

哺乳類におけるトランスポゾンの利用 : *Sleeping Beauty* と *piggyBac*

基礎研究においてトランスポゾンはゲノム再編を促す原動力として注目されている。一方、応用研究においては便利な道具として実用化されている。トランスポゾンの応用例はやはり、トランスジェニック生物の作成（トランスジェネシス）と、挿入による遺伝子破壊（Insertional mutagenesis）に代表されるだろう。トランスポゾンに目的遺伝子を組み込んで転移させることによるトランスジェネシスは、相同組換えを利用した手法よりもはるかに効率が良い。また、Insertional mutagenesis では、トランスポゾンの挿入位置を決定することは、変異原による塩基置換や挿入欠失を同定するよりもはるかに容易である。この2つの手法はよく似ているようでいて、実は期待される特徴が全く異なる。Insertional mutagenesis では、トランスポゾンはできるだけ遺伝子の中に入ってほしいし、満遍なくいろいろな遺伝子に挿入されることが期待されている。一方、トランスジェネシスでは、トランスポゾンはできるだけ遺伝子の無い、挿入による影響が無い位置に転移することが要求される。トランスジェネシスを利用した遺伝子治療では想定外の害を生まないためには必須の性質である。トランスポゾンはそれぞれ異なった挿入位置の特徴を持っており、両手法に都合の良いトランスポゾンを得ることは容易ではない。このため、いくつかのトランスポゾンに由来する手法を開発する必要がある。

また、もう一つの問題点はトランスポゾンの宿主域である。トランスポゾンは本来別の生物に水平転移する能力は持っておらず、特定の生物内でのみ転移するため、人為的に他の生物に導入した場合に転移するかどうかは未知数である。最も初期に開発されたショウジョウバエの P 因子による遺伝子破壊系は、ショウジョウバエでは非常に有用なシステムだが、P 因子が他の生物で全く転移しないために比較的近縁な蚊ですら使用できない。一般に、ある生物からとられたトランスポゾンは近縁な生物では転移しやすいが、系統関係の遠い生物では転移しにくい。脊椎動物において転移能力を持つ DNA トランスポゾンはメダカの *Tol2* しか知られていない。一方、転移能力を失った DNA トランスポゾンを複数の硬骨魚類から再構成し、人工的に転移能力を持たせたトランスポゾンが開発されている (Ivics et al. 1997)。このトランスポゾンは、転移能力の回復を目覚めに例えて *Sleeping Beauty* (眠り姫) と命名された。*Sleeping Beauty* も *Tol2* も硬骨魚類から哺乳類まで転移することが確認されている。

2005年7月14日に出版された *Nature* に *Sleeping Beauty* をマウスのガン遺伝子の探索に使用した2本の論文が掲載された (Collier et al. 2005; Dupuy et al. 2005)。ガンは成体の体細胞における突然変異によって引き起こされるため、トランスポゾンを用いてガンを誘発するためには生殖細胞ではなく体細胞でトランス

ンスポゾン転移させなければならない。生殖細胞での転移によるトランスジェニック生物の作成では、転移頻度が低くとも変異体のみを選択できるが、体細胞では転移した細胞だけを選ぶことは難しい。そのような制約の中、彼らはトランスポゾンの転移によりガンを引き起こすために異なる手法を用いた。Collierらは低い転移頻度でもガン化するようにガン抑制遺伝子 *p19Arf* のノックアウト系統のマウスにトランスポゾンを導入した。一方、Dupuyらは転移頻度を上昇させることでガンを効率よく誘発するシステムを開発した。

DNA トランスポゾンの転移では、転移酵素トランスポザナーゼがトランスポゾンの両末端に存在する逆向き反復配列 (Terminal inverted repeat, TIR) を認識して、トランスポゾン全長を切り出し、その逆反応として、別の位置にトランスポゾンを挿入する。トランスポザナーゼは通常、トランスポゾンの両末端の TIR しか認識せず、その間の配列に関わりなく転移を触媒する。このため、TIR を残してトランスポゾンの中央部をマーカー遺伝子やポリ A シグナル、スプライシングのドナー・アクセプター配列などに入れ替え、トランスポザナーゼを別のところから供給することで目的の遺伝子を転移させることができる。例えば、TIR 側をプラスミド DNA として、トランスポザナーゼの mRNA とともに胚に注射する手法は一般的である。また、TIR とトランスポザナーゼを別々の個体に導入し、交配させることで転移させる手法は、煩わしい注射作業から開放されるためによく用いられている。この際、TIR を持つが単独では転移不可能な系統を *mutator* (変異する者)、トランスポザナーゼを持つ系統を *jumpstarter* (跳躍を始める者) と呼んでいる。*Sleeping Beauty* でもこの系が開発されている。

Collierらと Dupuyらは、まず、転移させる TIR には含まれた配列として、スプライシングのアクセプター、ドナー配列、ポリ A シグナルとともに MSCV (Murine stem cell virus) の LTR を挿入した。MSCV の LTR には強力なプロモーター活性があり、周辺の遺伝子が幹細胞で効率よく転写されることが期待される。これは、幹細胞での突然変異がガン化に大きく寄与しているという知識に基づいた戦略である。また、遺伝子の正方向、逆方向どちら向きに挿入されても遺伝子発現の異常を引き起こすように工夫されている。この一式が含まれたプラスミドをマウスの胚に注射し、いくつものが連なった形でゲノム中に組み込んだ。この組み込みは、効率は悪いがプラスミドを線状にするとゲノム中に挿入されることがあることを利用したもので、トランスポザナーゼによるものではない。このような場合、プラスミドはタンデムにつながった形で一箇所に組み込まれやすい。その中から、コピー数が多く、メチル化の程度が少ない系統を選んで以降の実験に使用している。DNA トランスポゾンは Cut&Paste 型 (切り出し→挿入) の転移を行なうので供給源となるプラスミド由来のトランスポゾンが多い方がより転移頻度が上昇するはずである。また、MSCV のプロモータ

一はメチル化によってサイレンシングされるため、メチル化の程度が低い方が転移後の転写活性が高くなると考えられる。Collier らは、jumpstarter として、Dupuy らが以前作成した、恒常的なプロモーター-CAGGS プロモーターの下流にトランスポザーゼがつながったものが組み込まれたマウスの系統をそのまま使用した。一方、Dupuy らはマウスの発生段階に因らず全組織で満遍なく発現している Rosa26 座位に相同組換えによってトランスポザーゼを組み込んだ。どちらも全細胞でトランスポザーゼが発現することが期待できる。ただし、Dupuy らは 4 箇所のアミノ酸置換により活性が従来のものよりも上昇したトランスポザーゼを使用した。これが Dupuy らの実験では、ノックアウトマウスでなくても高頻度にガンを誘発できた理由だろう。

それぞれを組み込んだ系統を交配させるとトランスポザーゼが供給されて転移が起こるはずである。実際、発生が進むにつれて変異が誘発され死亡するため、両方を持っている個体の割合が低下した。サザンハイブリダイゼーションや PCR による解析から、組み込まれた配列から TIR にはさまれた領域が抜け出し、別の位置に転移していることがわかった。他の DNA トランスポゾンと同様に *Sleeping Beauty* も初めに組み込まれている位置の近傍に転移することが多いと報告されていたが、今回はそのような傾向は認められず、Dupuy らはこれは転移が複数回起こっているためだと推測している。

転移は発生段階のみならず成長後も起こっており、Dupuy らの実験では全個体がガンで死亡した。ガン細胞におけるトランスポゾンの挿入位置を解析すると期待通り既知のガン遺伝子やガン抑制遺伝子に挿入されているものが見つかった。異なるガン細胞で同じ遺伝子に挿入されている例も見られた。Collier らの実験でも Dupuy らの実験でも、複数のトランスポゾンが転移しているため、どの遺伝子への挿入がガンに寄与しているのかを決定することは難しい。このため、ランダムな挿入と比較してガン細胞での挿入が有意に多いかどうかを統計的に検定している。サンプル数が少なければ複数回独立にトランスポゾンが挿入されている遺伝子もガンに関与している可能性が高い。1 コピーのトランスポゾンだけを転移させることができればより直接的にガンに関連する遺伝子を同定することが可能なはずだが、複数の遺伝子の異常によって引き起こされるガンのような疾患の場合には、彼らの手法が妥当なのかもしれない。

ところで、鱗翅目昆虫である蛾の一種 *Trichoplusia ni* から採られた DNA トランスポゾン *piggyBac* は例外的に幅広い生物で転移することが確認されている。*piggyBac* は双翅目昆虫キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* や鞘翅目昆虫コクヌストモドキ *Tribolium castaneum* などの昆虫の他、プラナリア *Girardia tigrina* でも転移することが報告されている。Ding らの研究により、この *piggyBac* の転移可能な生物は哺乳類にまで広がった (Ding et al. 2005)。Ding らは *piggyBac*

の TIR の間に薬剤耐性マーカーを挿入したプラスミドと、トランスポザーゼを乗せたプラスミドと一緒にトランスフェクションし、ヒトの細胞株 293 細胞とマウスの ES 細胞で転移させることに成功した。Ding らは続けて、jumpstarter と mutator を作成し、トランスポザーゼを生殖細胞の分化の際に発現する protamine1 のプロモーターの制御下においた系統と、TIR の間に赤色蛍光蛋白質 RFP 遺伝子を組み込んだトランスポゾン系統を作成し、転移が起こることを確認している。彼らの系の特長は、TIR の間に長い配列を挿入しても効率よく転移する点である。DNA トランスポゾンのトランスポザーゼは自身の両末端を認識するために最適化されており、TIR の間に長い配列が挟まれると転移頻度が低下する。*Sleeping Beauty* の場合、ヒトの HeLa 細胞では、本来の 1.7kb から 1kb 長くなるたびに 30%程度転移効率が落ちることが報告されている。実際、Dupuy らも転移させる配列の長さを短くする努力をしている。*piggyBac* の本来の長さは 2472bp であるが、9.1kb 程度までならあまり効率を落とさずに転移させることができることがわかった。これは長い配列を挿入したトランスジェニック系統を作りたい場合に有利な性質である。また、各染色体に満遍なく転移することも示している。

Ding らの研究は *piggyBac* が哺乳類においてもトランスジェネシスや Insertional mutagenesis に有用であることを証明した研究であるが、まだまだツールとしては不十分な印象がある。最初に述べたようにトランスジェネシスと Insertional mutagenesis には全く異なる性質が要求されるが、Ding らは両方への応用の可能性を調べている。一方、Collier らや Dupuy らは Insertional mutagenesis に絞って手法を改良している。開発が進むにつれてそれぞれの目的に適った系が作られるのは自然な流れであるが、同時にトランスポゾン本来の性質による制約も理解しておく必要がある。いろいろな位置に挿入されて変異を引き起こす Insertional mutagenesis に適したトランスポゾンは安全な遺伝子治療への応用は困難である。このような点からも様々な特徴を持ったトランスポゾンの転移系が構築されることが幅広い応用のためには重要である。

Ivics Z, Hackett PB, Plasterk RH, Izsvak Z.

Molecular reconstruction of *Sleeping Beauty*, a Tc1-like transposon from fish, and its transposition in human cells.

Cell. 1997 Nov 14;91(4):501-10.

Collier LS, Carlson CM, Ravimohan S, Dupuy AJ, Largaespada DA.

Cancer gene discovery in solid tumours using transposon-based somatic mutagenesis in the mouse.

Nature. 2005 Jul 14;436(7048):272-6.

Dupuy AJ, Akagi K, Largaespada DA, Copeland NG, Jenkins NA.

Mammalian mutagenesis using a highly mobile somatic *Sleeping Beauty* transposon system.

Nature. 2005 Jul 14;436(7048):221-6.

Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T.

Efficient transposition of the *piggyBac* (PB) transposon in mammalian cells and mice.

Cell. 2005 Aug 12;122(3):473-83.

2006/01/06

小島 健司 著

禁 無断複写転載