが期待された。実際にトラップされた遺伝子を調べてみると、開始コドンを含むexonと隣接するintronに、トラップベクターが高率で挿入されていることが証明された。さらにCre-mutant *lox* systemを用い、*βgeo* 遺伝子を *enhanced green fluorescent protein (EGFP)* 遺伝子へ置換することに成功し、置換クローンからキメラマウス作製によりマウスラインを樹立、その後Flpトランスジェニックマウスと交配させることによりマーカー遺伝子を除去、置換されたEGFP遺伝子がβgeo遺伝子と同じ発現パターンを示していることを確認した。pU-17トラップベクターを用いることにより、ランダムな挿入変異を起こし遺伝子をトラップしたクローンを樹立する。その後トラップされた遺伝子の単離解析を施行、単離できた遺伝子に関してはプロモータートラップとなっていることからホモマウス

を作製することにより遺伝子を nullにできることが期待できる。その後 Cre/loxシステムを用い β geoを他の遺伝子に置換し、トラップされたプロモーターの支配下に他の遺伝子を発現させることが可能であり、pU-17は遺伝子の単離解析に有用なtoolとなると考える。

Abstract

We have developed a new exchangeable gene trap vector, pU-17, carrying the intron-lox71-splicing acceptor (SA)- β geo-loxP-pA-lox2272-pSP73-lox511. The SA contains three stop codons in-frame with the ATG of β galactosidase/neomycin-resistance fusion gene (β geo) that can function in promoter trapping. We found that the trap vector was highly selective for integrations in the introns adjacent to the exon containing the start codon. Furthermore, by using the Cre-mutant lox system, we successfully replaced the β geo gene with the enhanced green fluorescent protein (EGFP) gene, established mouse lines with the replaced clones, removed the selection marker gene by mating with Flp-deleter mice, and confirmed that the replaced EGFP gene was expressed in the same pattern as the β geo gene. Thus, using this pU-17 trap vector, we can initially carry out random mutagenesis, and then replace the β geo gene with any gene of interest to be expressed under the control of the trapped promoter through Cre-mediated recombination.

2) 発表論文リスト

**T.Taniwaki, K.Haruna, H.Nakamura, T.Sekimoto, Y.Oike, T.Imaizumi,
F.Saito, M.Muta, Y.Soejima, A.Utoh, N.Nakagata, M.Araki, K.Yamamura
and K.Araki**

**Characterization of an exchangeable gene trap using pU-17 carrying a stop
codon- β geo cassette**

Develop. Growth Differ. 47, 163–172, 2005

3) 謝辞

熊本大学発生医学研究センター・器官形成部門・臓器形成分野において
熊本大学大学院医学研究科・臓器形成分野・山村研一教授と同整形外科学講座・高木克公前教授の御指導の下、本研究を行いました。多くの御指導を頂き、深く感謝いたします。

また、熊本大学発生医学研究センター・器官形成部門・臓器形成分野・荒木喜美助教授と熊本大学遺伝子実験施設・荒木正健助教授には、日々の実験研究から論文作成まで幅広い御助言を頂きました。また、熊本大学発生医学研究センター・器官形成部門・臓器形成分野、熊本大学医学部整形外科学講座の皆様には有形無形の多くの御協力、ご支援を受けました。

心より感謝いたします

4) 略語一覽

ES cell : Embryonic stem cell

SA : splice acceptor

IRES : internal ribosomal entry site

pA : polyadenylation

PCR : polymerase chain reaction

DNA : Deoxyribonucleic acid

RNA : Ribonucleic acid

cDNA : Complementary DNA

RT-PCR : Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction

5'-RACE : rapid amplification of cDNA 5'-ends

EGFP : enhanced green fluorescent protein

Pgk : phosphoglycerate kinase-1

5) 序論

今日、ヒトとマウスの全てのゲノム配列がほぼ明らかとなった(Waterston *et al.* 2002)。生体内における遺伝子の機能は、配列情報のみでは理解することはできず、機能的遺伝学において変異解析が有力で、効果的なアプローチとなる。ES細胞を用いた遺伝子トラップ法は、ランダムな挿入変異を起こし、トラップされた遺伝子を単離、容易に同定可能な手法として確立された方法である。1989年、Gosslerらがショウジョウバエに用いられていたエンハンサートラップ法を応用し、初めてマウスES細胞を用いたエンハンサートラップ (p3LSN) とプロモータートラップ

(pGT4.5H3) を行った。p3LSNは、mouse heat-shock protein 68 (hsp68) のプロモーター、lacZ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子を、pGT4.5H3はマウスEn-2遺伝子のsplice acceptor (SA)、lacZ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子を持っており、トラップベクターが内在性の遺伝子内に組み込まれた時のみ、内在性遺伝子とレポーター遺伝子との間で融合タンパクが生成され、トラップされた遺伝子の発現をモニターすることが可能となる。ES細胞へのエレクトロポレーション後のG418耐性コロニー内にlacZを発現するコロニーを確認、さらにトラップクローンからキメラマウスの作製にも成功、機能解析まで行った。1991年にはSorianoらがさらに

改良を行い、splice acceptor (SA)、lacZ遺伝子、ネオマイシン耐性遺伝子、lacZ遺伝子とネオマイシン耐性遺伝子の融合遺伝子 (β geo) を用い、いろいろな構造のプラスミドベクター及びレトロウイルスベクターを比較検討している。どちらのベクターもプロモーターを欠くため、ES細胞で発現している遺伝子のみをトラップするプロモータートラップとして機能することが考えられる。それぞれES細胞に導入、G418で選別後、コロニーでのlacZ遺伝子の発現を検討し、SA- β geo-pAの構造を持つベクター (pSA β geo、ROSA β geo) に関しては、効率よくトラップできたことを確認している。キメラマウスの作製にも成功しており、胚性致死等の表現型解析も行っている。1995年にはTakeuchiらがSA-neo-IRES-lacZ-pAといった構造を持つベクターを用い解析を行っている。encephalomyocarditis virus (ECMV)由来のIRES (internal ribosomal entry site) は cap-independent translationを起こすため遺伝子内のどこに挿入されてもlacZが発現するが、レポーター遺伝子と内在性遺伝子とが融合タンパクにはならない。このベクターを用い、新規遺伝子を発見、解析を行っている。

現在まで、IRESや、 β geoを持つトラップベクターが広く使用されており、ES細胞で発現するいろいろな遺伝子をトラップすることが証明されてきている。(Chowdhury et al. 1997; Bonaldo et al. 1998; Stoykova et al. 1998) また、トラップされたcDNAや組み込まれた周囲のゲノムの配列は、rapid

amplification of cDNA 5'-ends (5'-RACE) (Townley et al. 1997) や、プラスミドレスキュー法(Araki et al. 1999) により容易にクローン化することが可能である。

通常の遺伝子トラップ法では、トラップベクターの挿入により、挿入部位より下流の遺伝子配列の欠損した変異のみしか起こせない。そこで、我々の研究室では、point mutationのような変異をトラップされたallele に導入するため、Cre-LE/RE mutant *lox* system (Araki et al. 1997) を用いES細胞でのsite-directed integration system を開発し、可変型遺伝子トラップベクターpU-Hachi : SA-*lox71*-IRES-*βgeo*-polyadenylation signal

(pA)-*loxP*-pA-pUC (Araki et al. 1999) を構築、報告した。Cre-LE/RE mutant *lox* system とはBacteriophage P1由来のシステムであるCre-*loxP*システム

(*loxP*配列が組換え酵素であるCreにて、部位特異的組換えを起こす) を応用したもので、通常Cre-*loxP*システムによる組換えは可逆性のため一度挿入したものが抜けてしまうことになるが、反復配列部に変異をいれた変異*lox* (*lox71*、*lox66*) を使用することにより、挿入した配列を完全ではないものの抜けにくくなった。pU-Hachiトラップクローン内の*βgeo*遺伝子はCreによる組換えにより、他のcDNAと置換することが可能である。まず遺伝子トラップ法により最初にランダムな挿入変異を起こし、次に組換えを行い*βgeo*と同じパターンで発現するcDNAを組み込むことが可能

となる。

しかしながらpU-Hachiを用いた置換実験ではその構造的理由からいくつかの制限がでてきた。まず、SAとlox71配列にそれぞれ4つ、1つの終止コドンがあり、それによりlox71 siteへexon、intron 構造を持つゲノム遺伝子が挿入された場合、SAに存在する終止コドンが早期翻訳終止コドンとなり、nonsense codon-mediated mRNA decay (NMD) (Wagner & Lykke-Andersen 2002) を誘導すること。二つ目にIRESが β geoのcap-independent translationに使用されているため、置換により挿入されるcDNAの翻訳のためにIRESの使用が必要となること。三つ目は、IRESを含むトラップベクターは、しばしば遺伝子の3'領域に組み込まれ、トラップされた遺伝子を完全に破壊できず、マウスの表現型に軽度の影響しか与えないことがあること。四つ目として、トラップされた遺伝子の3'側は再利用できないこと、これはpA配列がlox間の領域の外側に存在するため、除去することができないためである。例えば、我々はプロモーター配列を挿入することによって3'-rapid amplification of cDNA ends を試みたが、トラップされた遺伝子の3'側と融合する転写産物は産生されなかった。五つ目としてcre遺伝子を挿入、発現させることが困難なこと、これは、LE/RE mutant lox system (Albert et al. 1995) では、トラップベクターと置換ベクター間で、lox間での組換え後、同部位で再度lox間での組換えが起こる可能性があり、

*cre*遺伝子の挿入に失敗することがしばしば発生するためである。

最近になり、我々はheterospecific *lox*、*lox2272*とLE/RE mutant *lox* の併用により、組換えに関する問題を解決した。これは、Cre-LE/RE mutant *lox* systemでは再組換えの可能性があったものを、*lox*配列のスペーサー部位に変異を起こしたheterospecific *lox*を用いることにより、再組換えが起こらないようにすることが可能となり、そのため組換え効率が改善、Creによる組換えにより*cre*遺伝子を組み込むことを可能にしたことを報告した (Araki et al. 2002)。これらの知見に基づき、我々はcDNA、ゲノムDNA、*cre*遺伝子の挿入、発現に適した新しい遺伝子トラップベクターを構築した。新しいトラップベクターpU-17はプロモータートラップとして設計しており、置換のために3種類の変異*lox* siteを持っている。今回、pU-17が、開始コドンの周囲に効率よく組み込まれること、ベクター内の β geo遺伝子は容易にenhanced green fluorescent protein (EGFP)遺伝子と置換することができること、そして生体内で置換後も同じ発現パターンを維持できることを報告する。

6) 材料と実験方法

6-1) Plasmids

トラップベクターpU-Hachiを改良し、pU-17とpU-18を作製した。

1 : マウス*En-2*遺伝子のイントロン内、5'側に*lox71*を挿入した。

2 : *βgeo*遺伝子のpolyadenylation (pA) signalを除去した。

3 : mouse *phosphoglycerate kinase-1 (Pgk)*遺伝子のpA signalの上流に
*lox2272*を挿入した。

4 : pU-HachiのpUCベクターに代わり、pSP73 (Promega, Madison, WI, USA)
ベクターを使用した。

5 : IRESを除いた。

エレクトロポレーション前にそれぞれのベクターをSpe I siteで直線化した。

Cre発現ベクター : 以前報告にあるpCAGGS-Creを用いた。(Araki et al. 1995; Araki et al. 1997)

プラスミド : pCAGGS-FlpはpCAGGSの*EcoRI* siteに*Flp*遺伝子(Stratagene, La Jolla, CA, USA)をつないで作製した。過去に報告されていた*Flp*遺伝子の変異(Ringrose et al. 1998)は修正した。

置換ベクター : p6SEFPPFはpSP73 (Promega)のコンポーネント、*lox66*配列、

*EGFP*遺伝子(Clontech, Palo Alto, CA, USA)、*FRT* 配列、*Pgk* プロモーター、*puromycin N-acetyltransferase (Pac)* 遺伝子、そして*loxP*配列で構築した。

6-2) 培養とエレクトロポレーション

ES 細胞はTT2 (Yagi et al. 1993)とE14tg2a (Niwa et al. 2002)を用いた。トラップベクターpU-17とpU-18、それぞれ80 μ gのSpeI-digested DNAと 2×10^7 のES cellを使用し、ES細胞を0.8mLのphosphate-buffered saline (PBS)に懸濁、800 V、3 μ Fに設定したBio-Rad Gene Pulser (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)を用いエレクトロポレーションを行った。細胞を培養し、48時間後よりG418を200 μ g/mLに調整した培養液にて7日間selectionを行い、コロニー数をカウント、24-well plateに継代した。ES細胞におけるCreによる置換は以前の報告に従い行った。(Araki et al. 1999)

条件検討のため、トラップベクターpU-17を80 μ gとES細胞を、0.8mLのPBSに混濁、エレクトロポレーションの条件を、800 V、3 μ Fと400 V、125 μ Fとで行った。上記の如くselection後、ピックアップし6cm well または10cm wellよりDNAを回収した。

6-3) genomic DNAの解析

細胞または組織をsodium dodecylsulfate(SDS)/proteinase Kにて溶解し、1:1 (v/v) phenol/chloroform処理を行い、エタノール沈殿後、10 mM Tris-HCl, pH

7.5/1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) (TE)に溶解した。6 μ gの genomic DNAを適切な制限酵素で切断し、0.9%アガロースゲルで電気泳動を行い、nylon membrane (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)にブロットした。HybridizationはDIG DNA Labeling Kit (Roche)を用いた。

polymerase chain reaction (PCR)解析は、DNA(50 ng)をthermal cyclerを用い、1 min 94°C、2 min 55°C、2 min 72°C で30サイクルの条件にて施行した。

プライマー配列は以下の通りである。

組換え体検出用

SA5 (5'-GGTCACTTTATGTTCTTGCCC-3')、

GFP2 (5'-TGTGATCGCCGTTCTCGTTG-3')

β geo検出用

Z1 (5'-GCGTTACCCAACTTAATCG-3')

Z2 (5'-TGTGAGCGAGTAACAACC-3')

CAGGS-Flp transgene検出用

AG2 (5'-CTGCTAACCATGTTTCATGCC-3')

Flp5 (5'-ATCCTACCCCTTGCGCTAAA-3')

6 - 4) RNA解析

Sepasol(Nakalai, Kyoto, Japan)を使用しES細胞からRNAを抽出、Total

RNA10 μ gを1.0% agarose-formaldehyde gelsで電気泳動し、positively

charged nylon membrane (Roche)に写し、80°Cで1時間bakingを行い、プレハ

イブリダイゼーション後、DIG RNA Labeling and Detection Kit (Roche)を用

い作製したRNAプローブでハイブリダイゼーションを行った。

Total RNA 5 μ g を用い、reverse transcriptase ReverScript (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan) と lacZ 配列内のプライマーである LZUS3 primer (5'-GCGCATCGTAACCGTGCAT-3') を使用し first-strand cDNA を合成した。5'-RACE system (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に従い 5'-RACE を施行した。first PCR は、SA 配列内の primer

SA13 (5'-TCTGAAACTCAGCCTTGAGC-3') と anchor primer

(5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGiiGGGiiGGGiiG-

3') (Invitrogen) で行い、次いで nested PCR を SA 配列内の primer SA10

(5'-AGCAGTGAAGGCTGTGCGA-3') と anchor primer 内の配列

amplification primer (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3') で行った。PCR

産物を電気泳動し、Quantum Prep Freeze 'N Squeeze DNA Gel Extraction

Spin Columns (Bio-Rad) を用い精製、Big Dye Terminator Cycle

Sequencing kit (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) を用い dideoxy-chain

termination method によって配列を決定した。配列を得られたラインに関し

ては、得られた配列を元にプライマーを作製し、その ES より抽出した Total

RNA と random primers を用い RT-PCR 行い first-strand cDNA 作製、先ほどの

プライマーとトラップベクター内のプライマーで PCR 施行し、予測される

サイズのバンドの有無を確認した。確定した配列は BLASTN program

(<http://blast.genome.jp>)(Altschul et al. 1990) を用い、GenBank や GenEMBL

databasesと比較し、exon-intron構造はCelera Discovery System (Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan)を用い、検討した。

6-5) キメラマウスの樹立

キメラマウスはICR mice (CLEA Japan, Tokyo, Japan)のeight-cell embryosとES細胞のaggregationによって作製した。キメラのオスマウスを、F1 heterozygotesを得るためにC57BL/6 Jメスマウス(CLEA Japan)と交配した。CAGGS-Flpのmicroinjectionのために、BDF1(Charles River, Osaka, Japan)メスを過排卵状態とし、BDF1オスと交配させた。受精卵を収集し、前核へのinjectionを、以前報告された方法に従い施行した。(Yamamura et al. 1984)

6-6) 組織学的解析

5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside (X-gal)染色：

組織を4% paraformaldehydeに6時間固定後、vibratomeを用い50 μ mの切片とする。10分間 1% Triton X-100 in PBSで処理をし、PBSで3回洗浄、staining solution (5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl₂, 0.5% X-gal in PBS)内で一晩incubate施行。その後スライドガラスに固定し、Nuclear Fast redで対比染色を行う。

6-7) 免疫組織化学：

組織は、4%パラホルムアルデヒドでO/N固定した。パラフィン切片を準備し、anti-EGFP rabbit polyclonal antibody (MBL, Nagoya, Japan).で染色した。

7) 結果

7-1) pU-17の構造

pU-17の構造をFigure 1(A)に示した。pU-Hachiからの改良点は次の通りである。

1 : *lox71* site をSAのintron内に挿入した。

2 : *lox2272* and *lox511* sitesをそれぞれpAとplasmid vector tailの下流へ挿入した。これら二つの変更により、いろいろな置換が可能となった。(Fig. 9 and Discussion)

3 : IRESを除去した。結果として、SAのexon配列内の3つのstop codonが、 *β geo*遺伝子のATGと同一frameとなった。(Fig. 1C) 理論的にトラップされた遺伝子の開始コドンの上流にベクターが組み込まれたクローンのみがネオマイシン耐性となることが予想される。このように Stop- *β geo*ベクターはプロモータートラップとして機能することが予想され、トラップされた遺伝子のコントロール下にcDNAが発現することが予想される。しかしながらこのようなintegration siteの制限は、コロニー形成の効率を低下させる可能性がある。そのため我々は、ECMVのIRESを持つ他のトラップベクターとpU-17のコロニー形成の効率を比較してみた。

7-2) IRESの有無によるコロニー形成効率の比較

IRESの有無でのコロニー形成の効率を比較するため、pU-17をベースにSAと β geoの間にIRESを持つ、pU-18ベクター(Fig. 1B)を作製した。pU-17とpU-18の違いは、それぞれSAと β geoの間にIRESを持つか持たないかだけである。pU-18では、トラップされた遺伝子とIRES- β geoとのfusion messageが形成され、トラップされた遺伝子と β geoの両者のAUGから翻訳が開始される。そのため、IRES- β geoベクターのトラップされた遺伝子への挿入部位と関係なく、トラップクローンはG418耐性となるはずである(Bonaldo et al. 1998)。二つのベクターについて同日にエレクトロポレーションを行い、同一条件で培養を行った(Fig. 2)。細胞をG418で選別し、その後コロニー数を数えた。Table 1 に示したように、両者間でコロニー数はほぼ同じであり、pU-17ベクターはpU-18とコロニー形成効率が同等であることが示された。

7-3) エレクトロポレーションの条件検討

我々はエレクトロポレーション後の挿入効率を調べる目的で、pU-17ベクターに対し二つの条件(800 V、3 μ Fと400 V、125 μ F)でエレクトロポレーションを行った。同一日に同一ベクターを二つに分け二つの条件にてエレクトロポレーション施行、同一条件にて培養、G418選別を行い、ピックアップ前にコロニーの形態、個数について調べた。その後24wellへピックアップ、12wellから6well又は6cmdishに継代し、DNAを回収した。その

DNAをPCR、サザンブロットにて解析、挿入効率を検討した (Fig.3) 。PCRでは、*lox71*、*lox2272*、Amp、*lox511*、の欠損を調べ、全く欠損のないクローンは使用可能なクローンと判断、*lox71*、*lox2272*が欠損の場合、同部位でCre-LE/RE mutant *lox system*での β geo、pAの組換えが不可能となり使用できないクローンと判断、Amp、*lox51*欠損の場合は、3'delitionクローンとし、plasmid rescueが不可能な場合もあるが、使用可能なクローンとした (Table 2A) 。サザンブロットはLacZ probe、pUC probeを用い施行し、バンドのサイズ、本数より、ベクターがsingle copy (full、3'delition)で挿入されているのか、tandem挿入なのか、2～3 copy挿入なのか、使えないクローンなのか判断した (Table 2B) 。

結果、コロニーの形態に関しては、800 V、3 μ Fの条件ではG418 selection 後、コロニーが少ないことが多く、pick upの際 ES cell の選別ができず、形態の悪いのまで捨てるが多かったのに比べ、400 V、125 μ Fの方は上記条件よりもG418 selection 後、生き残る細胞数が多いため、pick upの際 ES cell の選別ができ、主に形態の良いのを捨てることができた。挿入効率に関しては、PCR、サザンブロットの結果、400V、125 μ Fの方が*lox71*欠損が多く、多コピー挿入など使えないクローンが多く、800V、3.0 μ Fの方が single 挿入効率が高く、*lox71*欠損も少なく良好な結果であった。

(Table 3)

7-4) pU-17の挿入部位の検討

pU-17とpU-18の挿入部位を確認するためにNorthern blottingを行い、トラップクロンの fusion message のサイズを比較し、トラップクロンにおけるpU-17の挿入部位を検討した。もしpU-17がトラップされた遺伝子の開始コドンの上流に組み込まれているならば、*βgeo*と融合したmRNAのサイズは短くなり、サイズとして約4.5kbになるはずである。Figure 4(B)に示したように、pU-17クロンのfusion messageのサイズは類似しており、全長約4.5-5kbであった。一方、pU-18クロンではほとんどが5kbを超える、いろいろなサイズのバンドが検出され、遺伝子の中央、または3'側に組み込まれていることが示唆された。この結果により、pU-17は内在性遺伝子の5'側に組み込まれやすい傾向があるということが示された。

次に、多数のトラップクロンにおいて、5'-RACE解析により配列を決定し、挿入部位についての解析を行った (Figure 5 Table 4)。pU-17のクロンの内22クロンが既知遺伝子をトラップしており、exon-intron構造における挿入部位をCelera Discovery Systemを用い決定した。Figure 4(A)に示したように、トラップクロンの82%が、トラップされた遺伝子の開始コドンを含むexonに隣接するintronに組み込まれていた。この結果は、pU-17がプロモータートラップベクターとして効率よく機能していることを示している。

7-5) EGFP geneの組換え実験

pU-17は4つの*lox* siteを持っており、*lox71*や、*loxP*、*lox2272*、*lox511*など、*lox* site間のDNA配列をその他のDNA配列と置換することが可能である。それらの置換について立証するため、Figure 6に示した如く、EGFP遺伝子の組換えを試みた。

*lox66-SA-EGFP-FRT-Pgk promoter-Pac-FRT-loxP-pSP73*を持つ置換ベクターを作製、置換のため、targeting plasmidとpCAGGS-Creをそれぞれ20 μ gずつ環状のまま、ESクローンとエレクトロポレーションを行った。置換ベクターとトラップベクターは同じspacer region (*lox66* and *loxP*、*lox71* and *loxP*)を含む2つの*lox* siteを持っているため、エレクトロポレーション後、最初の組換えが2つの*lox* site間で起こり、結果、Figure 6の中央に示す如く、2つの中間産物が生成されることが予想される。次いで、置換の起こったES細胞をpuromycinで選別した。Targeting vector内の*Pac*遺伝子はpAシグナルを持たないため、ランダム挿入のものはpuromycin感受性となり、Creによる組換えが起こったときのみ、*Pac*遺伝子はトラップベクターのpAシグナルと融合し、薬剤耐性を獲得する。その後、Flp/*FRT* systemを用い*Pac*遺伝子を除去、EGFP遺伝子をトラップされたプロモーターの支配下に発現させた。この除去は、CAGGS-Flp transgenic miceとかけあわせることにより行った。

2つのトラップクローンを置換実験に使用した。Ayu17-71は新規遺伝子をトラップしており、*βgeo*の発現パターンはubiquitousである。(Fig. 7)

Ayu17-104はShroom 遺伝子(Hildebrand & Soriano 1999)をトラップしており、組織特異的発現パターンを呈している。

エレクトロポレーション後、Ayu17-71とAyu17-104についてそれぞれ17、16個のコロニーをピックアップした。5'-と3'-の接合部を確認するため、PCRとPac probeを用いてSouthern blot hybridizationを行った。うまく組換えが起こっている場合、PCRにて1.5kbのバンドが検出され、Southern blotにて2.4kbのバンドが検出される(Fig. 7A)。Figure 7(B)にAyu17-104の結果を示した。16クローンの内15クローン(94%)で目的の組換えパターンを示した。Ayu17-71では82%で組換えが起こっていた。(Table 5) このことにより、poly(A)トラップを用いた置換システムが効率よく機能していることが証明された。

7-6) 置換クローンのキメラマウス作製とCAGGS-Flp miceとの交配

まずAyu17-71とAyu17-104のそれぞれから得られた置換クローンを用いキメラマウスを作製し、germlineキメラを得ることに成功した。次いでキメラのオスマウスとFlp遺伝子をubiquitousに発現するCAGGS-Flpトランスジェニックマウスと交配した。CAGGS-Flp導入遺伝子と置換されたトラップベクターとのdouble-positive マウスにおいて、組換えはFRT siteの

間で起こり、結果PGK-pac配列が欠損するはずである。それを証明するために、double-transgenic マウスのtail DNAを用いEGFP probeによるSouthern blottingを行い、組換えを立証した。組換え体のalleleは1.4kbのバンドであるが、本来のalleleは2.8kbのバンドとなる。Figure 6に示すように予想される1.4kbのバンドがdouble-transgenic miceの全てにおいて得られた。しかしながら、double-transgenic miceの子孫の40-80%にのみ組換えパターンが示され、Flp遺伝子がこのCAGGS-Flpトランスジェニックマウスラインにおいて全ての配偶子において組換えが起こっているわけではないことを示唆している。

7-7) EGFP遺伝子の発現パターン

組み込まれたEGFP遺伝子の生体内での発現パターンは、親における β geoの発現パターンと同一であるはずである。そこでNorthern blottingによりそれらの発現パターンを検討した。Figure 7(A)に置換前の親ラインから確立したヘテロマウスでの β geoの発現を示し、Figure 7(B) にdouble-positive F1 miceにおけるEGFPの発現を示した。Ayu17-71において、 β geoの発現はubiquitousで、脳、腎臓では強い発現を示した。置換後、同様の発現パターンがEGFP遺伝子で観察された。Ayu17-104においては、 β geoの発現を心臓、肺、腎臓、胃、腸に認め、EGFP遺伝子の組換え後でも同様のパターンを認めた。いくつかの組織において約2.4kbのextra bandを検出した。

このサイズはFlpによる組換え前のsingle-positive *EGFP* miceにおいて検出されるサイズと同じであり、Flpによる組換えが完全ではないことを示している。

次いで、 *β geo*ラインでのX-gal 染色と、置換後の*EGFP*ラインでの抗*EGFP*抗体を用いた免疫染色での組織学的解析により、細胞レベルでの発現パターンを確認した。Figure 8 に示すように、Ayu17-71ではプルキンエ細胞、大脳、腎髄質において(Fig. 8A)、Ayu17-104では胃粘膜、腎糸球体において(Fig. 8B)、両染色法で染色を認めた。このように、挿入された*EGFP* 遺伝子は、 *β geo*遺伝子と同じ組織に特異的パターンで発現した。

8) 考察

これらの結果により、①トラップベクターが内在性遺伝子の5'側に選択的に挿入されること、② β geoレポーター遺伝子を容易に他の遺伝子と組換えることができること、③組換えた遺伝子が生体内で β geo遺伝子と同じ発現パターンを示すこと等、我々の作製したトラップベクターpU-17での可変型遺伝子トラップシステムが期待通り機能していることが証明された。

レポーター遺伝子の組換えに加えて、Figure 9 に示すようにpU-17 トラップクローンを用い、多くの他の組換えを実施することが可能となる。例えば、目的のgenomic DNA またはcDNAを、*lox71*と*loxP* の間で組換えることにより、その遺伝子を発現させることができる。(Fig. 9A) また、point またはdominant-negative mutationのような、いろいろなタイプの変異を導入することもできる。また、*lox71*と*lox2272*間の置換により、以前の報告のように(Araki et al. 2002)、*cre*遺伝子を挿入、発現させることもできる(Fig. 9B)。 β geoの発現を観察することにより、好みの発現パターンを持つトラップラインを選別できるため、いろいろなCre-miceの産生に好都合となる。更に、トラップベクターが内在性遺伝子のATGの5'側に組み込まれた場合、外来性プロモーターを挿入することによりトラップされた遺伝子の発現パターンを変えることもできる。(Fig. 9B) ES細胞において強

い活性を持つプロモーターを使用することにより、5'-RACEにより解析できなかつた遺伝子を同定するための3'-RACEによる解析を容易にすることが予想される。全てのcaseにおいて、置換のためのマーカー遺伝子は、*CAGGS-Flp mice*と交配することで除去できる。

pU-17では、置換後に挿入されたcDNAが発現するのに都合がいいように、*βgeo*遺伝子のATGの上流に同一フレームで終止コドン挿入した。これによりIRESを使用したり、トラップされた遺伝子と挿入したcDNAの間で、これを発現させるためにフレームを調整したりする必要がなくなった。

理論的にはコロニー形成の効率が落ちるはずであるが、今回の結果ではIRESのあるなしでコロニー形成の効率に有意な違いは明らかとはならなかった。IRESのあるpU-18クローンにおいて、ノザンブロットを行いベクターの挿入位置が5'側に選択的に挿入されずに、完全にランダムであることを確認し、pU-18のIRESがトラップクローンにおいて予想通り機能していることを示した。しかしコロニー形成の効率に有意な違いが生じなかったことに関しては、IRES依存の翻訳は周囲の配列に影響を受けるため、常に効率よく機能していないのではないかと推測する。一方、Bonaldo et al. (1998)は、彼らのSA-IRES-*βgeo*がSA-*βgeo*よりも6.7倍もコロニー形成の効率が良かったと報告している。この理由ははっきりしないが、彼らのSA-*βgeo*では、*βgeo*の開始コドンがないことが原因ではないかと推測する。

それ故、彼らのベクターでは、 βgeo とトラップされた遺伝子の安定した融合タンパクが産生された場合のみ、G418耐性となる。そのため融合タンパクが産生される確率は、pU-17でトラップされるものよりも、かなり低いのではないだろうか。

トラップベクターpU-17では、ベクターが遺伝子の5'領域に挿入される傾向が強いことが示された。レトロウイルスベクターで遺伝子の5'末に挿入されやすい傾向があることはよく知られているが(Friedrich & Soriano 1991; von Melchner et al. 1992)、プラスミドトラップベクターではThomas et al. (2000)によって報告されたpKC199 βgeo を除き、そのような傾向を持つものは報告されていない。pKC199 βgeo は、 βgeo のATGと同一フレームで終止コドンを持っているが、彼らは、遺伝子の5'末端に挿入されやすい傾向について他の可能性についてだけ考察しており、このことについては記載していなかった。このように βgeo の開始コドンと同一フレームで5'側に終止コドンを持たせることにより、ベクターを遺伝子の5'末端周囲へ組み込みやすくすることが可能となる。

pU-17において、トラップクローンの64%がトラップされた遺伝子の開始コドンを含むexonの下流に組み込まれていた(Fig. 4B)。upstream AUGとopen reading frames (uAUG/uORF) は、主となるATGからの翻訳に対し主に負の制御に働くことが知られており(Morris & Geballe 2000; Kozak

2002)、ヒトのmRNAの約半数に、uAUG/uORFが存在することが推測されている(Suzuki et al. 2000)。リボソームのLeaky scanning やreinitiation mechanisms といった翻訳機構により、リボソームは下流の主となるATGへアクセスすることが可能となる(Kozak 2002)。uAUG/uORFにより、主となるORFからの翻訳が減少するかもしれないが、リボソームの約40%が2回、約25%が3回、scanningすることが可能であることが報告されている(Wang & Rothnagel 2004)。トラップベクターpU17が内在性遺伝子のATGの3'側に挿入された場合(downstream-integrated)、内在性のATGから始まるORFは、pU17の構造的特徴によりuORFとして働いていると予想され、*βgeo*の翻訳開始は内在性のトラップされた遺伝子の翻訳開始よりやや頻度が少ないかもしれないが、G418耐性を得るには十分であったことが考えられる。‘downstream-integrated’トラップマウスにおけるβgalの活性はトラップされた遺伝子の発現パターンを正確に反映しているかどうかはIRES-LacZのtargeted insertionによって容易に検証でき、この解析は現在行っているところである。

我々は20以上の可変型トラップクローンでtargeted integrationを行ってきた。そして、一つを除くすべてのクローンで、80-95%の高い確率で組換え体のクローンを得るのに成功した。このように、targeted integrationは高い再現性がある。我々の可変型遺伝子トラップ法は従来の遺伝子トラッ

ブ法の限界を克服し、large-scale mutagenesisにとって理想的な手法となる
ことが期待できる。

9) 結語

遺伝子トラップ法は未知の遺伝子の同定と同時に、その変異マウスを作製し、その表現型解析を行うことによりトラップした遺伝子の機能解析ができる極めて有用な方法であり、我々はこれまで多種多様なトラップベクターの作製を行ってきたが、今回新しいベクターpU-17を作製した。特徴として、ベクターのSAのexon配列内に3つのstop codonが存在し、 β geo遺伝子のATGと同一frameとなることにより、Stop- β geoベクターとなり、このためプロモータートラップとして機能すること、またCre-LE/RE mutant *lox* system が組み込まれており、いろいろな部位でのいろいろな置換が可能でありことがあげられる。実際にプロモータートラップとして働いているかどうか検証したが、トラップベクターの挿入部位は内在性遺伝子の開始コドンの周囲に挿入されていることが多く、プロモータートラップとして機能していることがわかった。また、Cre-LE/RE mutant *lox* system の検証をすべくマーカー遺伝子とEGFP遺伝子の組み換えを行い、高い確率で組み換えが起こることを証明した。このように我々の遺伝子トラップ法は、遺伝子解析手法として非常に有用な手法となりうることが期待される。

1 0) 参考文献

- Albert, H., Dale, E. C., Lee, E. & Ow, D. W. 1995. Site-specific integration of DNA into wild-type and mutant lox sites placed in the plant genome. *Plant J.* 7, 649–659.**
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.**
- Araki, K., Araki, M., Miyazaki, J. & Vassalli, P. 1995. Site-specific recombination of a transgene in fertilized eggs by transient expression of Cre recombinase. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 92, 160–164.**
- Araki, K., Araki, M. & Yamamura, K. 1997. Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 25, 868–872.**
- Araki, K., Araki, M. & Yamamura, K. 2002. Site-directed integration of the cre gene mediated by Cre recombinase using a combination of mutant lox sites. *Nucleic Acids Res.* 30, e103.**
- Araki, K., Imaizumi, T., Okuyama, K., Oike, Y. & Yamamura, K. 1997. Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. *J. Biochem. (Tokyo)* 122, 977–982.**
- Araki, K., Imaizumi, T., Sekimoto, T. et al. 1999. Exchangeable gene trap using the Cre/mutated lox system. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-Grand)* 45, 737–750.**
- Bonaldo, P., Chowdhury, K., Stoykova, A., Torres, M. & Gruss, P. 1998. Efficient gene trap screening for novel developmental genes using IRES β -geo vector and in vitro preselection. *Exp. Cell Res.* 244, 125–136.**

Chowdhury, K., Bonaldo, P., Torres, M., Stoykova, A. & Gruss, P. 1997. Evidence for the stochastic integration of gene trap vectors into the mouse germline. *Nucleic Acids Res.* 25, 1531–1536.

Evans, M. J., Carlton, M. B. L. & Russ, A. P. 1997. Gene trapping and functional genomics. *Trends Genet* 13, 370–374.

Friedrich, G. & Soriano, P. 1991. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. *Genes Dev.* 5, 1513–1523.

Ghattas, I. R., Sanes, J. R. & Majors, J. E. 1991. The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos. *Mol. Cell Biol.* 11, 5848–5859.

Gossler, A. & Zachgo, J. 1993. Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras. *Gene Targeting: a Practical Approach.* (ed. Joyner A.) pp. 181–227. Oxford University Press, Oxford.

Gossler, A., Joyner, A. L., Rossant, J. & Skarnes, W. C. 1989. Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. *Science* 244, 463–465.

Hansen, J., Floss, T., Van Sloun, P. et al. 2003. A large-scale, gene-driven mutagenesis approach for the functional analysis of the mouse genome. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 9918–9922.

Hildebrand, J. D. & Soriano, P. 1999. Shroom, a PDZ. domaincontaining actin-binding protein, is required for neural tube morphogenesis in mice. *Cell* 99, 485–497.

Jang, S. K. & Wimmer, E. 1990. Cap-independent translation of encephalomyocarditis virus RNA: structural elements of the

internal ribosomal entry site and involvement of a cellular 57-kD RNA-binding protein. *Genes Dev.* 4, 1560–1572.

Kang, H. M., Kang, N. G., Kim, D. G. & Shin, H. S. 1997. Dicistronic tagging of genes active in embryonic stem cells of mice. *Mol. Cells* 7, 502–508.

Kozak, M. 2002. Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene* 299, 1–34.

von Melchner, H., DeGregori, J. V., Rayburn, H., Reddy, S., Friedel, C. & Ruley, H. E. 1992. Selective disruption of genes expressed in totipotent embryonal stem cells. *Genes Dev.* 6, 919–927.

Morris, D. R. & Geballe, A. P. 2000. Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol. Cell Biol.* 20, 8635–8642.

Mountford, P. S. & Smith, A. G. 1995. Internal ribosome entry sites and dicistronic RNAs in mammalian transgenesis. *Trends Genet* 11, 179–184.

Niwa, H., Masui, S., Chambers, I., Smith, A. G. & Miyazaki, J. 2002. Phenotypic complementation establishes requirements for specific POU domain and generic transactivation function of Oct – 3/4 in embryonic stem cells. *Mol. Cell Biol.* 22, 1526–1536.

Oike, Y., Hata, A., Mamiya, T. et al. 1999. Truncated CBP protein leads to classical Rubinstein–Taybi syndrome phenotypes in mice: implications for a dominant-negative mechanism. *Hum. Mol. Genet* 8, 387–396.

Ringrose, L., Lounnas, V., Ehrlich, L. et al. 1998. Comparative kinetic analysis of FLP and cre recombinases: mathematical models for DNA binding and recombination. *J. Mol. Biol.* 284, 363–384.

Stanford, W. L., Cohn, J. B. & Cordes, S. P. 2001. Gene-trap mutagenesis: past, present and beyond. *Nat. Rev. Genet* 2, 756–768.

Stoykova, A., Chowdhury, K., Bonaldo, P. et al. 1998. Gene trap expression and mutational analysis for genes involved in the development of the mammalian nervous system. *Dev. Dyn.* 212, 198–213.

Stryke, D., Kawamoto, M., Huang, C. C. et al. 2003. BayGenomics: a resource of insertional mutations in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 31, 278–281.

Suzuki, Y., Ishihara, D., Sasaki, M. et al. 2000. Statistical analysis of the 5' untranslated region of human mRNA using 'Oligo-Capped' cDNA libraries. *Genomics* 64, 286–297.

Thomas, T., Voss, A. K., Chowdhury, K. & Gruss, P. 2000. A new gene trap construct enriching for insertion events near the 5' end of genes. *Transgenic Res.* 9, 395–404.

Townley, D. J., Avery, B. J., Rosen, B. & Skarnes, W. C. 1997. Rapid sequence analysis of gene trap integrations to generate a resource of insertional mutations in mice. *Genome Res.* 7, 293–298.

Voss, A. K., Thomas, T. & Gruss, P. 1998. Efficiency assessment of the gene trap approach. *Dev. Dyn.* 212, 171–180.

Wagner, E. & Lykke-Andersen, J. 2002. mRNA surveillance: the perfect persist. *J. Cell Sci.* 115, 3033–3038.

Wang, X. Q. & Rothnagel, J. A. 2004. 5' untranslated regions

with multiple upstream AUG codons can support low-level translation via leaky scanning and reinitiation. *Nucleic Acids Res.* 32, 1382–1391.

Waterston, R. H., Lindblad-Toh, K., Birney, E. et al. 2002. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 420, 520–562.

Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y. et al. 1993. A novel ES cell line, TT2, with high germline-differentiating potency. *Anal Biochem.* 214, 70–76.

Yamamura, K., Kikutani, H., Takahashi, N. et al. 1984. Introduction of human γ 1 immunoglobulin genes into fertilized mouse eggs. *J. Biochem. (Tokyo)* 96, 357–363.

Zambrowicz, B. P. & Friedrich, G. A. 1998. Comprehensive mammalian genetics: history and future prospects of gene trapping in the mouse. *Int. J. Dev. Biol.* 42, 1025–1036.

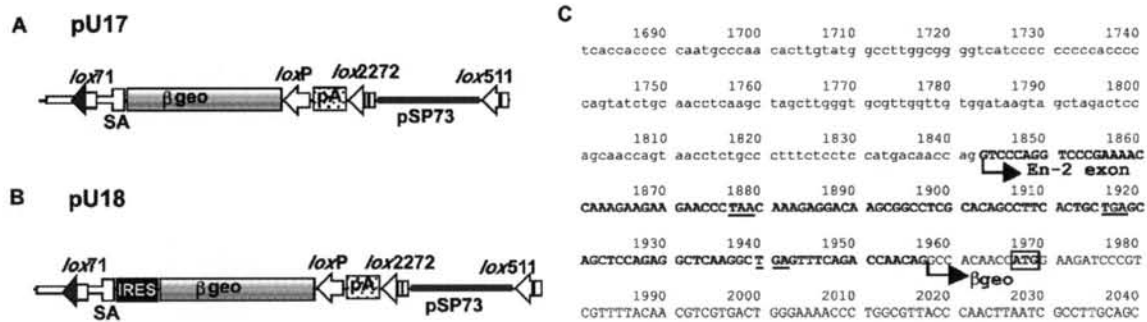


Figure 1

トラップベクターの構造

A : pU17 の構造 : マウス *En-2* 遺伝子の splice acceptor (SA)、*βgeo*、polyadenylation signal (pA) を含み、*En-2* 遺伝子のイントロン内、5' 側に *lox71* を、*βgeo* の下流に *loxP*、pA の下流に *lox2272*、*pSP73* の下流に *lox511* が挿入されている。

B : pU18 の構造 : pU17 との相違は SA と *βgeo* の間に ECMV の IRES を持つことである。

C : pU17 の SA と *βgeo* の配列である。小文字が intron、大文字が exon である。*βgeo* の開始コドン (box) の上流に同一フレームで 3 つの終止コドン (下線) が存在する。このため、トラップされた遺伝子の開始コドンの上流にトラップベクターが挿入されることが予想される。

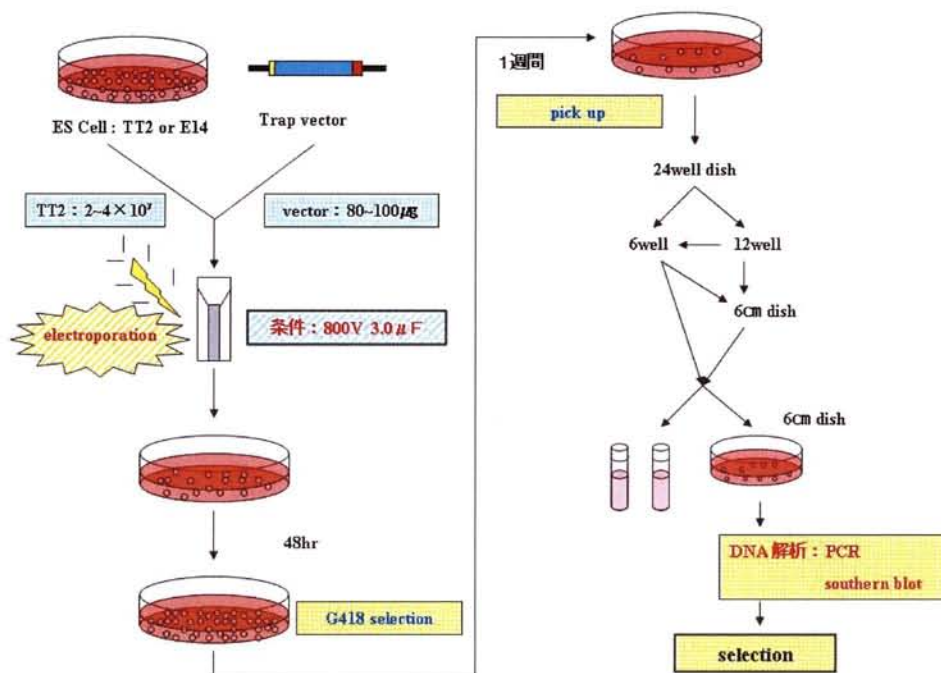


Figure 2

ES 細胞の培養

80 μg の SpeI-digested トラップベクター-DNA と 2×10^7 の ES cell を使用し、800 V、3 μF の条件でエレクトロポレーションを行った。培養後、48 時間後より G418 を 200 μg/mL に調整した培養液にて 7 日間 selection を行い、生存したコロニーを植え継いでいき、一部はストックへ、一部は DNA 解析に使用された。

Table 1 pU17 と pU18 のコロニー形成効率

Trap vector	Number of G418-resistant colonies		
	1st exp.	2nd exp.	3rd exp.
pU-17	34	135	36
pU-18	38	153	42

Electroporation : 800V 3 μ F

直線化されたトラップベクター80 μ g と 2×10^7 の ES 細胞で計 3 回エレクトロポレーションを行った。G418 selection 後のコロニー数を計算した。

PCR, southern blotting analysis

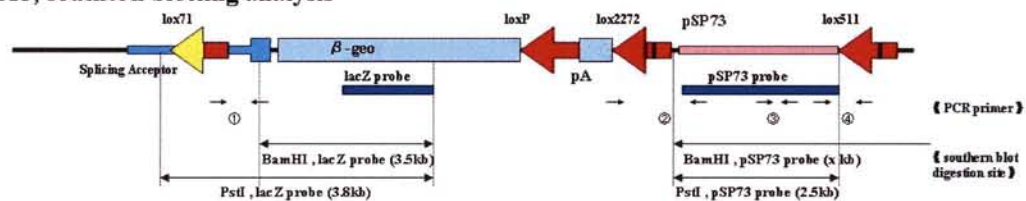


Figure 3

PCR で使用するプライマーと、サザンブロットで使用する制限酵素サイト、使用するプローブの部位である。

Table 2 トラップベクターの挿入確認**A PCR**

	Sense primer	Antisense primer	size
①lox71	Lox71-P	SA-9	596bp
②lox2272	PUPA-S	T7	409bp
③amp	Amp-S	Amp-AS	659bp
④lox511	pSP72-1	loxP-B	221bp

B southern blotting analysis

	lacZ probe		pSP73 probe	
	BamHI	PstI	BamHI	PstI
○	1本(3.5kb)	1本(4kb)	1本(x kb)	1本(2.5kb)
	1本(3.5kb)	1本(4kb)	1本(x kb)	1本(x kb)
△ Tandem	1本(3.5kb)	1本(4kb)	2本(4,x kb)	2本(2.5,x kb)
△ 2copy	1本(3.5kb)	1本(4kb)	2本	2本
×	(-), or multiple	(-), or multiple	(-), or multiple	(-), or multiple

A : PCR でベクターの挿入状態を確認する。lox サイトや amp サイトの欠損が、バンドのサイズにより予想される。

B : サザンプロットの結果を評価する。それぞれのプローブのバンドの数、サイズによりトラップベクターがどのように挿入されているかがわかる。

Table 3 エレクトロポレーションの条件検討

	PCR				southern blotting analysis					計
	①lox71	②lox2272	③amp	④lox511(tandem)	○	(3'deletion)	Δ Tandem	Δ	×	
800V 3.0 μ F	48/70 69%	49/55 89%	33/70 47%	9/70(4/55) 13%(7%)	26/69 38%	(20/55) 36%	11/69 16%	1/69 1%	31/69 45%	70
400V 125 μ F	65/138 47%	57/74 77%	73/138 53%	19/138(13/74) 14%(17.5%)	17/135 13%	(6/74) 8%	9/135 7%	7/135 5%	102/135 76%	138

*①、②は必須、③、④は欠損でも可(3'deletion)

エレクトロポレーションの条件を変えて、トラップベクターの挿入効率の比較を行った。

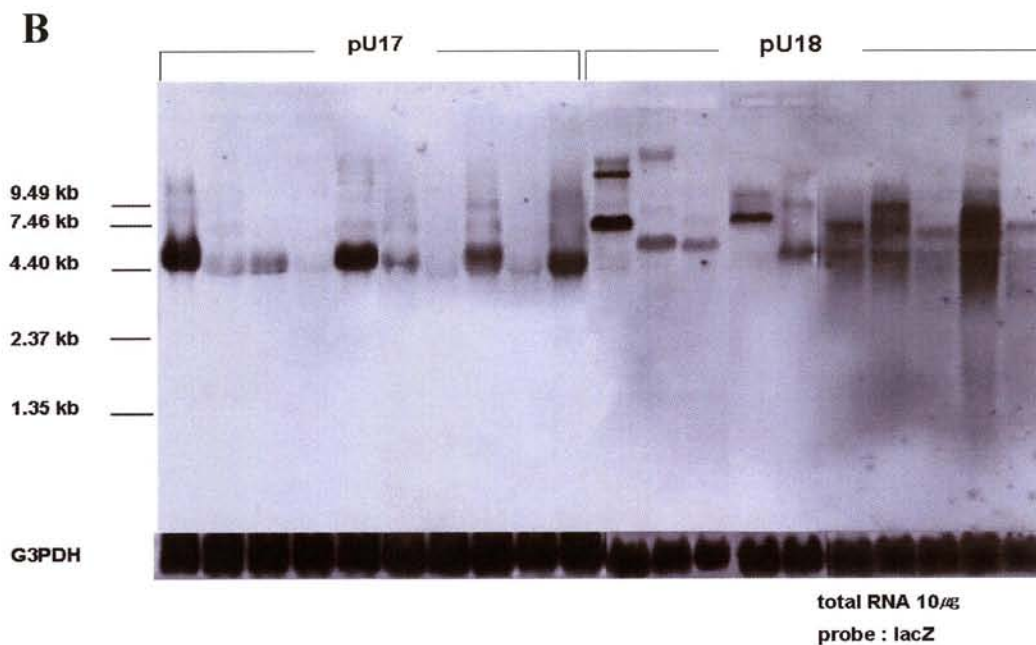
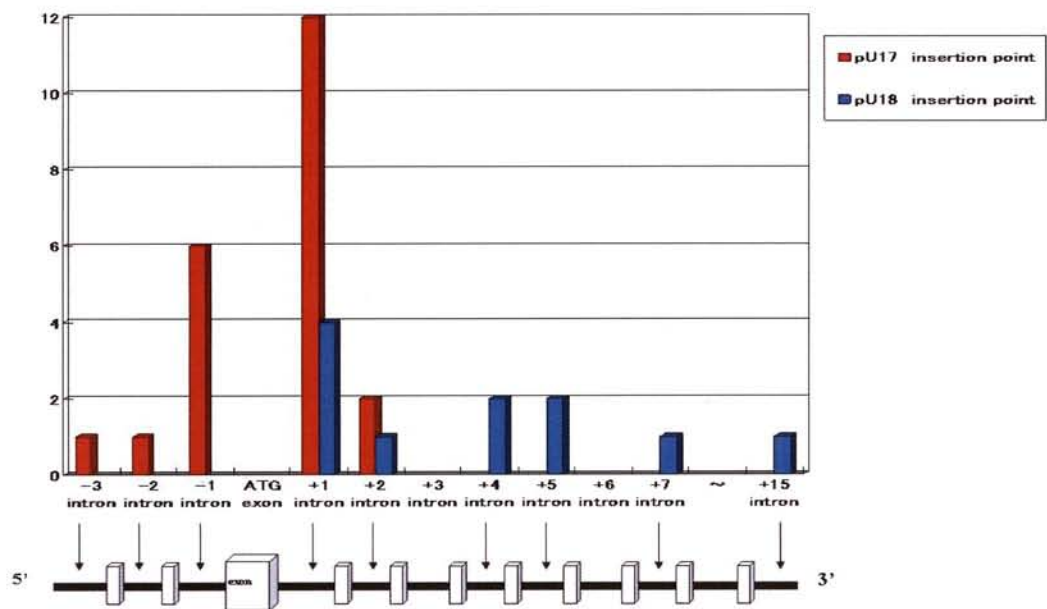


Figure 4

pU-17 と pU-18 の挿入部位の比較

A : Celera Discovery System を用いた挿入部位の比較。pU-17 が予想通り内在性遺伝子の ATG の周囲に挿入されていることがわかる。

B : ノザンプロットでの比較。pU-17 では *βgeo* と融合した mRNA のサイズは短くなり、サイズとして約 4.5kb になるはずであるが、これが証明された。

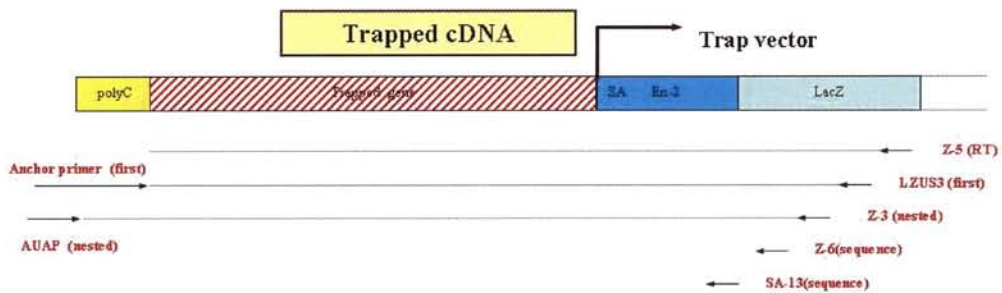
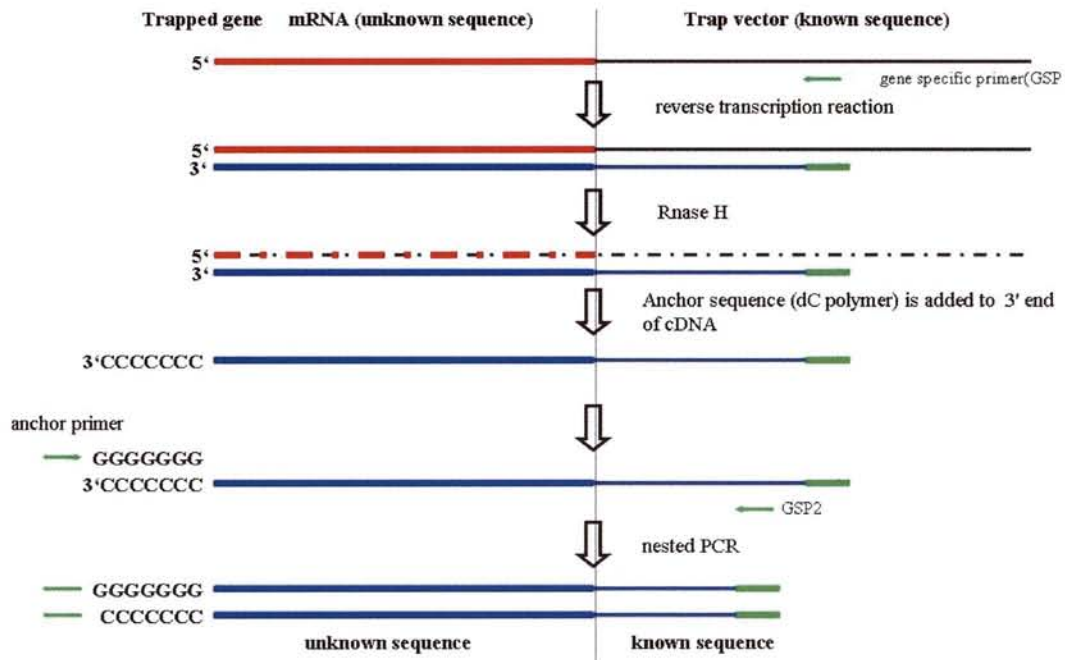


Figure 5

5'RACE の原理と実際使用するプライマーの部位
5'RACE によりトラップされた遺伝子の同定を行う。

Table 4 同定された遺伝子の評価

Known	EST	Novel	ND	Total
22(17%)	61 (47%)	29 (22%)	17(13%)	129 (100)

BLASTN program を用い同定された遺伝子の評価を行った。

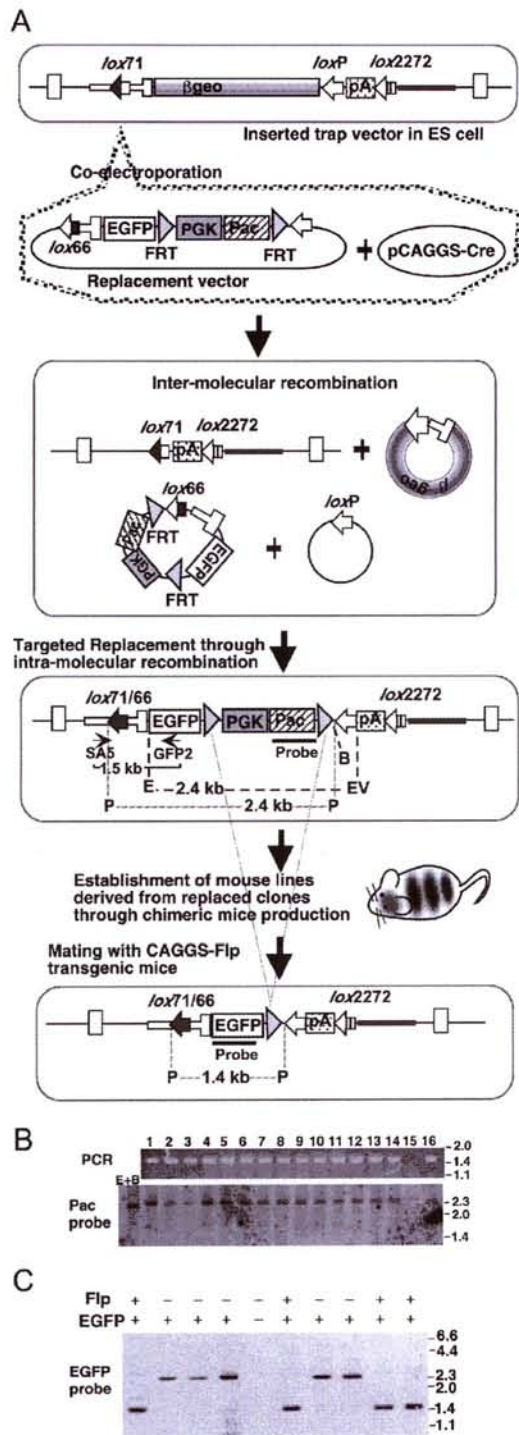


Figure 6

EGFP と *βgeo* の置換と Flp/FRT システムを用いたマーカー遺伝子の除去

A: 遺伝子置換の仕組み。上図にトラップベクターと targeting vector plasmid の構造を示した。targeting vector p6SEFPPF は *lox66-SA-EGFP-FRT-Pgk promoter-Pac-FRT-loxP-pSP73* の構造を持つ。p6SEFPPF と Cre 発現ベクターである pCAGGS-Cre をトラップされた ES 細胞と共にエレクトロポレーションを行い、puromycin にて置換された細胞を選別した。二段目の図に予想される中間産物を示した。その後 Cre の作用による組み換えが起こり、*EGFP* 遺伝子と置換される。置換されたクローン由来のマウスラインが確立した後、*CAGGS-Flp* トランスジェニックマウスと交配することにより Flp/FRT 組み換えが起こり *Pgk-Pac* を除くことができる。組み換え後の配列を一番下に示した。

B: *Ayu17-104* クローンでの *SA-EGFP-FRT-Pgk-Pac-FRT* の置換を検出するため PCR、サザンロットを行った。16 のコロニーを pick up し、その genomic DNA を用い、5'側の判定をプライマー SA5 と GFP2 の PCR にて行い、3'側は、制限酵素 *EcoRV* と *EcoRI* とで切断後 *Pac* プロブにてサザンロット行い判定した。16 クローンの内、15 クローンで予想されるサイズのコロニーを認めた。

C: Flp による組み換えの検出。*CAGGS-Flp* トランスジェニックマウスと交配後に得られた組み換えマウスの genomic DNA を用い、PCR にて組み換えが行われたかどうかを調べた。PCR の結果は+にて示されている。次に FRT サイト間の組み換えを見るため、*Pst I* にて切断後 *EGFP* プロブにてサザンロットを行った。組み換えが起こった場合 1.4kb のバンドが、起こっていない場合 2.8kb のバンドが検出されるはずである。double-transgenic mice においてははすべて 1.4kb のバンドが検出され、Flp により *Pgk-Pac* が除かれたことがわかる。

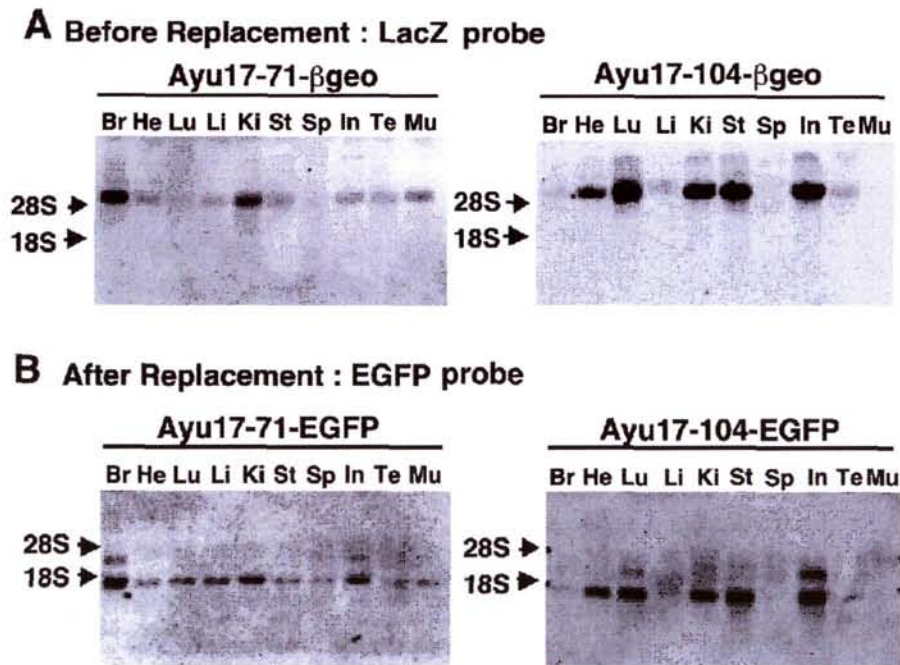


Figure 7

β geo と *EGFP* 遺伝子の発現

A : *LacZ* probe を用いたノザンブロット解析 : Ayu17-71- *β geo* または Ayu17-104- *β geo* トラップマウスから RNA を抽出しノザンブロットに使用した。

B : *EGFP* probe を用いたノザンブロット解析 : Ayu17-71-*EGFP* または Ayu17-104-*EGFP* トラップマウスから RNA を抽出しノザンブロットに使用した。

Br : 脳 He : 心臓 Lu : 肺 Li : 肝臓 Ki : 腎臓 St : 胃 Sp : 脾臓 In : 腸 Te : 精巣 Mu : 筋肉

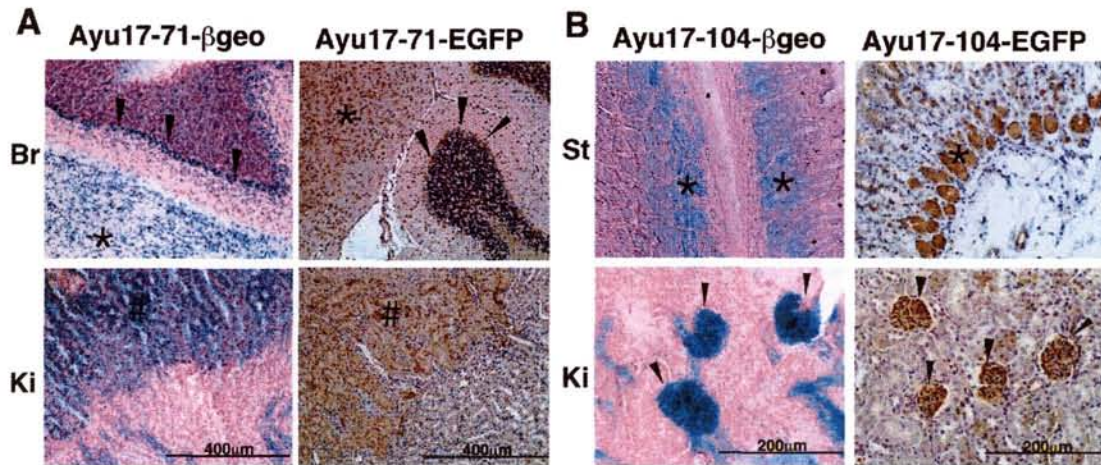


Figure 8

β geo と *EGFP* 遺伝子の発現の組織学的解析

A : Ayu17-71- *β geo* と Ayu17-71-*EGFP* マウスから得られた脳 (Br) と腎 (Ki) をそれぞれ X-gal (左)、抗 EGFP 抗体 (右) で染色した。Purkinje 細胞 (arrow heads)、大脳 (*) 腎髄質 (#) が染色された。

B : Ayu17-104- *β geo* と Ayu17-104-*EGFP* マウスから得られた胃 (St) と腎 (Ki) をそれぞれ X-gal (左)、抗 EGFP 抗体 (右) で染色した。胃粘膜 (*)、腎糸球体 (arrow heads) が染まった。

Table 5 *EGFP* 遺伝子との置換の結果

Parental cell line	Total no. of colonies	No. of colonies analyzed	No. of colonies with targeted integration	% of targeted integration
Ayu17-71	22	17	14	82
Ayu17-104	109	16	15	94

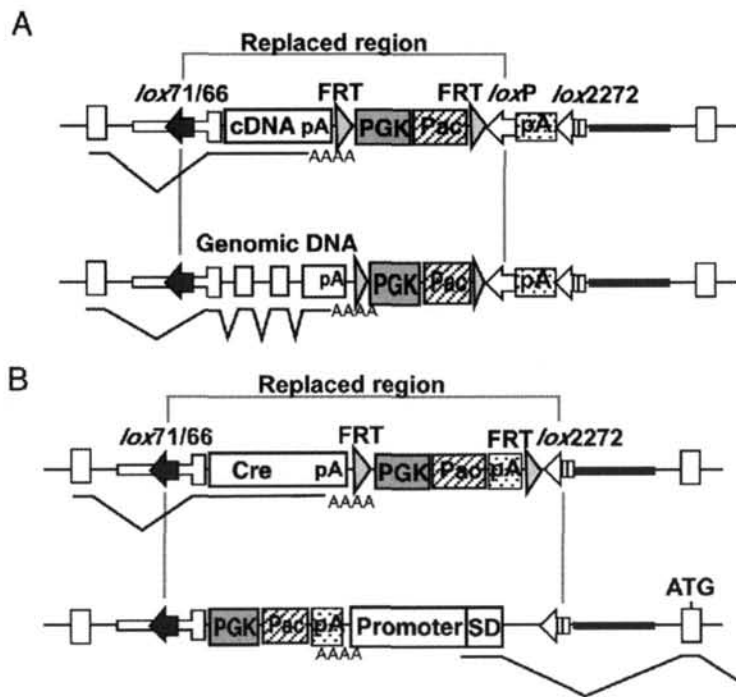


Figure 9

pU-17 のトラップされたクローンの再置換

A : lox71 と loxP 間での置換 : 興味のある cDNA や genomic DNA をトラップしたプロモーター活性のコントロール下に発現させることができる。

B : lox71 と lox2272 間での置換 : cre 遺伝子をトラップしたプロモーター活性のコントロール下に発現させることができる。またプロモーター配列が挿入された場合、トラップされた遺伝子の発現パターンを変えることもできる。