

マウス ES 細胞中の非発現遺伝子のみを標的にした
挿入型変異導入法の開発

白 潔

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科

(推薦教員 石田 靖雅 准教授)

2020 年 9 月 18 日提出

目次

1. 序論

1-1. マウス・ゲノム科学における世界的潮流.....	4
1-2. 従来の遺伝子トラップでは非発現遺伝子をカバーできない.....	4
1-3. KOMP では、トラップできない遺伝子を厳選し、個別にターゲットした.....	6
1-4. 研究目的.....	6
1-5. 本研究で明らかになったこと及び意義.....	7

2. 材料と方法

2-1. DTrap ベクターの構築.....	8
2-2. プラスミド DNA の調製法.....	9
2-3. ES 細胞の培養.....	9
2-4. ES 細胞へのトランスフェクション.....	10
2-5. G418 薬剤選択.....	11
2-6. コロニーピックアップ.....	11
2-7. ES 細胞クローンの凍結保存.....	11
2-8. RNA 抽出用、ゲノム DNA 抽出用の ES 細胞の培養.....	11
2-9. RNA 抽出.....	12
2-10. ゲノム DNA 抽出.....	12
2-11. 標的細胞のゲノムに挿入されたベクター数と ID 番号の解析.....	12
2-12. シークエンスの解読.....	13
2-13. Splinkerette PCR.....	13
2-14. データベースを用いた遺伝子の同定.....	14
2-15. データベースを用いた遺伝子発現の予測.....	14
2-16. Quantitative real-time PCR による遺伝子発現の解析.....	15
2-17. トラップベクター内の欠損検出および挿入パターンの確認.....	15
2-18. 発現遺伝子をトラップした dDT176 ベクターの欠損確認.....	16

2-19. FLP ₀ による部位特異的組換え反応.....	17
2-20. ES 細胞とフィーダー細胞の分離.....	18
2-21. <i>In vitro</i> における分化誘導.....	19
2-22. Oil red O 染色.....	20
2-23. 変異体マウスの作製.....	20
3. 結果	
3-1. DTrap ベクターを用いた遺伝子トラップ.....	21
3-2. DTrap ベクターによる遺伝子トラップで得られる薬剤耐性コロニー数は少ない.....	21
3-3. DTrap 法により樹立した ES 細胞クローンの大半は、DTrap ベクターがシングルコピーで挿入されている.....	22
3-4. 「Reverse」クローンを負に選択するための double DTrap 戦略.....	22
3-5. 弱毒化 dDT176 ベクターは ES 細胞中の非発現/弱発現遺伝子を高効率にトラップする.....	23
3-6. Wild-type DTrap ベクター内の欠損は高頻度で発生する.....	24
3-7. 発現遺伝子をトラップした dDT176 ベクターは高頻度で欠損が発生する.....	25
3-8. DTrap ベクターの FLP ₀ 部位特異的な組換えが高効率で引き起こされる.....	25
3-9. Cell lineage ablation および Cell lineage labeling.....	25
4. 考察	
4-1. DTrap 法の開発によって達成できたこと.....	27
4-2. DTrap 法に関連して考慮すべき点.....	27
4-3. Cell lineage ablation 実験や cell lineage labeling 実験への応用.....	28
4-4. ES 細胞の未分化性に対する DT の悪影響について.....	29
5. 謝辞	29
6. 参考文献	30
7. 図と表	33

1. 序論

1-1. マウス・ゲノム科学における世界的潮流

主要生物のゲノム配列が解読された今、生命科学の焦点はゲノムの機能解析へと移行した。2004年にポストゲノムシーケンス時代を象徴する国際的な共同研究計画「The knockout mouse project」(KOMP)が発表され、マウスES細胞中の全てのタンパク質コード遺伝子を破壊することが提案された。遺伝子が破壊された変異体ES細胞株から作製したノックアウトマウスの解析により、ゲノム上の全遺伝子の機能解明が可能になると期待された。そこでは、より迅速かつ網羅的な変異体作製の技術である「遺伝子トラップ」の手法を採用し、短期間のうちにES細胞中でできるだけ多数の遺伝子を破壊することが提唱された(Austin et al., 2004)。しかし、従来の遺伝子トラップ法では、標的細胞中の非発現/弱発現遺伝子を破壊することが難しいという大きな欠点が存在するため、これらの遺伝子は遺伝子ターゲティングにより個別に変異を導入することが計画された(Skarnes et al., 2011)。

1-2. 従来の遺伝子トラップでは非発現遺伝子をカバーできない

遺伝子トラップ法は、薬剤耐性遺伝子を含むDNA断片であるトラップベクターをゲノムに挿入させることにより、ランダムに挿入変異を引き起こす手法である(Zambrowicz et al., 1997; Stanford et al., 2001)。トラップベクターが内在性遺伝子領域に挿入されると、ベクター内のポリA付加シグナルの働きにより、その遺伝子の転写が中断され、正常な遺伝子機能が破壊される。トラップベクターに薬剤耐性遺伝子が組み込まれているため、薬剤耐性クローンをスクリーニングすることによって変異体を効率的に単離することができる。さらに、トラップベクターの配列を指標として、破壊された遺伝子を迅速に同定することが可能である。

トラップベクターの基本構造の違いによって、遺伝子トラップ法はプロモータートラップとポリAトラップに分かれる(Friedel and Soriano, 2010)。プロモータートラップのベクターは、プロモーターを持たない薬剤耐性遺伝子を選択マーカーとして使用している。転写が活性化状態にある遺伝子内にベクターが挿入された場合のみ標的細胞が薬剤耐性を示し、ベクター内のポリA付加シグナルの働きによって遺伝子機能が破壊されるように設計されている(Figure 1a) (Gossler et al., 1989; Hansen et al., 2003; Zambrowicz et al., 2003; Chen et al., 2004)。プロモータートラップは、有効性が確立されている手法として既に多くの研究に応用されているものの、内在性遺伝子のプロモーター活性に依存するため、標的細胞中の非発現/弱発現遺伝子をトラップすることができないという大きな欠点を有している(Stanford et al., 2001)。一方、このようなプロ

モータートラップの欠点を克服するために開発されたポリ A トラップでは、ベクター内に薬剤耐性遺伝子のための恒常的なプロモーターが存在するため、標的細胞中での転写活性に影響されず遺伝子をトラップできるという利点がある。トラップされた内在性遺伝子のポリ A 付加シグナルの働きにより、選択マーカーneo の mRNA が安定化され、遺伝子機能が破壊される(Figure 1b) (Niwa et al., 1993; Zambrowicz et al., 1998; Ishida and Leder, 1999; Matsuda et al., 2004)。しかし、ポリ A トラップには、ベクターの挿入部位に致命的な偏りが生じるため、遺伝子機能が完全に破壊されない可能性が高くなるという非常に大きな欠点が存在する。この欠点は、nonsense-mediated mRNA decay (NMD)という mRNA の品質管理機構と深く関連していることが知られている(Shigeoka et al., 2005)。

ポリ A トラップ法を改良することにより、挿入部位の偏りを解消した遺伝子トラップ法 UPATrap が開発された(Shigeoka et al., 2005)。2007 年から本格的にスタートした KOMP において、UPATrap はカナダの The Centre for Modeling Human Disease (CMHD) チームによって活用され、計画の推進に重要な役割を果たした。KOMP 全体では、これまでにランダムな遺伝子トラップによって約 13 万株の変異導入 ES 細胞クローンが産出された。しかしながら、マウス ES 細胞中で恒常的に発現するタンパク質コード遺伝子の約 80.8%が既にトラップされているのに対し、非発現遺伝子に占めるトラップされたものの割合は、僅か 21.8%に過ぎないことが判明した(Mayasari et al., 2012)。

UPATrap ベクターの変異体作製効率を向上させるために、異なるタグで標識された UPATrap-*Tol2* トランスポゾン・ミクスチャー(pTMat-01~15、TMat と略す) へのバージョンアップが行われた(Mayasari et al., 2012)。従来の UPATrap ベクターはレトロウイルス型の骨格を使用しており、ベクターが恒常的に発現する遺伝子に偏って挿入される強い傾向があった。さらに、ベクター内で欠失や組換えが非常に高頻度で発生することが見出された。TMat ベクターでは、UPATrap ベクターの骨格をカット&ペースト型 DNA トランスポゾン *Tol2* に切り替えることにより、前述した問題点が解消された。また、複数コピーでゲノム中に挿入されるという *Tol2* 型トランスポゾンベクターの唯一の欠点は、異なるタグで標識された 15 種類の *Tol2* トランスポゾンを混合して遺伝子トラップ実験に応用することにより完全に解消された。従来型 UPATrap ベクターに比べ、TMat ベクター場合には、ES 細胞中の非発現遺伝子をトラップする効率が倍増し、より広範囲の遺伝子群を条件的に破壊できる。しかしながら、非発現遺伝子領域への挿入はやはり完全に確率に依存するため、選択的に標的細胞中で非発現/弱発現遺伝子を破壊することは難しいと考えられる。

1-3. KOMP では、トラップできない遺伝子を厳選し、個別にターゲットした

従来の遺伝子トラップ法で破壊できなかったタンパク質コード遺伝子（主として非発現遺伝子から成る）に関しては、約 8,500 個を厳選した上で、KOMP のもとで遺伝子ターゲティング法による個別破壊が大規模に実施された。相同組換えによる特定遺伝子を破壊するターゲティング法は広く用いられているが、一つの遺伝子を破壊するのに大変な時間と労力を要することも知られている(Thomas and Capecchi, 1987)。さらに、挿入型変異導入の対象細胞は、マウス ES 細胞からヒト iPS 細胞、ヒト腫瘍細胞等へと急速に拡大しつつあるため、新種の標的細胞が出現するたびに、時間と労力を要する遺伝子ターゲティングに依存した大規模プロジェクトを立ち上げることは、非現実的であると言わざるを得ない。

1-4. 研究目的 (マウス ES 細胞中の非発現遺伝子のみを標的にした変異型導入法の開発)

ジフテリア毒素(DT)はジフテリア菌(*Corynebacterium diphtheria*)が合成し、菌体外へ分泌するタンパク質毒素である。ジフテリア毒素の分子量は約 58,000 であり、A フラグメントと B フラグメントの二つのドメインからなる。C 末端側の B フラグメントは細胞表面に存在するレセプターと結合し、レセプターを介したエンドサイトーシスにより A フラグメントが細胞内に取り込まれる。A フラグメントは細胞内でペプチド鎖伸長因子 elongation factor-2 (EF-2) を ADP リボシル化して不活性化し、タンパク質合成を阻害して細胞を死に至らしめるため、ターゲティングベクターを作製する際にネガティブ選択マーカーとしてよく用いられている(Honjo et al., 1968; Kohno et al., 1986; Yagi et al., 1993)。

本研究では、DT の細胞殺傷能力による「負の選択」に基づく新しい遺伝子トラップ法 DTrap を確立し、マウス ES 細胞中の非発現遺伝子（組織特異的遺伝子）のみを対象にしたランダムかつ高効率な挿入型変異導入を可能にすることを目指す。DTrap 法で作製された ES 細胞クローンを利用すれば、トラップした組織特異的遺伝子のプロモーターの支配下に DT や EGFP などを発現させることが可能になり、培養細胞やマウス個体のレベルで cell lineage ablation 実験や cell lineage labeling 実験を遂行することが容易になると期待される。最終的には、マウスの交配により変異アリルをホモ接合化したノックアウトマウスを作製し、トラップした組織特異的遺伝子の機能を動物個体のレベルで解明する。

1-5. 本研究で明らかになったこと及び意義

本研究では、弱毒化した DT を遺伝子トラップに応用することにより、従来の手法で破壊が困難であったマウス ES 細胞中の非発現/弱発現遺伝子を非常に効率よく破壊でき、良質の ES 細胞変異体を作製できることが分かった。さらに、DTrap 法により作製した組織特異的に発現する遺伝子の変異体を活用すれば、in vitro 及び in vivo における cell lineage ablation および labeling 実験が可能になることが確認できた。

本研究で開発された DTrap 法により、これまでに破壊が困難であった ES 細胞中の非発現遺伝子に関する変異体を極めて高効率に作製できるようになり、挿入性変異導入法による遺伝子機能の解析がさらに大きく促進されることが期待できる。

2. 材料と方法

2-1. DTrapベクターの構築

2-1-1. Wild-type DT (sDT) ベクター

DTrapベクターのバックボーンには、日本産メダカ由来のDNA型*Tol2*トランスポゾンを用いている。Wild-type (WT) DTベクターの構造として、上流から順にプロモーターを持たないDT遺伝子部位、EGFP遺伝子部位と薬剤耐性遺伝子部位（ポリAトラップ部位）の三つの発現ユニットが存在する(Figure 2a)。DT遺伝子部位は、pDTA-1プラスミドDNA（河野憲二博士により供与）から切り出したDTフラグメントA (*Xba*I/*Sma*I断片) を用いて構築した。また、各発現ユニットの間に動物細胞のために最適化されたFLPo組換え酵素の認識配列*FRT*もしくは*F3*が配置されている。

2-1-2. WT double-DT (dDT) ベクターの構築

WT sDTベクターから得られた*Sal*I-*Nhe*I断片 (DT-Aカセット、1894 bp) blunt ending 処理後、WT sDTベクターの薬剤耐性遺伝子の下流 (*Zra*Iサイト) に挿入した。このプラスミドでDH5 α コンピテントセルをtransformし、精製したプラスミドDNAを制限酵素処理 (*Bgl*IIIと*Bam*HI) およびsequencing PCRを行うことにより、第二のDT-Aカセットがシングルコピーで逆向きに挿入されているものを選び出し、dDTベクターとした(Figure 2b)。

2-1-3. 弱毒化DT (sDT176) ベクターの構築

弱毒化DT176を構築するために、WT sDTベクターのDTカセットに一塩基置換（グアニンがアデニンにかわる）を導入した(Figure 2a)。DTタンパク質は128番目のグリシンがアスパラギン酸に置換されることにより、酵素活性が約1/30に減弱される。具体的には、pCRM176プラスミドDNA（河野憲二博士により供与）からtox 176弱毒化DT-Aカセット(*Bst*Z17I-*Blp*I断片)を切り出し、WT DTベクターのDTカセット上の*Bst*Z17I-*Blp*I領域と入れ替えることによって構築した。

2-1-4. 弱毒化dDT (dDT176) ベクターの構築

sDT176ベクターから得られた弱毒化DT-Aカセット (*Sal*I-*Nhe*I断片) をblunt ending 処理後、sDT176ベクターの薬剤耐性遺伝子の下流 (*Zra*Iサイト) に挿入した。項目「2-1-2.」同様に、第二の弱毒化DT-Aカセットがシングルコピーで逆向きに挿入されているものを選び出し、dDT176ベクターとした (Figure 2b)。

2-1-5. 異なるタグで標的されたDTrapベクターのミクスチャー化

単一細胞のゲノム中に多数のベクターが挿入された場合でも、ベクターを容易に識別できるように、上記四つのDTrapベクター (sDT、dDT、sDT176、dDT176) のそれぞれに対し、ベクター内の最も下流 (XhoI-NotIサイト) に認識タグ (#01-#15) を挿入した。タグ配列のすぐ上流と下流に、それぞれsplinkerette PCRのための合成配列SPLとTermが配置されており、配列中に潜在的なスプライス・アクセプター、スプライス・ドナー、ポリA付加シグナル配列が存在しないことが確認されている。異なるタグで標識された15種類のベクターを混合し、*Tol2*トランスポゾンミクスチャー (sDT、dDT、sDT176、dDT176と略す) として遺伝子トラップ実験に用いた (Figure 2a, 2b, Supplementary Figure 2)。

2-1-6. 遺伝子トラップコントロールベクターTMat (non-DTベクター)

DTカセットを持たないコンディショナル型UPATrapトランスポゾンミクスチャーTMatを解析コントロールベクター (non-DT) として用いた (Figure 2c)。

2-2. プラスミドDNAの調製法

Mini prepはQIAprep Miniprep (QIAGEN) を使い、付属のプロトコールに従って行った。Large prepはアルカリ抽出法で行った。アガロースゲルから切り出したDNA断片およびPCR産物の精製は、Wizard SV Gel and PCR clean-up system (Promega) を用いて付属のプロトコールに従って行った。

2-3. ES細胞の培養

ES細胞はC57BL/6Jと129S6/Sv^{Jae}のF1由来のV6.4 (You et al., 1998) とC57BL/6Jと129S6/SvEvTacのF1由来のKY1.1 (Yusa et al., 2009) の2系統を使用した。フィーダー細胞にはマウスのleukemia inhibitory factor (LIF) を恒常的に分泌し、puromycinとG418の両者に耐性を示すSTO細胞 (SLPN細胞) を用いた。ES細胞を培養するためのフィーダー細胞として、マイトマイシンC処理後のSLPNを使用した (以下MSLPNと記述)。MSLPN細胞はSTO培地で培養し、10 µg/mlのマイトマイシンCで2時間半処理した。ES細胞はMSLPNフィーダー上において、37°C、5% CO₂の条件下でES培地を用いて培養した。

[STO培地の組成]

	Final concentration
Dulbecco's modified eagle medium (D-MEM, GIBCO)	
Fetal bovine serum (Thermo)	7%
Penicillin-streptomycin (GIBCO)	50/50 U
L-glutamine (GIBCO)	2 mM

[ES培地の組成]

	Final concentration
D-MEM (Sigma)	
Fetal bovine serum (Thermo)	15%
Penicillin-streptomycin (GIBCO)	50/50 U
2-mercaptethanol (Wako)	0.1 mM
Non-essential amino acids (GIBCO)	0.1 mM
L-glutamine (GIBCO)	2 mM

2-4. ES細胞へのトランスフェクション

遺伝子トラップベクターはリポフェクション法 (TransFast Transfection Reagent、Promega) を用いてES細胞に導入した。DTrapベクター0.125 μg とトランスポゼース (pCAGGS-TP) 1.25 μg にTransFast試薬15 μl を加え、さらにノックアウト培地を加えて全量を250 μl とした。この混合液を室温で15分間インキュベートした後、ノックアウト培地で 1×10^6 cells/mlに調製したES細胞を250 μl 加えた。攪拌後、24 well-plateで培養されたMSLPNフィーダー細胞上に加え、37°C、5% CO₂で1時間インキュベートした。1 mlのノックアウト培地を追加し、さらに3時間インキュベートした後に1 mlのノックアウト培地に交換した。24時間後に希釈して10 cm dish上で培養し、さらにその翌日からG418薬剤選択を開始した。コントロールであるnon-DTベクターのES細胞へのトランスフェクションは、ベクター0.0625 μg とトランスポゼース0.625 μg を使用し、上記方法で行った。

[ノックアウト培地の組成]

	Final concentration
Knockout D-MEM (GIBCO)	
Fetal bovine serum (Thermo)	15%
Penicillin-streptomycin (GIBCO)	50/50 U
2-mercaptoethanol (Wako)	0.1 mM
Non-essential amino acids (GIBCO)	0.1 mM
L-glutamine (GIBCO)	2 mM

2-5. G418薬剤選択

トランスフェクションを行ったES細胞は、200 µg/mlのG418 (Nacalai tasque) を含むノックアウト培地で、コロニーが確認できるまで10-13日間培養した。

2-6. コロニーピックアップ

10 cm dish中の培地をPBSに交換し、分化傾向の少ないコロニーを選んで単離した。単離したコロニーを30 µlのTrypsin/EDTA (0.25%、GIBCO) で37°C、5% CO₂で13分間処理した。これにES細胞培地を170 µl加え、ピペッティングで細胞を懸濁した後、12 well-plateに培養されたMSLPNフィーダー細胞上に播き、37°C、5% CO₂条件下で培養した。

2-7. ES細胞クローンの凍結保存

12 well-plate上で培養したES細胞をPBSで2回洗浄し、200 µlのTrypsin/EDTAを加えて37°C、5% CO₂条件下で13分間処理した。ES培地800 µlを加え、ピペッティングで細胞を懸濁した後、500 µlを凍結培地 (20% FBS、20% DMSO) 500 µlが入っている凍結チューブに加えて凍結保存した。

2-8. RNA抽出用、ゲノムDNA抽出用のES細胞の培養

ESクローンの凍結保存で残った細胞懸濁液500 µlに、ES培地500 µlを加えた後、中からRNA抽出用として700 µlをゼラチンコーティングした6 well-plate上に播き、DNA抽出用として300 µlをゼラチンコーティングした12 well-plate上に播いて培養した。

2-9. RNA抽出

RNA抽出用として培養した6 well-plate上のES細胞をPBSで2回洗浄し、Sepasol RNA I (Nacalai tasque) 500 μ lを加え、ピペッティングで十分に懸濁させた後、懸濁液をエッペンチューブに移した。クロロホルム200 μ lを加えて転倒混合し、室温で3分間静置した。4°C、15000 rpmで15分間遠心分離した後、上清400 μ lを新しいエッペンチューブに移した。100%エタノール1000 μ lを加え、転倒混合し、氷上で8分静置した後、4°C、15000 rpmで10分間遠心分離を行った。上清を捨て、ペレットを70%エタノールで洗浄した。RNAペレットをRNase-free水15 μ lで溶解し、-80°Cで保存した。

qRT-PCRに使用する野生型ES細胞KY1.1のRNA抽出は、RNeasy Mini Kit (QIAGEN)を用い、付属のプロトコールに従って行った。DNase 処理 (Cloned DNase I, TAKARA)したRNAを-80°Cで保存した。

2-10. ゲノムDNA抽出

ゲノムDNAの抽出は、Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) もしくはフェノール/クロロホルム法を用いて行った。Wizard Genomic DNA Purification Kitによる抽出は、付属のプロトコールに従って行った。フェノール/クロロホルム法による抽出は下記の手順で行った。12 well-plate上のES細胞をPBSで2回洗浄し、100 μ g/mlのProteinase Kと1%のSDSを含む細胞溶解液500 μ lを加え、55°Cでオーバーナイト処理した。この細胞溶解液をエッペンチューブに移し、RNase (10 mg/ml) を1 μ l加え、37°C、1時間インキュベートした。次に、500 μ lのフェノールを加え、15分間振倒し、室温、15000 rpmで10分間遠心分離を行った。上清400 μ lを新しいエッペンチューブに移し、さらに等量のフェノールクロロホルムを加え、15分間振倒し、室温、15000 rpmで10分間遠心分離を行った。上清200 μ lを新しいエッペンチューブに移し、500 μ lのエタノールを加えて混合した後、4°C、15000 rpmで10分間遠心分離を行った。上清を除いた後、DNAペレットを70%エタノールで洗浄し、50 μ lの滅菌水で溶解し、4°Cで保存した。

2-11. 標的細胞のゲノムに挿入されたベクター数とID番号の解析

ゲノムに挿入されたベクター数とタグのID番号の解析は、ES細胞クローンから抽出したゲノムDNAをテンプレートとし、Phusion Hot Start High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific) を用いてPCRを行った。sDTとsDT176クローンにはプライマーNew-RACE-0.9とR-termを使用した。dDTとdDT176クローンにはプライマーBcl2-RとR-termを使用した(Supplementary Figure 2、青い矢印)。反応条件は、(i) 98°C、

30 sec、(ii) 30 × (98°C, 10 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 30 sec)、(iii) 72°C, 5 minで行った。塩基配列の解読はプライマーRS-F4 (sDT/sDT176クローン) またはIntron-F3-F (dDT/dDT176 クローン) を使用し、「2-12. シークエンスの解読」で示す手順で行った(Supplementary Figure 2、赤い矢印)。各プライマーの配列は下記に示す。

NEW-RACE-0.9: 5'-ACGCCATGGCCAATCGCATCATGGATTCCATC-3'

Bcl2-R: 5'-AGGCCGCATGCTGGGGCCTTACAGTTCCACAAAG-3'

R-term: 5'-GATCCTTTATCGCAATGGATGCGATGATCC-3'

RS-F4: 5'-TTGACCCGACTGATGGTTCCCATTAGTCA-3'

Intron-F3-F: 5'-ACGTGCCAGCCATCTTAGAGATACAGCACG-3'

2-12. シークエンスの解読

PCR産物をExoSAP-IT (USB)で精製した後、Big Dye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (ABI)を使用し、付属のプロトコールに従ってサイクルシークエンス反応を行った。PCR条件は、(i) 96°C, 2 min、(ii) 25 × (94°C, 20 sec; 50°C, 15 sec; 60°C, 4 min)で行った。反応産物は、Big Dye XTerminator精製キット(ABI)を使用し、付属のプロトコールに従って精製した後、ABI 3130 Genetic Analyzer (ABI)により解析した。

2-13. Splinkerette PCR

Splinkerette PCR を行うことにより、マウスのゲノムに挿入されたベクターの位置を同定する。トラップベクターが1コピーで挿入されているクローンのみをこの解析に用いた。まず、Splinkerette PCR に使うヘアピン構造アダプターは、オリゴSAD-Sb/SAD-L (HaeIII 用) またはSAD-Stm/SAD-L (TaqI、MspI 用) のannealingにより作製した。次に、ES細胞から抽出したゲノムDNAを制限酵素(HaeIII、TaqI、MspIのいずれか)で切断した。酵素を失活させた後、T4 DNA Ligase (TAKARA)を用い、制限酵素切断部位とヘアピン構造のアダプター配列を結合させた(Supplementary Figure 3)。65°C、10分間インキュベートすることにより結合反応を止めた後、結合反応液から1 µlのDNA溶液を1st PCRテンプレートとして用いた。10倍希釈した1st PCR産物を2nd PCRテンプレートとして用いた。PCRはKOD-FX polymerase (TOYOBO)を用いて行い、反応条件は、(i) 94°C, 2 min、(ii) 30 × (94°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 2 min)、(iii) 72°C, 7 minで行った。Splinkerette PCRに用いたオリゴとプライマーは下記に示す。一部の2nd PCR産物を用いてアガロース電気泳動によって増幅を

確認し、残りの 2nd PCR 産物は ExoSAP-IT (USB)を用いて精製した。Sequencing PCR は項目「2-12. シークエンスの解読」で示す手順で行った。

アダプター合成用オリゴ

SAD-Sb: 5'-GGAGTAGTGACGAGTCTTTTTTTGCAAAAA-3'

SAD-Stm: 5'-CGGGAGTAGTGACGAGTCTTTTTTTGCAAAAA-3'

SAD-L: 5'-CTTCCGTCACCAAAGCATCGTCAACTGAATCAGACTTCGCTCA
GCACACCGACTCGTCACTACTCC-3'

1st PCR プライマー

SPR-1: 5'-CTTCCGTCACCAAAGCATCGTCAAC-3'

SPL-1: 5'-CATGCATCATATCCATCGCAATCGCATCC-3'

2nd PCR プライマー

SPR-2: 5'-TGAATCAGACTTCGCTCAGCACACC-3'

SPL-2m: 5'-CCATTCAATTCACATCGCATATCCGATGCC-3'

Sequencing PCR プライマー

F-term: 5'-GGATCATCGCATCCATTGCGATAAAGG-3'

2-14. データベースを用いた遺伝子の同定

遺伝子トラップによって得られた遺伝子の同定とベクターの挿入部位の解析は、UCSC (University of California Santa Cruz)のマウスゲノムデータベースを利用した (<http://genome.ucsc.edu/>)。シーケンシングで得られた配列を検索にかけ、accession number、gene identity (gene symbol)、chromosome、トラップされたエクソンの数、挿入されたトラップベクターの向き等の情報に基づいて解析した。

2-15. データベースを用いた遺伝子発現の予測

公共データベースNational Center for Biotechnology Information (NCBI) で公開されている7つのexpressed sequence tag (EST) ライブラリー (#1882、#2512、#10023、#14556、#15703、#17907、#21037) (Table 1)に登録されているマウス未分化ES細胞の mRNA発現情報のほか、C57BL/6と129/SVのF1由来のV6.5未分化ES細胞におけるRNA-Seq解析(GSM521650)のread per kilobase of exon per million mapped sequence reads(RPKM)値を利用し、DTrapベクターによってトラップされた遺伝子の発現予測を行った。

2-16. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) による遺伝子発現の解析

V6.4 ES細胞から抽出したtotal RNAを用いてqRT-PCRによる発現量測定を行った。Total RNAの抽出はRNeasy Plus Mini kit (QIAGEN)を使用した。cDNA合成はSuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen)とoligo (dT) 20プライマーまたはrandom hexamersを使用し、付属のプロトコールに従って行った。両方のプライマーで合成したcDNAを混合してqRT-PCRのテンプレートとして使用した。qRT-PCRはThunderbird qPCR Mix (TOYOBO)を使用し、付属のプロトコールに従った。機材はLightCycler 96 System (Roche)を使用し、反応条件は、(i) 95°C, 60 sec、(ii) 40 × (95°C, 15 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 30 sec)で行った。*GAPDH*の発現量を内在性コントロールとし、比較定量法($\Delta\Delta C_t$ 法)により各遺伝子の発現レベルを評価した。ネガティブコントロールとして、未分化ES細胞で発現が認められていないinterleukin-2 (*IL-2*) 遺伝子を使用した。qRT-PCR解析に使用した内在性遺伝子情報および配列特異的なプライマー情報はTable 2に示す。

2-17. トラップベクター内の欠損検出および挿入パターンの確認

FLPo組換え候補クローンに対し、トラップベクター内に設計した下記のプライマーとKOD-FX polymerase (TOYOBO)を用いて欠損の有無を確認した(Figure 8)。ゲノムPCRの反応条件は、(i) 94°C, 3 min、(ii) 30 × (94°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 3 min)、(iii) 72°C, 5 minで行った。プライマー配列は下記で示す。

Amplified region 1

L200-F: 5'-TGGAGATCACTTGGGCCCCGGCTCGATCTC-3'

F3-R1: 5'-TTTGAAGAATAGGAACTTCGGCCGGAATGG-3'

Amplified region 2

F3-F1: 5'-CGCATCCATTCCGGCCGAAGTTCCTATTC-3'

EGFP-F: 5'-TGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCG-3'

Amplified region 3

RE-2: 5'-GACGTTGTGGCTGTTGTAGTTGTA-3'

RN-1: 5'-GGAGAACCTGCGTGCAATCCATCTTGTTTC-3'

Amplified region 4

RNApol2-F1: 5'-GGGCCTCTCCACTAATAACGCCTACTTCAA-3'

RACE-R: 5'-CGCATCGGAAATGGCATCGCATGGAATCCG-3'

Amplified region 5

NEW-RACE-1.8: 5'-GATGCGAATCGCATCCATGGATGCGCCAATC-3'

R-term: 5'-GATCCTTTATCGCAATGGATGCGATGATCC-3'

トラップベクターの挿入パターンの確認は、DTrapベクターの両端にあるL200とR175 (*ToI2*トランスポゾン配列) のすぐ外側(プラスミド配列側)にあるプライマー、およびベクター配列上のプライマーを用いてPCR反応を行った(Figure 13)。PCR Master Mix (Promega)による反応条件は (i) 94°C, 3 min、 (ii) 30 × (94°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 1 min)、 (iii) 72°C, 5 minで行った。プライマー配列は下記で示す。PCRのポジティブコントロールとして、dDTベクターのplasmid DNAを用いた。

Amplified region a

bac-XbaI: 5'-GGCTCTAGAACTAGTGGATCTGCTGG-3'

Bcl2-R: 5'-AGGCCGCATGCTGGGGCCTTACAGTTCCACAAAG-3'

Amplified region b

SPL-1: 5'-CATGCATCATATCCATCGCAATCGCATCC-3'

PL2R: 5'-CCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCAC-3'

2-18. 発現遺伝子をトラップしたdDT176ベクターの欠損確認

ゲノムPCR反応は前述した項目2-17と同様にKOD-FX polymeraseを用いて行った。ES細胞中の非発現/弱発現遺伝子をトラップした3クローン (TM13-006、TM13-030、TM26-004) をコントロールとして使用した。Figure 9に示すゲノム領域の増幅は下記に示すプライマーを使用した。

Amplified region 1

L200-F: 5'-TGGAGATCACTTGGGCCCGGCTCGATCTC-3'

Bcl2-R: 5'-AGGCCGCATGCTGGGGCCTTACAGTTCCACAAAG-3'

Amplified region 2

5FRT-F1: 5'-GAAGAATCAACAACATCATCAGCGCCCATG-3'

BCL 2SA-R: 5'-GAGGGGATGCATATTATTTCTACTGCTTTAGTG-3'

Amplified region 3

5FRT-F1: 5'-GAAGAATCAACAACATCATCAGCGCCCATG-3'

DT-F2: 5'-GAAGAATCAACAACATCATCAGCGCCC-3'

Amplified region 4

DT-F: 5'-GGGCGCTGATGATGTTGTTGATTCTTC-3'

F3-R1: 5'-TTTGAAGAATAGGAACTTCGGCCGGAATGG-3'

Amplified region a

(上流) 18-42 F1: 5'-CCTCAGAAGCTCTGGGATTGTCAGTAGTAG-3'

15-64 F1: 5'-TCAGGATATGCTGTGACTGCACCTTATCAG-3'

16-47 F2: 5'-TGTGTCTGAGGCCAAGATGGAATAGAGAAG-3'

16-56 F1: 5'-TCCTTGAACCTCTGATTCTTCTGTGTCTCC-3'

cryge F1: 5'-TGCCAACGCAGCAGACCTCCTGCTATATAG-3'

(下流) F3-R1: 5'-TTTGAAGAATAGGAACTTCGGCCGGAATGG-3'

Amplified region b

(上流) : 上記 Amplified region a と同様

EGFP-F: 5'-TGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCG-3'

2-19. FLP₀による部位特異的組換え反応

In vitroでトラップベクター内部を高頻度に反転と欠失を引き起こすため、高効率FLPo発現ベクター-pCAGGS-FLPo-IRES-Puro^r-poly(A) (F. Stewart博士から供与) を用いた。FLPo発現ベクターを2.5 µgにTransFast (Promega) 15 µlを加え、さらにノックアウト培地を加えて全量を250 µlとした。「2-4. ES細胞へのトランスフェクション」で記述した手法と同様にインキュベートした後、 1×10^6 cells/mlに調製したES細胞を250 µl加えて反応させてトランスフェクションを行った。24時間後、puromycin薬剤選択(Merck、1 µg/ml)を開始した。さらに48時間後、limiting dilutionを行い、ES細胞をMSLPNフィーダー細胞の播いた10 cm dish上でノックアウト培地を用いて6-8日間培養した。形成されたESコロニーから24-36個を単離、培養し、そのES細胞サブクローンの凍結保存、DNAおよびRNA抽出は前述した方法で行った。

部位特異的組換え反応が正確に引き起こされているかどうかを確認するために、トラップされたオリジナルDTクローンとEGFP発現クローンのそれぞれのゲノムDNAを用い、Figure 10で示す内在性遺伝子プライマーとベクター内プライマーによりゲノムPCRを行った。PCR反応はKOD-FX polymerase (TOYOBO) を用い、(i) 94°C, 3 min、(ii) 30 × (94°C, 30 sec; 60°C, 30 sec; 72°C, 3 min)、(iii) 72°C, 7 minで行った。使用したプライマー配列は下記に示す。

トラップベクター内のプライマー

BCL 2SA-R: 5'-GAGGGGATGCATATTATTTCTACTGCTTTAGTG-3'

SPL-1: 5'-CATGCATCATATCCATCGCAATCGCATCC-3'

RE-1: 5'-CAGGATGTTGCCGTCCTCCTTGAAGTC-3'

FE-2: 5'-CATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAG-3'

内在性遺伝子特異的なプライマー

Grap2-i1-2: 5'-CCATGAGACACCATAACCCGAACTGTCATCC-3'

Grap2-e2-1: 5'-CTTGAGCCACTCCTCCTGGTTGCTTAG-3'

Klhl10-e2-1: 5'-ACGTGAAGCAGGAGGACGCAGTATTCGAGG-3'

Klhl10-e3-1: 5'-TGTCTGCTCGAGCATCGTATGCCTCAATGG-3'

151-e3-1: 5'-CAGAAGTGCCACATCAAAGTACGCTCACC-3'

151-e4-1: 5'-CGTCACAGAATCTGTTGTCTGCATCCACC-3'

Ptpro-i2-F1: 5'-TGGACACGAAGGCGTCAGCAGATGAGTGAG-3'

Ptpro-i2-R2: 5'-TGTGTGGACTCCAGCGTGGCTGGCATCTGG-3'

Hmcn2-i1-1: 5'-GACTGGTGAAAGCTTATGACCTCAGCAGTC-3'

Hmcn2-e2-2: 5'-CACTCATACTCCAGCATCTCCAGCTTCC-3'

HS1-I9-F1: 5'-TTCCTTGTTTGTGTCTGCAGCTTCCAGTGG-3'

HS1-E10-R1: 5'-TTCTCGGCTC ATCTTTACCA CAGCCTTTCG-3'

274-i1-F1: 5'-CACGCTAGTCTCCTCTTGCCTGGAACAG-3'

274-i1-R1: 5'-CACAGGTACAGCTCCACATTCTCCACAC-3'

CLCF1-I2-F: 5'-GGCATTTCGTGCTCCTGCTCTCCTGTCCAGG-3'

CLCF1-I2-R: 5'-TGTGCCGAGTTCTAAGCATCTCCACATGC-3'

GJA-I1-F: 5'-GCTGCCACACCTTACAAATGTCAGTGAGTC-3'

GJA-I1-R: 5'-ATGACTGACCCAGGAGTATGATGCTCTGGA-3'

RIKEN-I2-F: 5'-TCACCGTGCAGCTGTTGAGAGCCTTCAGAC-3'

RIKEN-I2-R: 5'-AGAAGAGGGTGTGGATAACCCTGGGACTGG-3'

Cryge-E1-F1: 5'-TCAACAGCACTATCCCATCCGACCTGCC-3'

Cryge-E2-R1: 5'-GTCCTGAAACCCATCCACTGCTGGTAGTC-3'

2-20. ES細胞とフィーダー細胞の分離

ES細胞の未分化状態を維持するために、LIF産生型のMSLPNフィーダー細胞上でES細胞を培養する。ES細胞と同じく、フィーダー細胞もマウス由来であるため、ES細胞中でトラップされた遺伝子の大部分がフィーダー細胞中でも発現していると考え

えられる。遺伝子トラップで得られたESクローンにおける目的遺伝子の発現有無を調べる際に、RT-PCRに与える影響と減らすために、フィーダー細胞をできる限り除去する必要がある。また、分化誘導実験を行う際に、フィーダーが産生するLIFによる分化誘導への影響は、フィーダー除去によって最小限に抑えることが可能となる。

10 cm dish 上でほぼコンフルエントまで培養した ES 細胞を PBS で 2 回洗浄後、1 ml の Trypsin/EDTA で 37°C、13 分間処理した。9 ml の ES 培地を加え、しっかりピペッティングして細胞を分散させた後、ゼラチンコーティングした新しい 10 cm dish に ES 細胞を播いた。37°C、5% CO₂ の条件下で約 30 分間静置した。この間に、フィーダー細胞が ES 細胞よりも早く沈降する。浮遊している ES 細胞を含む上清を静かに回収し、ゼラチンコーティングした新しい 10 cm dish に ES 細胞を播いた。さらに 37°C、5% CO₂ の条件下で約 30 分間静置した後、上清を静かに回収して 50 ml チューブに移し、500g、4°C で 5 分間遠心した。上清を吸引除去後、ゲノム DNA 抽出または RNA 抽出に使用した。分化誘導に使う ES 細胞からより完全にフィーダー細胞を除去するために、上記の分離作業を行った ES 細胞を LIF 添加(CHEMICON、1000 U/ ml)の ES 培地に懸濁させ、ゼラチンコーティングした新しい 10 cm dish に ES 細胞を播き、さらに 1-2 日間培養後、フィーダー分離作業を繰り返した。

2-21. In vitroにおける分化誘導

脂肪細胞で特異的に発現する *perilipin-1* 遺伝子がトラップされたオリジナル DT クローンと EGFP 発現クローンに対し、in vitro で脂肪細胞への分化誘導実験を行った (Dani et al., 1997; Tashiro et al., 2009)。まず、hanging drop 法による embryoid bodies (EBs) の作製を行った。具体的には、フィーダー細胞から分離した未分化の ES 細胞を LIF 非含有の ES 培地に懸濁させ、1000 cells/drop (20 μ l) になるように、petri dish の蓋上で ES 細胞を二日間浮遊培養して EBs を形成させた (Day 0-2)。次に、1 μ M のレチノイン酸 (RA、Sigma) 添加の ES 培地で EBs を回収し、新しい petri dish に播き、二日間 RA による分化誘導を行った (Day 3-4)。RA 添加の ES 培地は毎日交換した。通常 ES 培地でさらに二日間浮遊培養を行った (Day 5-6) 後、EBs を誘導培地に懸濁させ、5-10 EBs/well になるように、ゼラチンコーティングした 12 well-plate に EBs を移して付着培養を開始した (Day 7-27)。誘導培地の交換は 1 日おきに行った。Day 15 と Day 23 に RNA 抽出および oil red O 染色を行った。

[誘導培地] (用時調製)

	Final concentration
通常ES培地	
Insulin (Sigma)	100 nM
Triiodothyronine (T3, Sigma)	2 nM
3-Isobutyl-1-methylxanthine (IBMX, Sigma)	0.1 mM
Dexamethasone (DEX, Sigma)	10 nM

2-22. Oil red O 染色

脂肪細胞への分化誘導を行った細胞(12 well-plate)をPBS (-)で2回洗浄し、10% PFA (paraformaldehyde/PBS)を1 ml加え、室温にて10分間固定した。PBS (-)で2回洗浄後、60%イソプロパノールで1分間処理した。濾過したoil red O染色液を1 ml加え、室温にて20分間染色を行い、PBS (-)で2回洗浄した。新しいPBS (-)中で顕微鏡観察を行った。Oil red O染色液は下記に示すように、使用時に調製した。Oil red O飽和溶液は、150 mgのoil red O粉末(Sigma, O-0625)を50 mlの100%イソプロパノールに溶かし、60°Cにてオーバーナイト飽和させた。Oil red O染色液は、使用時に飽和溶液を滅菌水で60%に希釈し、よく混合した後、0.45 μ Mフィルター濾過して調製した。

2-23. 変異体マウスの作製

眼球のレンズで特異的に発現する γE -*crystallin*遺伝子(*Cryge*)がトラップされたES細胞オリジナルDTクローンと組換え後のEGFP発現クローンをICRマウスの8細胞期胚にインジェクションし、キメラマウスを作製した。さらにF1マウスを得るために野生型マウス交配させた。オリジナルDTクローンのF1マウスは得られなかったが、EGFP発現クローンより作製したF1マウスはgermline transmissionが確認され、さらに、ヘテロ接合体F1マウス同士を交配させ、ホモ接合体F2マウスを作製した。

3. 結果

3-1. DTrapベクターを用いた遺伝子トラップ

本研究では、マウスES細胞中の非発現遺伝子の特異的に破壊するために、ジフテリア毒素DTを利用した「負の選択」に基づく新しいトラップ法DTrapを確立した。DTrapベクターのバックボーンには、日本産メダカ由来のDNA型トランスポゾン*Tol2*を用いている。WT single-DT (sDT)ベクターの構造として、上流から順にプロモーターを持たないDT遺伝子部位 (pDTA-1プラスミドDNA由来のWT DTカセット)、EGFP遺伝子部位 (ターミネーター・カセット)、それに薬剤耐性遺伝子部位 (ポリAトラップ部位) の三つの発現ユニットが存在する(Figure 2a)。sDTベクターが非発現遺伝子をトラップする効率を向上させるために、薬剤耐性遺伝子の下流に反転させた第二のDTカセットを組み込んだWT double-DTrap (dDT)ベクター(Figure 2b, Supplementary Figure 1)と、DT遺伝子の一塩基のみを置換することにより毒性を約1/30に抑えた弱毒化sDT176およびdDT176ベクターを構築した(Figure 2a, b)。さらに、単一細胞のゲノム中に多数のベクターが挿入された場合でも、ベクターを容易に識別できるように、上記四つのDTrapベクターのそれぞれに対し、ベクター内の最も下流に認識タグ (#01-#15) を挿入した。異なるタグで標識された15種類のベクターを混合し、*Tol2*トランスポゾンミクスチャー (sDT、dDT、sDT176、dDT176と略す) として遺伝子トラップ実験に用い、マウス未分化ES細胞中の非発現遺伝子を選択的に破壊できるかどうかを調べた。DTカセットを持たないコンディショナル型UPATrapトランスポゾンミクスチャーTMatを解析コントロールベクター(non-DT)として用いた(Figure 2c) (Mayasari et al., 2012)。

DTrapベクターがES細胞中で恒常的に発現する遺伝子内に正しい向きで挿入された場合、内在性遺伝子の転写活性により、内在性遺伝子のスプライス・ドナーとベクター内DTカセット上のスプライス・アクセプター間でスプライシングが起こる。DTカセット内のポリA付加シグナルによってDT遺伝子のmRNAが安定化され、標的細胞はDTの発現のために死滅する(Figure 3a)。ベクターが非発現遺伝子内に正しい向きで挿入された場合、DT遺伝子は発現されず、薬剤耐性遺伝子NEOと内在性遺伝子の融合型mRNAはトラップされた内在性遺伝子のポリA付加シグナルによって安定化され、細胞は薬剤耐性コロニーとして単離される(Figure 3b)。

3-2. DTrapベクターによる遺伝子トラップで得られる薬剤耐性コロニー数は少ない

上記四種類のDTrapベクターをそれぞれトランスポゼース発現ベクターと共にES細胞に導入後、NEO薬剤耐性コロニーを獲得した。10 ngベクターあたり得られたコ

コロニー数を比較したところ、WT sDTベクターを用いた場合のコロニー数はnon-DTベクターの1/20に激減した。WT DTrapベクターと弱毒化DTrapベクターのどちらにおいても、反転させた第二のDTカセットを組み込むことにより、コロニー数が半分以下まで減少した。また、sDTとdDTベクター両方において、DTを弱毒化することにより、トラップしたESクローン数は5-6倍程度増加した(Figure 4a)。WT DTrapベクターによる遺伝子トラップで得られる薬剤耐性コロニー数が非常に少ないため、更なる詳細な解析は弱毒化DTrapのみに絞った。

3-3. DTrap法により樹立したES細胞クローンの大半は、DTrapベクターがシングルコピーで挿入されている

トラップベクターが複数コピーで標的細胞ゲノムに挿入された場合でも、ベクターを容易に識別して解析できるよう、15種類の異なるタグで標識されたベクターのミクスチャーを遺伝子トラップ実験に用いた(Supplementary Figure 2) (Mayasari et al., 2012)。ES細胞クローン由来のDNAを用いた挿入ベクター数の解析を行ったところ、シングルコピーでベクターが挿入された割合は、sDT176とdDT176ではそれぞれ67.4%と80.8%であった(Figure 4b)。いずれもnon-DTベクターの割合(55%)より高かった(Mayasari et al., 2012)。また、non-DTベクターでは9コピーで挿入されたクローンまで検出されているのに対し、DTrapベクター全体では3コピー以上の多コピーで挿入されたクローンは検出されなかった。ミクスチャー化したベクタータグのID番号の解析により、sDT176とdDT176の両者ともに15種類のベクターの強い偏りがなく、標的細胞中のゲノム領域に挿入されていることが分かった (Figure 4c)。

3-4. 「Reverse」クローンを負に選択するための double DTrap 戦略

Splinkerette PCR 解析により解読した遺伝子配列を UCSC のマウスゲノムデータベース BLAT で検索し、トラップされた遺伝子の同定およびベクターの位置と挿入向きを予測を行った(Supplementary Figure 3)。トラップベクターが既知の遺伝子領域に挿入された場合を coding region とし、同定されていないゲノム領域に挿入された場合を non-coding region とした。coding region をトラップした sDT176 と dDT176 ベクターはそれぞれ 59.1%と 65.1%であったが、Non-DT はやや多めの 72.9%となった(Figure 5a)。内在性遺伝子に対してセンスの向きで挿入された場合を forward、アンチセンスの場合を reverse とした。sDT176 と dDT176 ベクターが forward 向きで挿入された割合はそれぞれ 47.4%と 67.1%であった。Non-DT コントロールベクターは dDT176 と大差がなく、67.5%であった(Figure 5b)。DTrap ベクターの挿入部位に関する解析では、弱毒

化した両ベクターのどちらも大きな偏りなく、標的細胞の遺伝子内に挿入されていることが分かった(Figure 5c)。これらの結果から、dDT176ベクターに組み込まれた第二のDTカセットの働きは、内在性遺伝子に対しアンチセンスの向きに挿入されたreverseクローンを負に選択するために有効であることが判明された。

3-5. 弱毒化dDT176ベクターはES細胞中の非発現/弱発現遺伝子を高効率にトラップする

従来UPATrapベクター (Non-DTベクター) は、遺伝子発現の有無に関わらず、マウスES細胞中に存在する全ての遺伝子を標的としてトラップを行うことが可能である。一方、DTrapベクターは、マウスES細胞中の非発現遺伝子を選択的にトラップすることが予想される。意図した遺伝子が得られているかどうかを確認するために、まず公開されているデータベースの情報を利用し、トラップした遺伝子のマウスES細胞における発現の有無を予測評価した。その中から一部の遺伝子をランダムに選び出し、qRT-PCRを用いてES細胞における実際の発現強度を測定した。

データベースを用いた発現評価では、その精度を上げるために、データベース上で公開されているESTとRNA-Seq両方の情報を用いて解析を行った。ESTデータベース上に登録されていない遺伝子、かつ未分化ES細胞で発現が無い(PRKM=0.000)か、非常に弱く発現する遺伝子(PRKM<3.000)の割合は、non-DTベクターでは37.9%、dDT176ベクターでは69.6%であった(Figure 6a)。NCBIのUniGeneデータベース上の情報により、これらの遺伝子の多くは組織特異的遺伝子と考えられた (data not shown)。また、dDT176ベクターによりトラップされた遺伝子のRPKM値はnon-DTベクターに比べ、有意に非発現遺伝子もしくは弱く発現する遺伝子をトラップしていることがわかった(4.482 vs 11.040、 $p=0.0006$) (Figure 6b)。

上記データベースによる発現予測を行った遺伝子の中から、forward向きでベクターが挿入されている遺伝子をランダムに選定し、未分化ES細胞(V6.4)における実際の発現強度の解析をqRT-PCRにより行った。*GAPDH*に比べて発現量が最も低かった*Ern2*遺伝子(TM13-064)の発現量を1とし、 $\Delta\Delta C_t$ 法で各遺伝子の発現レベルを評価した。dDT176ベクターによりトラップされた遺伝子の $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 値はnon-DTベクターに比べ、有意に非発現遺伝子もしくは弱く発現する遺伝子をトラップしていることがわかった($p=0.0196$) (Figure 6c)。また、実際にqRT-PCRで測定した遺伝子の発現量と複数のデータベース解析から予測した遺伝子の発現量を比較したところ、強い相関が認められたことから、データベースを用いた発現予測は十分可能であると考えられた(Figure 6d)。トラップされたこれらの遺伝子の生物学的機能を明らかにするために、gene ontology (GO)解析を行ったところ、DTrapベクターがトラップした多くの非発現

遺伝子もしくは弱く発現する遺伝子は組織特異的遺伝子（特に神経細胞、血球細胞、筋肉細胞関連）であることが分かった(Figure 7)。この結果から、DTrapベクター、特に弱毒化dDT176ベクターはES細胞中の非発現遺伝子もしくは弱く発現する組織特異的遺伝子を高効率に、ほぼ選択的にトラップすることができることが分かった。

また、これまでに弱毒化DDT176ベクターによって作製した変異体クローンの新規性について、The international gene-trap consortium (IGTC) のデータベースに登録されている情報に基づいて評価した。その結果、変異体クローンの全体の60%以上は遺伝子トラップ法によって初めて作製されたものであり、また、全体の40%以上は完全に初めて作製された変異体であることが分かった (data not shown)。

3-6. Wild-type DTrapベクター内の欠損は高頻度で発生する

WT DT ベクターを用いて遺伝子トラップを行ったところ、sDT ベクターでは 89 クローン、dDT ベクターでは 74 クローンの変異体細胞株しか得られなかった。ゲノムに挿入されたベクター数と ID 番号の解析及び遺伝子の同定を行った際に、ゲノム PCR によるベクター内領域の増幅ができないクローンや、ベクターの plasmid 配列等の想定外の配列が検出されたクローンが多数存在した。また、多くのベクターが reverse 向きで挿入されていたことが分かった。解析可能なクローンの割合は、non-DT ベクターと弱毒化 DTrap ベクターの 80%-90%に対し、WT sDT ベクターでは 45% (40 クローン)、dDT ベクターでは 20% (15 クローン)過ぎなかった。

WT DTrap ベクターの効率が非常に低い原因を解明するため、トラップベクター内の欠損の有無について確認した。さらに、トラップベクターの挿入パターンはトランスポゼースに依存したカット&ペースト型の正しいベクター挿入であるか、それとも、トランスポゼースに依存しない想定外のプラスミド挿入であるかについても確認した(Figure 8a)。その結果、dDT176 ベクターでトラップされた 14 クローンには欠損が認められなかったが、WT dDT ベクターでトラップされた 8 クローン中の 7 クローンには欠損が確認され、WT dDT ベクターの欠損頻度が非常に高いことが分かった (Figure 8b)。また、ベクター挿入部の塩基配列を解析した結果、WT dDT ベクターの場合、ベクター内の大半の領域が欠損している 5 クローン(TM25-002、-004、-007、-010)ではプラスミド配列が検出されなかったため、これらのクローンでは *Tol2* トランスポゼースを介した正常なベクターの挿入と考えられる。Amplified region 4 の NEO-IRES 領域の PCR 増幅ができなかった 2 クローン(TM26-005 と TM26-026)でプラスミド配列が確認され、*Tol2* トランスポゼースによる挿入ではない可能性が高いと考えられる(Figure 8c, Table 3)。

3-7. 発現遺伝子をトラップしたdDT176ベクターは高頻度で欠損が発生する

「ES 細胞中の発現遺伝子をトラップしたクローンは DT の発現によって負に選択される」というのは DTrap 戦略の狙いであるにもかかわらず、弱毒化 DTrap ベクターによってトラップされた遺伝子の内、約 2 割が ES 細胞で発現する遺伝子であることが分かった。この原因の一つとして、遺伝子を破壊するための DT カセットに欠損が発生し、DT の発現による負の選択が不可能になったことが考えられた。この仮説を検証するために、発現遺伝子をトラップした複数のクローンを選定し、ゲノム PCR により DT カセットおよびその周辺領域の欠損の有無を調べた(Figure 9a)。その結果、調べた 4 クローンのうち、TM18-042 では、EGFP カセットまでのベクター前半領域が完全に欠損し、TM15-064、TM16-047 では、DT カセットの IRES 領域から EGFP カセットまでが欠損していることが分かった。TM16-056 には欠損がみられず、トランスポゼースに依存した挿入の可能性が高いことが分かった(Figure 9b)。これらの結果から、ES 細胞中の発現遺伝子が dDT176 ベクターにトラップされたのは DT カセットの欠損によるものと検証できたが、稀に発現遺伝子をトラップした欠損のないベクターは、メチル化などの何らかのエピジェネティックな制御を受け、その内在性遺伝子の発現と DT の発現が抑制されている可能性も考えられる。

3-8. DTrapベクターのFLPo部位特異的な組換えが高効率で引き起こされる

トラップベクターの各発現ユニットの間に FLPo 組換え酵素の認識配列が配置されている。DTrap を達成した ES 細胞中で FLPo 組換え酵素を一過性に発現させることにより、遺伝子破壊(EGFP)カセットの不可逆的な反転と、その両側の DT カセットおよび NEO カセットの欠失が引き起こされる (Figure 10)。意図した組換えが正確に引き起こされるために、特に組換え酵素の認識部位を含むトラップベクターが配列の完全性が保たれる必要がある。Table 3 に示すトラップベクターの完全性が確認された 12 の DTrap クローンに対して FLPo 部位特異的な組換え実験を行ったところ、組換えが正確に引き起こされた確率は 22%-100%であり、12 クローン中 9 クローンは 60%以上の高い組換え率を示したことを確認した。

3-9. Cell lineage ablation および Cell lineage labeling

ES 細胞中の内在性遺伝子に DTrap ベクターが挿入されている DT カセットを保持したままの ES 細胞クローンを「オリジナル DT クローン」とした。FLPo 組換え酵素を一過性に発現させることにより、オリジナル DT クローンから DT カセットを除去し、トラップされた遺伝子の内在性プロモーター活性によって EGFP の発現が誘導さ

れるようにした ES 細胞サブクローンを「EGFP 発現クローン」とした。

主に脂肪細胞で特異的に発現する *perilipin-1* 遺伝子がトラップされたオリジナル DT クローン(TM28-026)とその EGFP 発現クローンに対し、*in vitro* における脂肪細胞への分化誘導実験を行った(Figure 11a)。オリジナル DT クローンでは、分化誘導に伴い、DT の発現によって脂肪細胞が死滅すると考えられるため、成熟した脂肪細胞が観察されず、RNA レベルでの EGFP 発現も検出されなかった(data not shown)。一方、*perilipin-1* の EGFP 発現クローンでは、DT カセットが除去されているため、分化誘導に伴って GFP 蛍光を示す成熟した脂肪細胞が観察され(Figure 11b)、RNA レベルでの EGFP 発現量の上昇も確認された(data not shown)。

γ E-crystallin (*Cryge*)は眼球のレンズで特異的に発現する遺伝子であり、水晶体の透明性の維持等に関わることが知られている(Graw, 2004)。*Cryge* がトラップされたオリジナル DT クローン (TM26-004) とその EGFP 発現クローンを用いてキメラマウスを作製した(Figure 12a, b)。*Cryge* 遺伝子の転写活性を利用し、片方のアレルに挿入された DTrap ベクターから DT が発現された場合、*Cryge* を発現する細胞群が消失し、レンズ (あるいはレンズを含む眼球の複数の成分) が欠損したマウスが生まれると予想した。しかし、正常細胞部分からの compensation のためか、オリジナル DT クローン由来のキメラマウスには、EGFP 発現クローン由来のキメラマウスと同様に眼球異常は観察されなかった。*Cryge* 遺伝子を発現する細胞は DT によって完全に除去されることを確認するために、オリジナル DT クローン由来のキメラマウスの繁殖を試みたが、雌雄同体のため、cell lineage ablation を確認できる個体は得られなかった。*Cryge* 遺伝子の EGFP 発現クローンを用いて作製したキメラマウスでは、眼球のレンズに局限して EGFP の発現が確認され、その F1 マウスの眼球レンズにも EGFP の強い発現を確認することができた (Figure 12c, d)。

4. 考察

4-1. DTrap 法の開発によって達成できたこと

ランダムな遺伝子トラップ法は、優れた変異導入法として改良を重ねながら、マウス ES 細胞中のタンパク質コード遺伝子の変異体作成に大きく貢献してきた。従来のトラップベクターにより既に多くの ES 細胞変異体が樹立されたものの、その中に占める非発現遺伝子がトラップされた ES 細胞クローンの割合は決して高くなかった。国際的な共同研究計画「The knockout mouse project」の一環として、ターゲティング法により個別に非発現遺伝子の ES 変異体を作成するプロジェクトが実施された。しかしながら、ヒト iPS 細胞やヒト腫瘍細胞などの新種標的細胞が増えつつある中、時間と労力を要する遺伝子ターゲティングに依存した非発現遺伝子破壊のプロジェクトは非現実的であると言わざるを得ない。近年、CRISPR-Cas9 システムはゲノム編集や変異体の樹立に大きく貢献してきた。しかし、標的外領域へのオフターゲット効果は課題となっている。

本研究で開発した *Tol2* トランスポゾンを用いた弱毒型 DTrap ベクターにより、ES 細胞中の非発現/弱発現遺伝子をランダムに、効率良く完全に破壊する目標を初めて達成された。網羅的な遺伝子破壊を計画する際には、DTrap 法によるランダムな挿入型変異導入を活用すれば、もはや大規模な遺伝子ターゲティング・プロジェクトを立ち上げなくても、様々な標的細胞中の非発現/弱発現遺伝子に関する変異体を非常に高効率で作製することが期待できる。また、これまでに DTrap によりトラップされた non-coding 領域（データベース中の既知遺伝子や EST と相同性を持たない領域）が比較的高い割合を占めていることから、新たに網羅的な遺伝子破壊を計画する場合には、DTrap 法により明らかにされたこれらの多数の未知配列（新規遺伝子候補や non-coding RNA 等）を解析することにより、新規非発現/弱発現遺伝子の発見にも繋がる。特に神経系や筋肉系、造血系細胞に特異的に発現する（新規）遺伝子や non-coding RNA の変異体を利用した機能解析や病気解明につながることも期待できる。

4-2. DTrap 法に関連して考慮すべき点

ジフテリア毒素は細胞のタンパク質合成を阻害することにより細胞死を引き起こすため、ターゲティングベクターを作製する際に負の選択マーカーとしてよく用いられている。本研究で行った WT DTrap ベクターによる遺伝子破壊では、得られたクローンの大半でベクターが内在性遺伝子に対してアンチセンスの向き (reverse) に挿入されているか、DT カセット内に欠損が引き起こされているか、もしくは *Tol2* トラン

スポゼースを介さないランダムな挿入が生じることを判明した。DT フラグメント A の一分子だけでも細胞にとっては致命的であることは報告されている (Yamaizumi et al., 1978)。WT DT は細胞にとって非常に大きなストレスとなり、挿入された細胞が殆ど生き残らなかったことが原因ではないかと考えられる。WT DT ベクターが非発現遺伝子領域に挿入された際、非常に弱い潜在的なプロモーター活性により DT が僅かでも発現した場合、細胞が死滅すると推測できる。また、トランスポゾンの挿入自体がターゲットした遺伝子およびその周辺遺伝子の発現に何らかの変化を引き起こす可能性も考えられるため、トランスポゾンの挿入による DT の発現に繋がることも考えられる。

WT DT のこの問題は、DT を弱毒化することによって解消され、マウス ES 細胞中の非発現/弱発現遺伝子へのランダムかつ高効率な挿入型変異導入が達成できた。しかし、弱毒化 DTrap ベクターにより作製した変異体の中に、発現遺伝子がトラップされた極少数のクローンが存在した。ES 細胞中の発現遺伝子内にトラップベクターが正常に挿入されているにもかかわらず、DT による「負の選択」ができなかった。トラップした発現遺伝子はメチル化などの何らかのエピジェネティックな制御を受け、内在性遺伝子と DT の発現が抑制されているのではないかと原因として考えられる。

4-3. Cell lineage ablation 実験や cell lineage labeling 実験への応用

DTrap 戦略では、トラップベクターのバックボーンとしてトランスポゾンを利用することや、細胞中にシングルベクターで挿入されているクローンを識別できること、*in vitro* における部位特異的組換えを正確に引き起こせることが、DTrap ベクターにより作製した変異体細胞株を cell lineage ablation 実験や cell lineage labeling 実験に応用する可能性と成功率を高めた。

DTrap 法で作製された DT カセットを保持したままのオリジナル ES 細胞クローンを利用したマウスの作製や、*in vitro* で分化誘導実験を行った場合、トラップされた遺伝子のプロモーター/エンハンサーの支配下に DT が発現されるため、トラップされた遺伝子を発現する cell lineage の除去が引き起こされる。例えば、本研究では、*perilipin-1* 遺伝子の転写活性によって DT が発現される ES 細胞クローンを利用して、*in vitro* で脂肪細胞への分化誘導を行った実験において、cell lineage ablation が達成された可能性が示された。この ES 細胞クローンを用いてマウスを作製した場合には、「脂肪細胞を持たないマウス」(fat-free mouse) を造り出すことが期待できる。

多細胞生物の様々な臓器は、複数の cell lineage が相互にシグナルを伝達し合うことにより、その複雑な形態や機能を完成させる。このような臓器の発生過程で、一つの

cell lineage だけを除去した場合に、その形態形成や機能成熟がどのような影響を受けるかは、生物学には非常に興味深い重要問題がたくさん残されていると言える。Cell lineage ablation 実験は、形態形成の重要な問題を解く鍵となるだけでなく、免疫系や神経系のように、多種類の細胞群が協調してひとつの高次生体機能（病原体に対する免疫応答や学習・記憶など）を遂行するような場合にも、問題解決の糸口になるに違いない。免疫系や神経系の臓器から特定の細胞群のみを除去した場合、EGFP クローンによる可視化を利用しながら、免疫応答や神経機能における機能解析および病気解明が容易になることが期待される。

4-4. ES 細胞の未分化性に対する DT の悪影響について

WT DTrap ベクターにより作製した γE -crystallin 遺伝子 (*Cryge*) に関するオリジナル ES 細胞クローンに対し、FLP を介した相同組換えによって DT カセットや NEO カセットを取り除いた ES 細胞サブクローンを作製した。*Cryge* のオリジナル ES 細胞クローンで使用されたのは、弱毒型ではなく、野生型（強毒型）の DT 遺伝子であったにもかかわらず、その FLP サブクローンからは、ハイグレードなキメラマウスが作製され、F1 マウスへの germline transmission も最初の試みで成功した。ES 細胞の未分化性の維持に対して、DT は致命的な悪影響を及ぼさないことから、本研究で開発された DTrap 法は、新しい変異体マウス系統の樹立に広く活用されることが期待できる。

5. 謝辞

本研究を行うにあたり、最高の研究環境を与えてくださると共に、多くの貴重な御助言を賜りました川市正史教授、石田靖雅准教授に厚く御礼申し上げます。研究を進める上で、直接の御指導を賜りました石田靖雅准教授に心から感謝致します。セミナー等におきまして、御助言を賜りました松田永照助教、北川教弘助教及び岡千緒助教に深く御礼申し上げます。

貴重な実験材料を供与して頂き、更にヒアリングや本論文等で審査をして頂いた河野憲二教授及び加藤順也教授、別所康全教授に心から感謝申し上げます。変異マウスの作製にあたり、御助力を頂いた大阪大学の竹田潤二教授及び磯谷綾子特任准教授に深く御礼申し上げます。

基礎的な技術習得にあたり御指導、御助言を賜りました重岡稔章氏、Ika Mayasari 氏、赤松理恵氏に心より感謝致します。また、これまでの研究生活を共に過ごし、実験サポートをして下さった田畑海渡氏、近藤遼平氏、川上由美子氏には非常にお世話になり、深く感謝致します。

6. 参考文献

Austin, C.P., Battey, J.F, Bradley, A., Bucan, M., Capecchi, M., Collins, F.S., Dove, W.F., Duyk, G., Dymecki, S., Eppig, J.T., et al. (2004). The Knockout Mouse Project. *Nat Genet* 36, 921-924.

Chen, W.V., Delrow, J., Corrin, P.D., Frazier, J.P., Soriano, P. (2004). Identification and validation of PDGF transcriptional targets by microarray-coupled gene-trap mutagenesis. *Nature Genet.*, 36, 304-312.

Dani, C., Smith, A.G., Dessolin, S., Leroy, P., Staccini, L., Villageois, P., Darimont, C. and Ailhaud, G. (1997). Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J. Cell Sci.* 110, 1279-1285.

Friedel, R.H., and Soriano, P. (2010). Gene trap mutagenesis in the mouse. *Methods Enzymol* 477, 243-269.

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

Graw, J., Klaus, A., Klopp, N., Selby, P. B., Loster, J. and Favor, J. (2004) Genetic and allelic heterogeneity of *Cryg* Mutations in Eight Distinct Forms of Dominant Cataract in the Mouse. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 1202-1213

Hansen, J., Floss, T., Sloun, P.V., Ftichtbauer, E.-M., Vauti, F., Arnold, H.1H., Schntitgen, F., Wurst, W., von Melchner, H., Ruiz, P. (2003). A large-scale, gene-driven mutagenesis approach for the functional analysis of the mouse genome. *Proc. NatlAcad. Sci. USA*, 100, 9918-9922.

Honjo, T., Nishizuka, Y., Hayaishi, O. & Kato, I. (1968). Diphtheria toxin-dependent adenosine diphosphate ribosylation of aminoacyl transferase II and inhibition of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* 243, 3553–3555.

Kohno, K. *et al.* (1986). Amino acid sequence of mammalian elongation factor 2 deduced from the cDNA sequence: homology with GTP-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 4978–4982.

Ishida, Y., and Leder, P. (1999). RET: a poly A-trap retrovirus vector for reversible disruption and expression monitoring of genes in living cells. *Nucleic Acids Res* 27, e35.

Matsuda, E., Shigeoka, T., Iida, R., Yamanaka, S., Kawaichi, M., and Ishida, Y. (2004). Expression profiling with arrays of randomly disrupted genes in mouse embryonic stem cells leads to *in vivo* functional analysis. *Proc Natl Acad Sci* 101, 4170-4174.

Mayasari N I, Mukougawa K, Shigeoka T, Kawakami K, Kawaichi M, Ishida Y. (2012). Mixture of differentially tagged Tol2 transposons accelerates conditional disruption of a broad spectrum of genes in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Research* 40 (13):e97.

Niwa, H., Araki, K., Kimura, S., Taniguchi, S., Wakasugi, S., and Yamamura, K. (1993). An efficient gene-trap method using poly A trap vectors and characterization of gene-trap events. *J Biochem* 113, 343-349.

Shigeoka, T., Kawaichi, M., and Ishida, Y. (2005). Suppression of nonsense-mediated mRNA decay permits unbiased gene trapping in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 33, e20.

Skarnes, W.C., Rosen, B., West, A.P., Koutsourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A.O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., et al. (2011). A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474, 337-342.

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

Tashiro, K., Inamura, M., Kawabata, K., Sakurai, F., Yamanishi, K., Hayakawa, T., Mizuguchi, H.. (2009). Efficient adipocyte and osteoblast differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by adenoviral transduction. *Stem Cells.*, 27(8):1802-11.

Thomas, K.R., Capecchi, M.R. (1987). Site-directed mutagenesis by gene targeting in mOuSe embryo-derived stem cells. *Cell*, 51, 503-512.

Yagi, T., Ikawa, Y., Yoshida, K., Shigetani, Y., Takeda, N., Mabuchi, I., Yamamoto, T., Aizawa, S. (1990). Homologous recombination at c-fyn locus of mouse embryonic stem cells with use of diphtheria toxin A-fragment gene in negative selection. *Proc.Natl.acad.Sci.USA*, 87:9918-9922.

You, Y., Bergstrom, R., Klemm, M., Nelson, H., Jaenisch, R., and Schimenti, J. (1998). Utility of C57BL/6J x 129/SvJae embryonic stem cells for generating chromosomal deletions: tolerance to γ radiation and microsatellite polymorphism. *Mamm Genome* 9, 232-234.

Yusa, K., Rad, R., Takeda, J., & Bradley, A. (2009). Generation of transgene-free induced pluripotent mouse stem cells by the *piggyBac* transposon. *Nat. Methods* 6, 363-369.

Zambrowicz, B • P • , Imamoto, A • , Fiering, S • , Herzenberg, L • A • , Kerr, W • G., Soriano, P. (1997). Disruption of overlapping transcripts in the ROSA geo 26 gene trap strain leads to widespread expression of galactosidase in mouse embryos and hematopoietic cells. *Proc. NatlAcad. Sci. USA*, 94, 3789-3794.

Zambrowicz, B.P., Friedrich, G.A., Buxton, E.C., Lilleberg, S.L., Person, C., Sands, A.T. (1998). Disruption and sequence identification of 2,000 genes in mouse embryonic stem cells. *Nature* 392, 608-611.

Zambrowicz, B.P., Abuin, A., RamirezISolis, R., Richter, L.J., Piggot, J., BeltrandelRio, H., Buxton, E.C., Edwards, J., Finch, R.A., Friddle, C.J., et al. (2003) Wnk1 kinase deficiency lowers blood pressure in mice: a gene-trap screen to identify potential targets for therapeutic intervention. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 100, 14109-14114.

Yamaizumi, M., Mekada, E., Uchida, T., & Okada, Y. (1978). One molecule of diphtheria toxin fragment A introduced into a cell can kill the cell. *Cell*, 15(1), 245– 250.

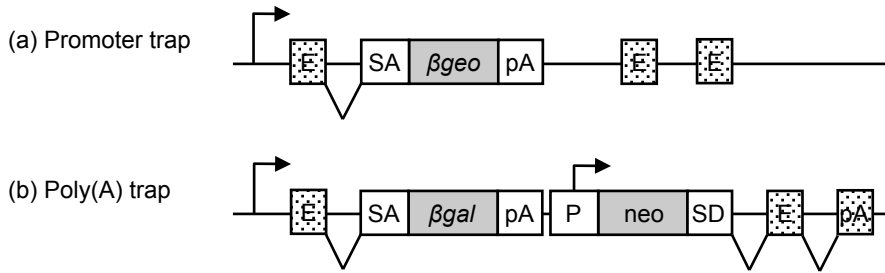
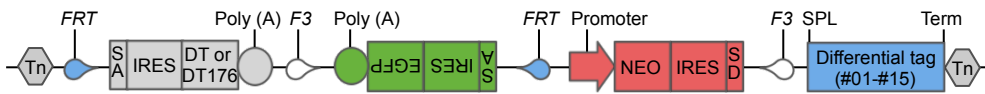
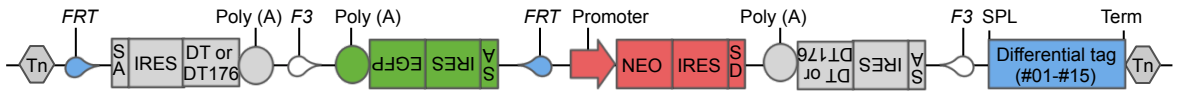


Figure 1. プロモータートラップベクターおよびポリAトラップベクターの構造。
 (a)プロモータートラップベクターには、5' スプライス・アクセプター(SA)、薬剤耐性遺伝子(βgeo など)、ポリA付加シグナル(pA)が配置されている。(b)ポリAトラップベクターは、遺伝子破壊のためのカセットと薬剤選択のためのカセットから構成される。上流の遺伝子破壊カセットには、5' スプライス・アクセプター(SA)、レポーター遺伝子(βgal やGFPなど)、ポリA付加シグナル(pA)が配置されている。下流の薬剤選択カセットには、恒常的な転写活性を持つプロモーター(P)、薬剤耐性遺伝子(neoなど)、スプライス・ドナー(SD)が配置されている。E: 内在性遺伝子のエクソン領域。

(a) sDT or sDT176



(b) dDT or dDT176



(c) TMat (Non-DT)



Figure 2. 複数種類の識別タグを組み込んだジフテリア毒素を利用した「負」選択型DTrapベクターと従来型UPATrap-*ToI2*ベクターの構造。(a) Wild-type single-DTベクター (sDT) とそのDTを弱毒化したDT176ベクター (sDT176)。(b) 薬剤耐性遺伝子の下流に反転させた第二のDTカセットを組み込んだwild-type double-DTrap (dDT)ベクターとそのDTを弱毒化したDDT176ベクター (dDT176)。(c) Non-DTコントロールベクターとして使用した従来型UPATrap-*ToI2*ベクター (TMat, Non-DT)。各ベクターの後半部分に15種類の認識タグが配置されている。*loxP/lox5171* : Cre組換え酵素認識部位 ; *FRT/F3* : FLP α 組換え酵素認識部位 ; SA : スプライス・アクセプター ; SD : スプライス・ドナー ; P : 恒常的プロモーター ; pA : ポリA付加シグナル ; IRES : mRNA内部のリボソーム進入サイト ; SPL/Term : splinkerette PCRのための合成配列 ; Tn : トランスポゼースが認識する*ToI2*トランスポゾン配列 (上流Tn : L200配列 ; 下流Tn : R175配列) 。

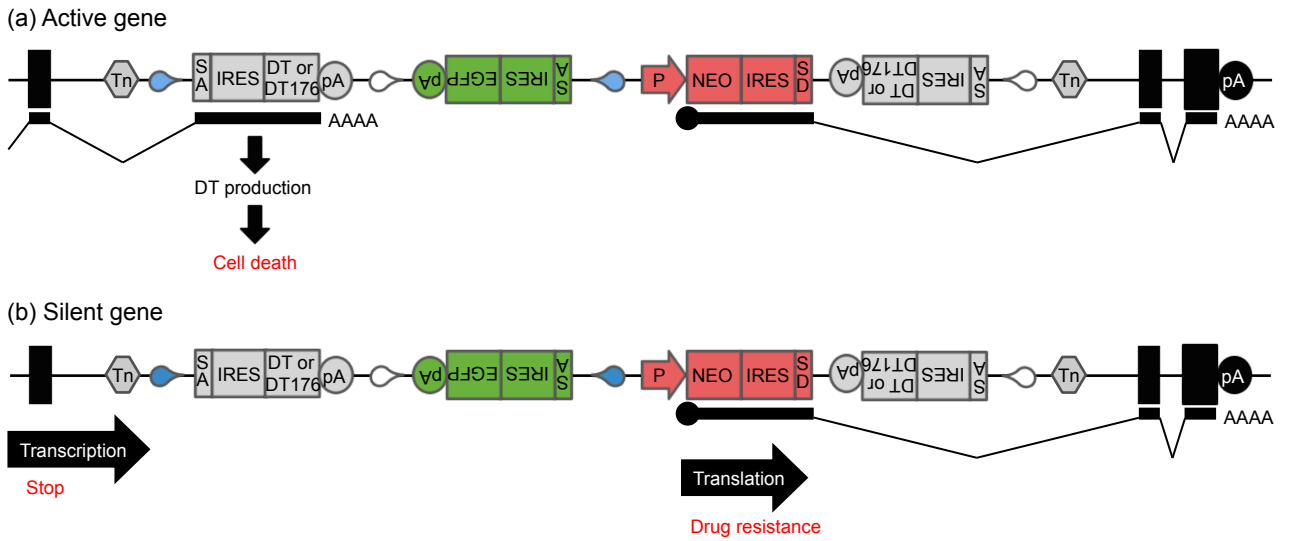


Figure 3. 「負」選択型DTrapベクターの戦略。(a)DTベクターがES細胞中で恒常的に発現する遺伝子内に正しい向きで挿入された場合。(b)DTベクターが非発現遺伝子内に正しい向きで挿入された場合。P：恒常的プロモーター；pA：ポリA付加シグナル。

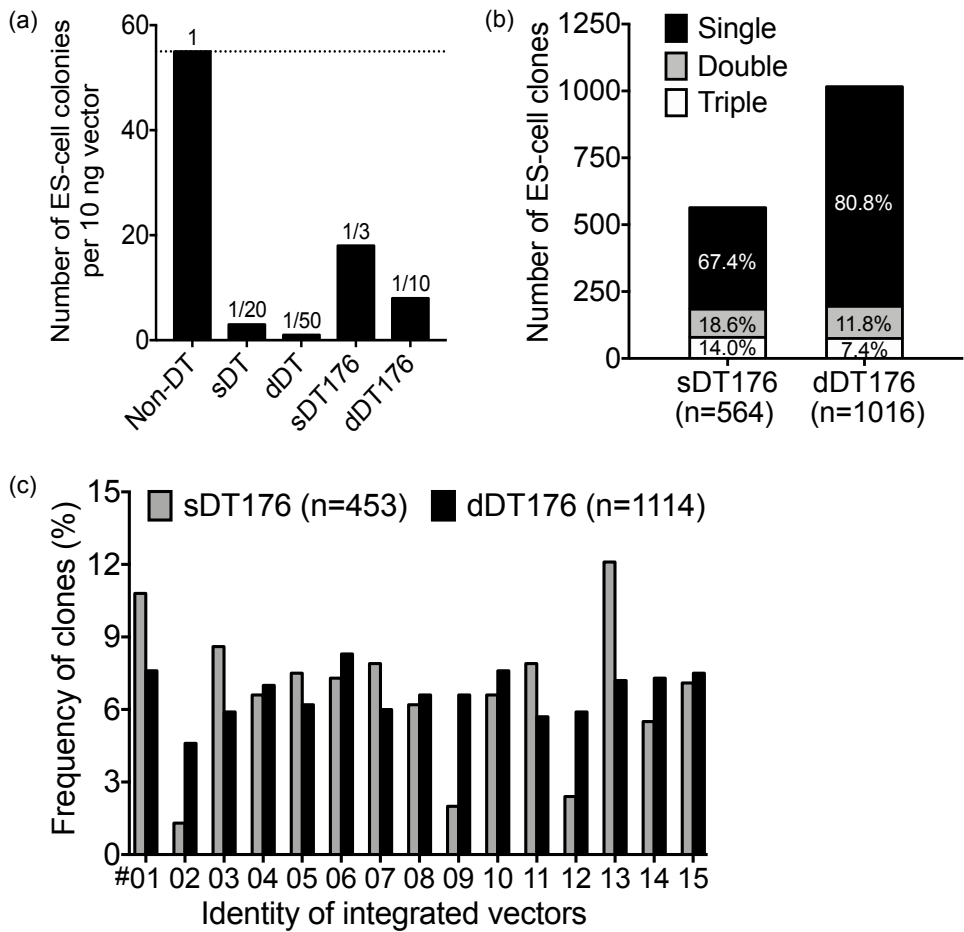


Figure 4. (a) 10ngベクターあたり形成された薬剤耐性コロニー数の比較。(b) 標的細胞ゲノムに挿入されるベクター数。(c) 15種類の異なるタグで標識したベクターの使用率。

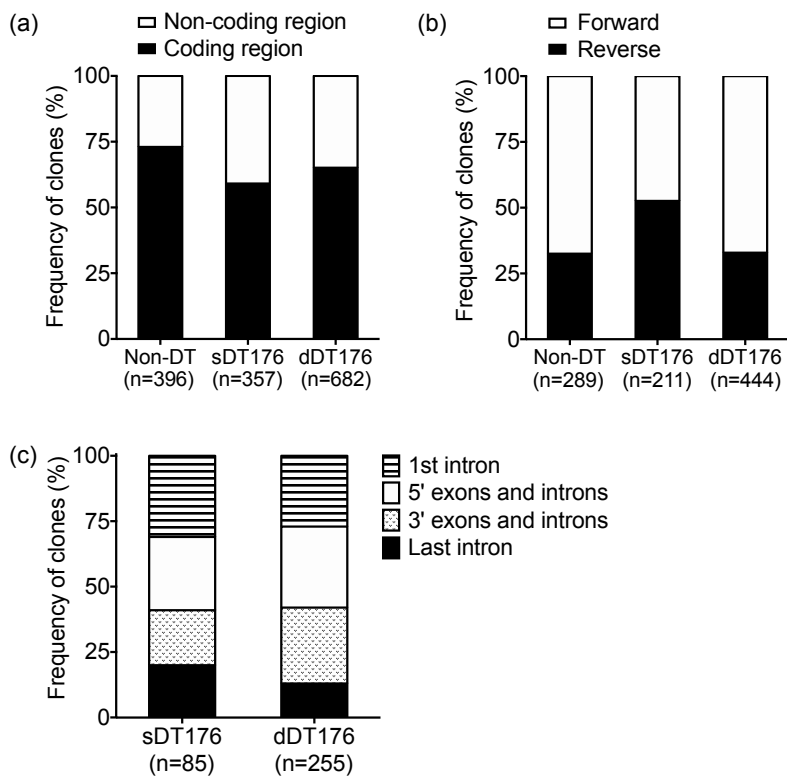


Figure 5. DTrapベクターの挿入部位と挿入向きの特徴。Non-DTベクターと弱毒化DTrapベクターを用いた遺伝子トラップ時のベクター挿入部位の予測(a)と挿入向きの同定(b)。(c)Forward向きでトラップした内在性遺伝子への挿入領域。

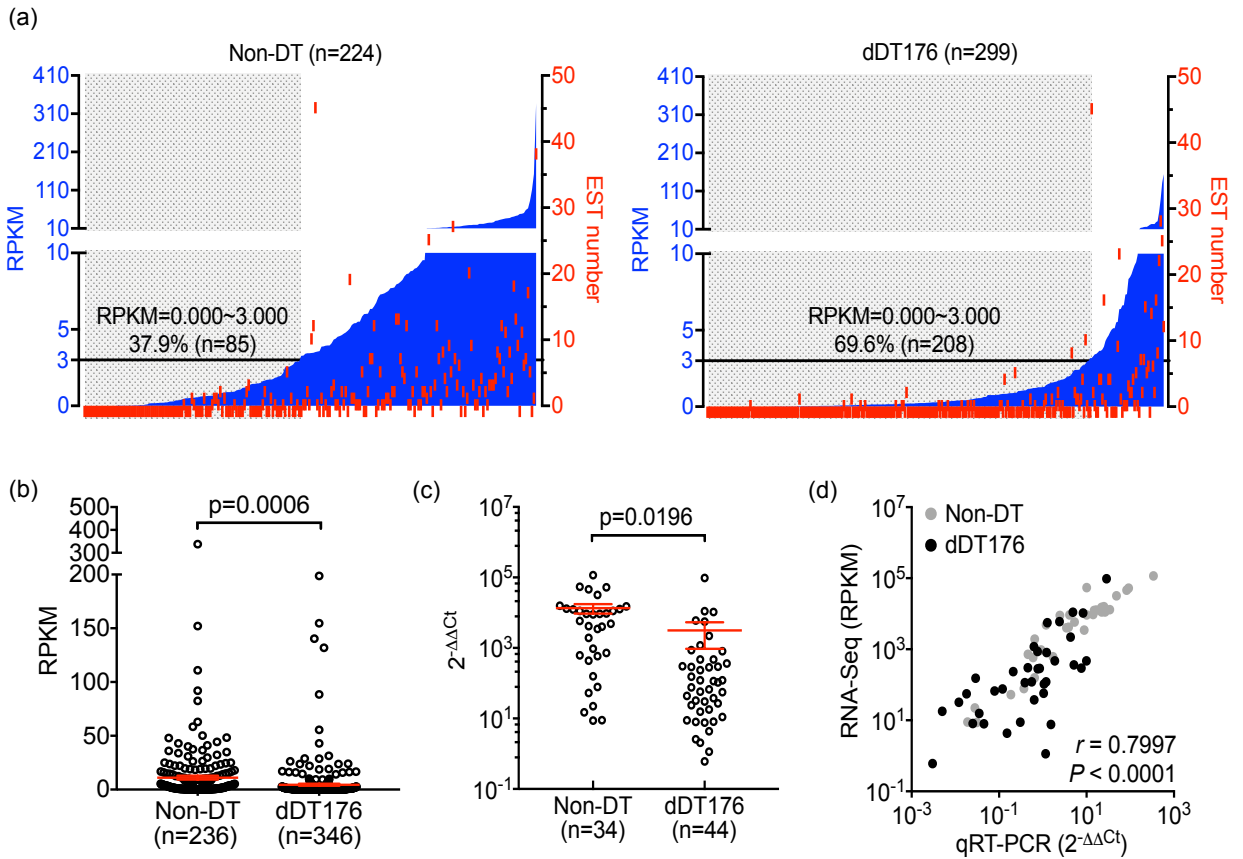
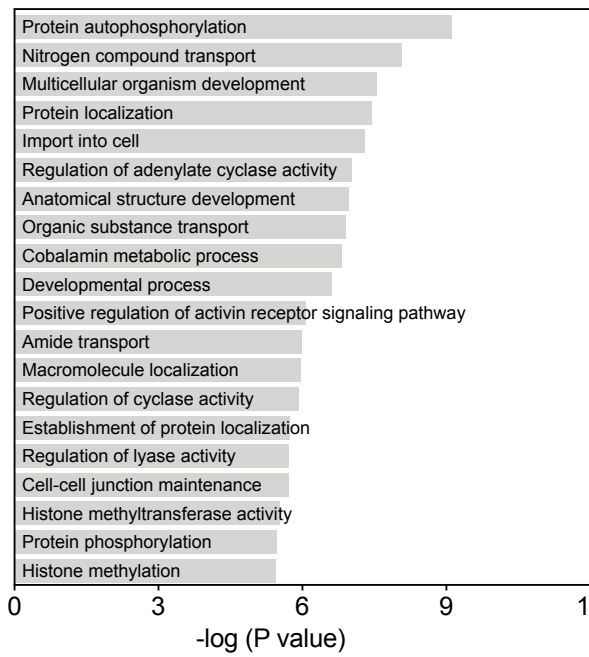


Figure 6. DTrapベクターによりトラップされた遺伝子の発現評価。(a) ESTとRNA-Seqデータベース解析を照らし合わせた発現評価。(b) RNA-Seqデータベース解析による発現比較。(c) qRT-PCRによるforward向きでトラップされた遺伝子の発現評価。(d) qRT-PCRで測定した遺伝子の発現量とデータベース解析により予測した遺伝子の発現量に強い相関が認められた。

Non-DT



DTrap

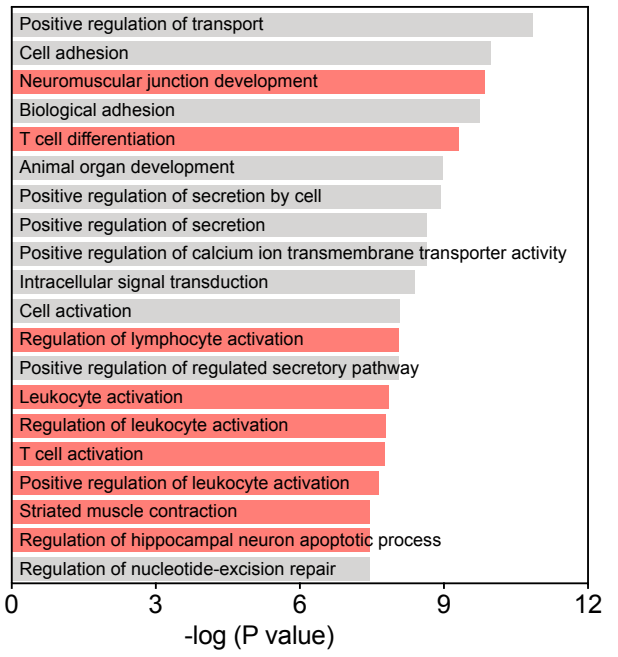


Figure 7. Non-DTベクターおよびDTrapベクターによりトラップした遺伝子のGene ontology (GO)解析。

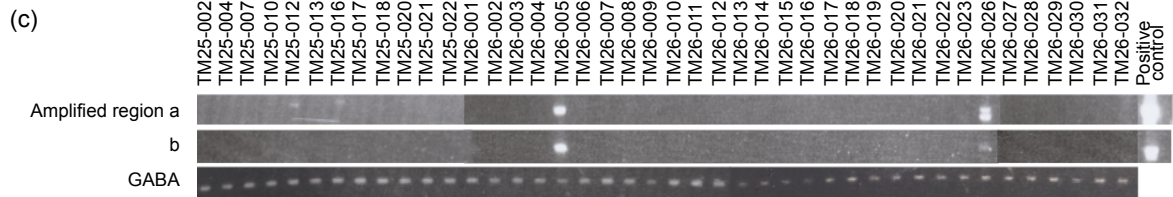
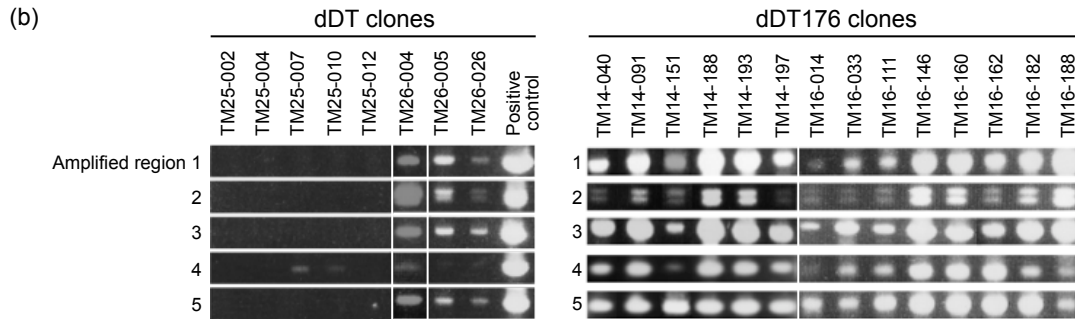
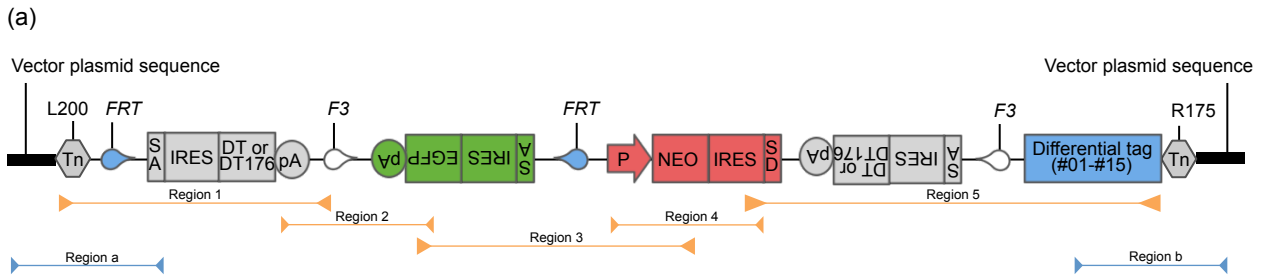
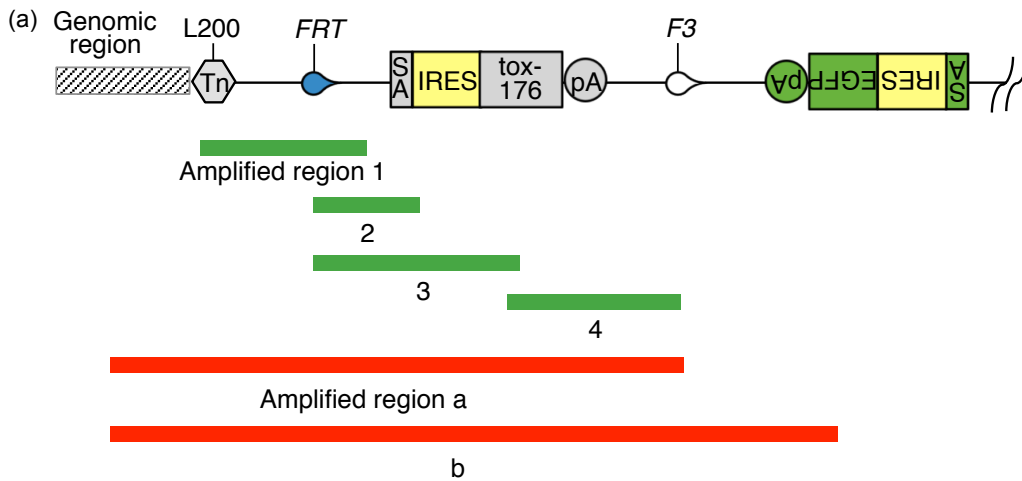


Figure 8. トラップベクター内の欠損検出および挿入パターンの確認。(a)DTrapベクターでトラップしたクローンに対し、region 1-5のゲノムPCRにより欠損の有無を確認した。トラップベクターの挿入パターンは、DTrapベクター配列のすぐ外側にあるプラスミド配列上のプライマーとベクター内の配列上のプライマーを用い、region aとregion bのPCR反応を行った。(b)Wild-type dDTベクター及びdDT176ベクターによりトラップしたクローンの欠損確認。(c)トラップベクター挿入パターンの確認。Positive control: wild-type dDTベクターのプラスミドDNA。



(b)

Clone number	Amplified region						GABA
	1	2	3	4	a	b	
TM26-004	+	+	+	+	+		+
TM18-042	-	-	-	-	-	short	+
TM15-064	+	+	-	-	-	short	+
TM16-047	+	+	-	-	-	short	+
TM16-056	+	+	+	+	+		+
Plasmid DNA of DTrap vector	+	+	+	+			-

+：予想通りのPCR産物が得られた場合

-：PCR産物が得られなかった場合

Short：予想より短いPCR産物が得られた場合

Figure 9. 発現遺伝子をトラップしたdDT176ベクターのDTカセットとその周辺領域の欠損確認。(a) dDT176ベクターでトラップしたクローンに対し、region 1-4及びregion a、bのゲノムPCRにより欠損の有無を確認した。欠損のないTM26-004をコントロールとして用いた。(b) dDT176ベクターにより得られた4クローンの中の3クローンにDTカセット周辺領域の欠損が検出された。

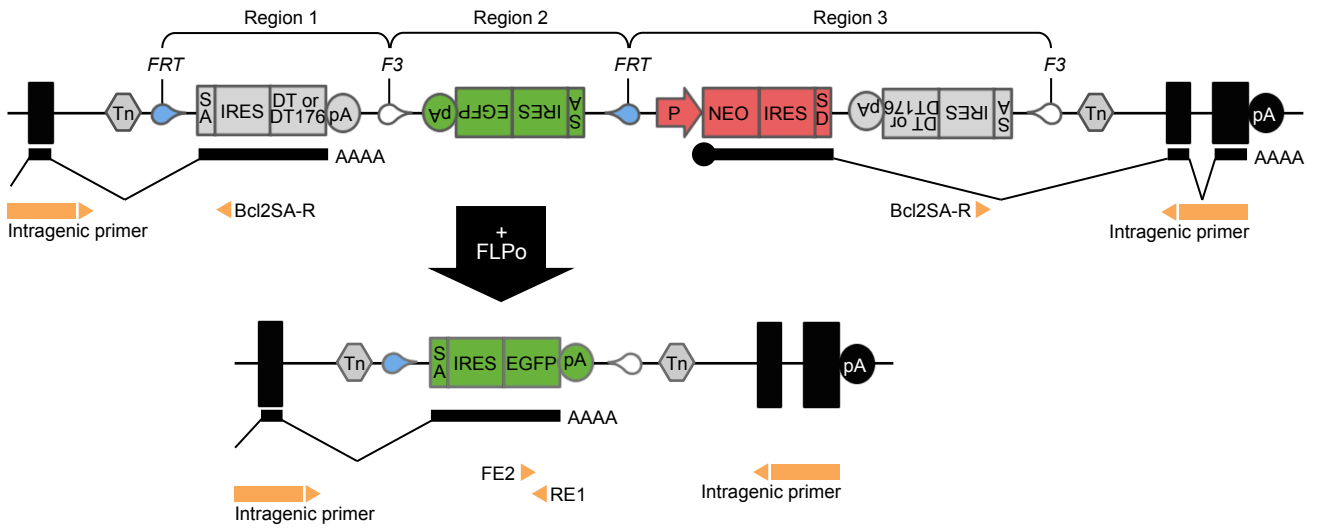


Figure 10. DTrapベクターのFLPoによる部位特異的組換え。DTrapベクターが挿入されたES細胞クローンに対し、FLPo組換え酵素を一過性に発現させることにより、EGFPカセット (Region 2) が不可逆的に反転し、その両側にあるDTカセット (Region 1) とNEOカセット (Region 3) の欠失が引き起こされる。

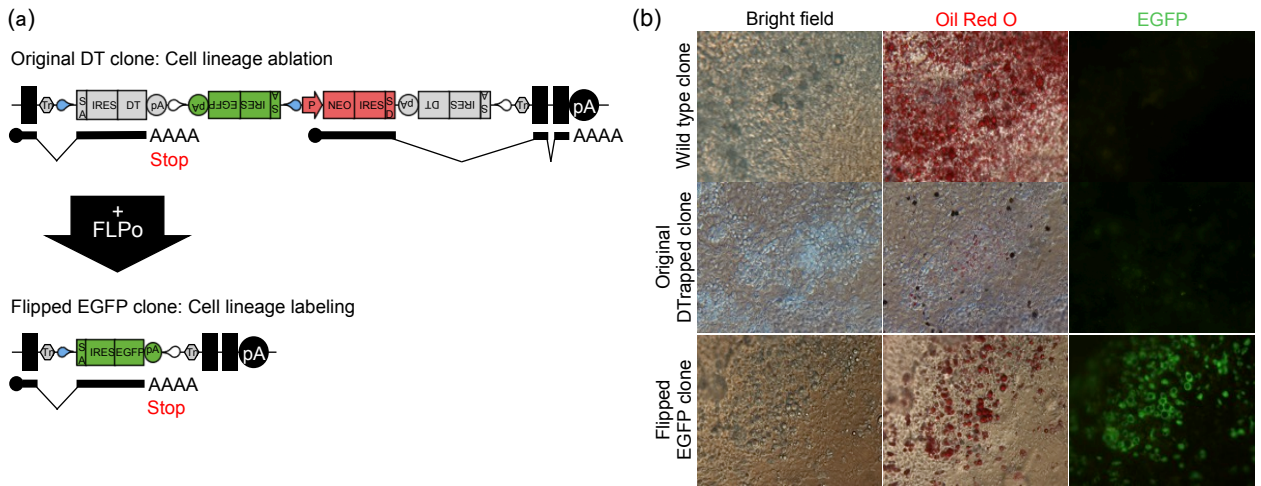


Figure 11. *Perilipin-1*遺伝子をトラップしたESクローンを用いた細胞レベルでのcell lineage ablationとcell lineage labeling実験。(a) *Perilipin-1*遺伝子の第1イントロン領域にdDT176ベクターが挿入されているオリジナルDTクローン (TM28-026)とそのEGFP発現クローンに対し、in vitroで脂肪細胞への分化誘導実験を行った。(b) 脂肪細胞への分化誘導に伴い、オリジナルDTクローンでは、DTの発現によって脂肪細胞が死滅するが、EGFP発現クローンでは、誘導された脂肪細胞にGFP蛍光が観察された。

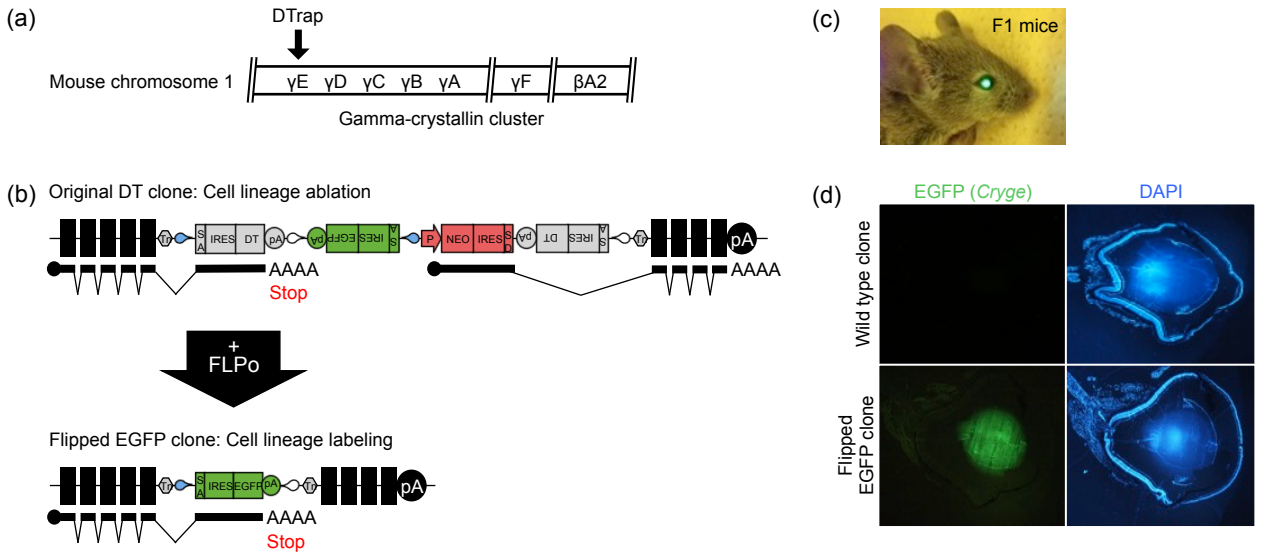
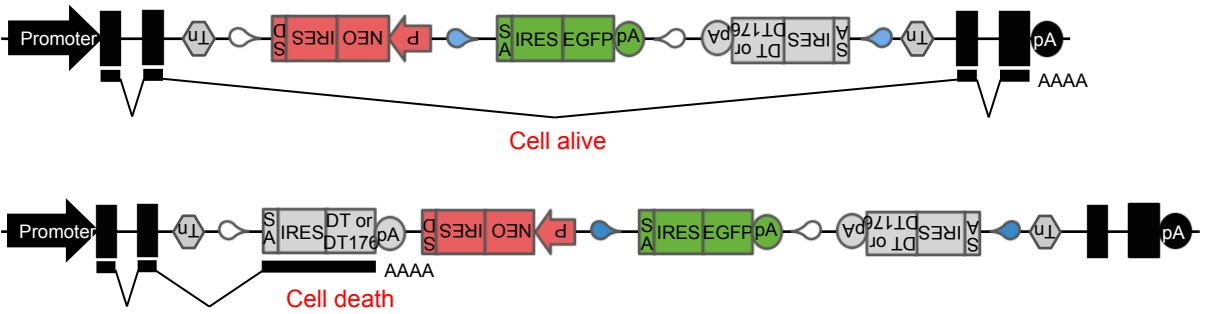
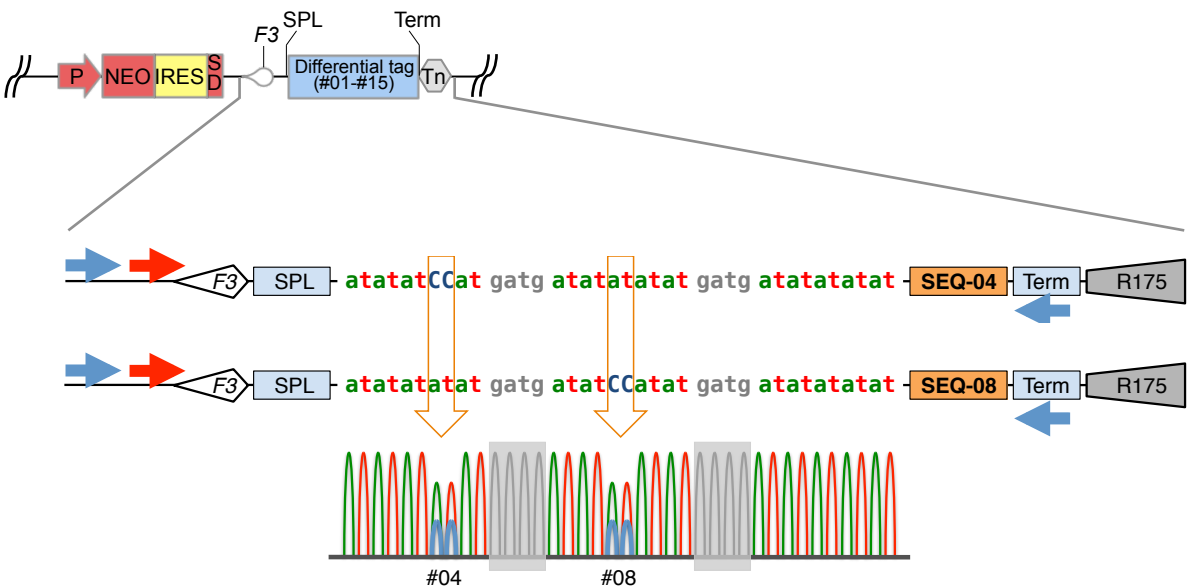


Figure 12. γE -crystallin (*Crye*)遺伝子をトラップしたESクローンを用いたマウス個体レベルでのcell lineage ablationとcell lineage labeling実験。
 (a)Crystallinファミリーは眼の水晶体に存在し、水晶体の透明性の維持等に関わる。
 (b)TM26-004クローンは*Crye*の第5イントロンがトラップされたクローンである。
 (c)と(d) *Crye*のEGFP発現クローン由来のキメラマウスF1個体では、*Crye*プロモーターの支配下にEGFPの発現が誘導され、眼球のレンズに限局して強いEGFP蛍光を確認した。

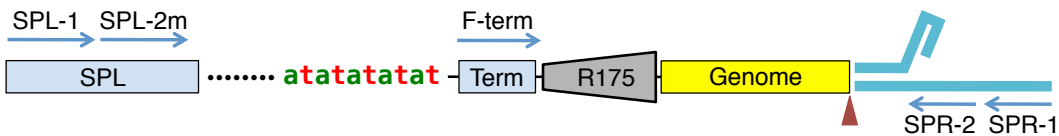
Active gene



Supplementary Figure 1. sDTもしくはsDT176ベクターが内在性遺伝子に対してアンチセンスの向きで挿入された場合、DTの発現による発現遺伝子の「負の選択」ができない。



Supplementary Figure 2. 標的細胞のゲノムに挿入されたベクター数とタグのID番号の解析。SPLとTerm間の配列は、at繰り返しとSEQ配列を組み合わせた異なるタグ#01-#15が配置されている。上記模式図は二つ(#04と#08)のトラップベクターが同時に標的細胞のゲノムに挿入されているシーケンシングデータを示す。



Supplementary Figure 3. Splinkerette PCRによるトラップベクターの挿入部位の同定。赤い三角印は青いへアピン構造のアプター配列と標的細胞ゲノムの結合部位を示す。

Table 1. Information of NCBI dbEST library.

Library 1882 (dbEST ID) (9,615 EST sequences)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?ORG=Mm&LID=1882>

Library 2512 (dbEST ID) (19,923 EST sequences)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?ORG=Mm&LID=2512>

Library 10023 (dbEST ID) (6,623 EST sequences)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?ORG=Mm&LID=10023>

Library 14556 (dbEST ID) (3,908 EST sequences)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?ORG=Mm&LID=14556>

Library 15703 (dbEST ID) (6,670 EST sequences)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?ORG=Mm&LID=15703>

Library 17907 (dbEST ID) (1,118 EST sequences)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?ORG=Mm&LID=17907>

Library 21037 (dbEST ID) (95,566 EST sequences)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/library.cgi?ORG=Mm&LID=21037>

Table 2. qRT-PCR primers for Non-DT and dDT176 vector trapped genes

For dDT176 vector trapped genes

Clone number	Symbol	Forward (5' -> 3')	Reverse (5' -> 3')
TM13-006	Ctss	CCATTGGGATCTCTGGAAG	TCATGCCCACTTGGTAGGTA
TM13-019	Gpr56	CTGCGGCAGATGGTCTACTTC	ATAGTGGAGGGTGCTCTGTTG
TM13-022	Itgam	GGGAGGACAAAACTGCCTCA	ACAACTAGGATCTTCGAGCAT
TM13-030	Caly	ACTCAGAGGAAGGACGCAG	TCTGGGCAGGTAAACTGGTC
TM13-036	Cryge	CTGACTACCAGCAGTGGATG	CTGTAGTCCTCTCGCTCGTAG
TM13-053	Ttn	GGCATCTCCAGGACGTTACTC	TTCACTCTGCCTTGAGGTTTAAG
TM13-056	Dnaic1	ACCGATGCGGAGTTAAAGGAG	CTGAAGTGAACCGCCATTTGG
TM13-064	Ern2	ATGGCGAGACCAGTCCAG	TCCGTCCAAGGTAGACAC
TM13-080	Trim15	AGCAAAGTCTCCCAGGAGG	TCTTCAGCTCGTACCTGCTC
TM13-117	Stac2	AAGGAGAATGAACCGGATGACG	GCGCTTAAATCGCTGGAGC
TM14-001	Limch1	TACGGTGGAAACCACACTGAA	TCGATGTAGCCACTGTCTCG
TM14-007	Cpne5	GATCACGGTGTCTATGCAGGAA	CTCTCGCCATTGCTTGTCTC
TM14-012	Kcnk18	AGTGGTTGAAGGTAGCAGGAA	CACAGGAACTTACCGAGCCT
TM14-019	Guca1a	CAGATGTTTCGAGACCTTTGAC	TGAAATACCAGCGCAACTTC
TM14-026	Cd3d	AGCGGGATTCTGGCTAGTCT	CGCTGGTATTGCAGGTCACAA
TM14-028	Pla2g4e	ATGGTGACAGACTCCTTCGAG	CCTCTGCGTAAAGCTGTGG
TM14-040	Grap2	AGGACGACGTTCCAGCACTTC	TGTCCGGTAGTAGTCCACCAG
TM14-047	Chi3l1	GTACAAGCTGGTCTGCTACTTC	ATGTGCTAAGCATGTTGTCCG
TM14-048	Mdga2	CATTGCTTCAGTAAGGAACGTGT	CCAAGAGCTTAATTGACGGAGAA
TM14-053	Sfpi1	ATGTTACAGGCGTGCAAAATGG	TGATCGCTATGGCTTTCTCCA
TM14-065	Chit1	TGGGCAGGTGTGATGACTCT	CCCTGGGAAAGAACCGAACTG
TM14-066	Tekt1	GCAATCTCCACCCAGTTCC	CTCTGCCACCAAGCGTTCA
TM14-068	Cd4	AGGTGATGGGACCTACCTCTC	GGGGCCACCACTTGAAGTAC
TM14-069	Zap70	CTACGTGCTGTCGTTGGTG	GTTACACGGCTTACGCAGGT
TM14-083	Ifitm1	GACAGCCACCACAATCAACAT	CCCAGGCAGCAGAAGTTCAT
TM14-085	Erp27	TGACCCATTACAATGTCACCAG	TTGGCAGCATCGAGATTTTCA
TM14-086	Trim17	CCTGACAAAAGTGGCTGAGAT	ACCACACAAATGGGGCTCTG
TM14-091	Klhl10	CCAGCCTCACATGGAAAGAAA	GCATTGAACTCGAAGCCATTGAC
TM14-123	Ttc39a	CTGGACCAGTGCATGACAG	GAGGTAGCTGAGTGCTTCTGA
TM14-131	Acsm4	ACTTAGATTCATCTGGCTTGCC	GGTAATGGCTTCTCACAGCGA
TM14-136	Htr1d	ATCACCGATGCCCTGGAGTA	GCCAGAAGAGTGGAGGGATG
TM14-149	Osbpl9	AATATACCAGCCTAGTCCCTTGG	CTGCTCTGACTTACACAAGTGA
TM14-166	Bdp1	TCACCTGTCATTAGTACATCGCA	AATGTGTGCTCATCGTAGAAGTT
TM14-178	Casq1	ATGAGAGCTACCGACAGGATG	CACCGTCGTAAGTACAGGGAAG
TM14-179	Tmem8b	GGTGGGACCTCGGTTTGTG	CCGCGTACAGGTAGTTGTG
TM14-183	Itgae	CCTGTGCAGCATGTAAAAGAATG	CAAGGATCGGCAGTTCAGATAC
TM14-204	Hmcn1	CTGGTGGCTCTTTTTCGTTCT	ACATGGACCCAGTACATCAA
TM14-224	Gucy2g	ATGCTAGTGACTTGTCTCGAAGC	CAGCTCACGTTCCCAAGACC
TM15-002	Igfbp6	CAACCCCGAGAGAACGAAGAG	TCTCCTTTGTAGTCTCCTCCG
TM15-005	Chrna1	CTCTCGACTGTTCTCCTGCTG	GTAGACCCACGGTACTTGTGA
TM15-014	Magix	GGTGTTAGTGGTCTGGATTCTG	GGGGTCGATGTTTACAAGAG
TM15-019	Cabp1	CTCTCAAGAAAGATGCGCCAG	GTGCATGACCGCACAGTTC
TM15-021	Ahi1	AGCCAGAACTCCAGAGAAGG	CTGATAGGCGTCCGTCAGTTC
TM15-024	S100a5	ATTCAGGGAGAGAGGGTAGCA	CTCTGCAAGACTCAGCTCTGT

For the Non-DT vector trapped genes

Clone number	Symbol	Forward (5' -> 3')	Reverse (5' -> 3')
TPM4-092	Shroom1	AGCGCCTCCCTTACCTAGAC	ACAGGTCGCTGAGTCGTTG
TPM4-102	Snap47	ATCTTCGGTGCGATCACAGTC	TCCAGAAATGTTGATGACGTTG
TPM4-134	Dot1l	GAGGCTCAAGTCGCCTGTG	GACCCACCGGATAGTCTC
TPM4-203	Slc7a6	GCCTGCGTATGTCTGCTG	GCCCATGATAATGATGGCAATG
TPM5-001	Ap2a2	ACAGATACACGGAAAAGCAG	ACCCATAAACGTAGGATTGCG
TPM5-002	Aff3	AATGCGTTACGGAGGAAAGAG	GTCTTGTAGGGTTCGCTGAAG
TPM5-024	Gm3417	GGCAGATgGAATATTGGCAG	GCTTCTACCCAGTTGTCCCA
TPM5-037	Abhd2	ATGAATGCCATGCTAGAGACCC	GTTCAAACACCGCACGATGA
TPM5-045	Etv6	AGCAGGAACGAATTTTCATACACG	GGCAGGTGGATCGAGTCTTC
TPM5-055	Acer2	TGTGGCATATTCTCATCTGCCT	CAATAAAAGCCCATTCTCGCTG
TPM5-076	Evi5	CACAGTATCGCATACAGTCAGTC	GGTGTGACAGTGTGGTAGATG
TPM5-084	Adar	GACATGGGTGTTGTCGTGAG	AGAAACCTGATGAAGCCCCT
TPM5-096	Slc39a14	GTGTCTCACTGATTAACCTGGC	AGAGCAGCGTTCCAATGGAC
TPM5-098	Ncor1	TATGGACCGGGTAGACCGAG	CGGTGTTTTTGTCCACAGGAG
TPM5-117	Egfem1	CGGGATGCCTGAAAGGGTTC	GCTTAGGTGGCAGAATCTTCCA
TPM5-119	Wdr5	TTTGAAGATTTGGGACGTGAGTT	ATGGGCAGGCAAAGTCTTGAG
TPM5-133	Sort1	CCCGGACTTCATCGCCAAG	AGGACGAGAATAACCCCAAGT
TPM5-157	Rftn1	ATGGGTTGCAGTTTGAACAAGC	GTCACATCTACTTTGGTCTCCAC
TPM5-164	Rimklb	CGGATCAGTGGAGAGCTAATCT	GTGGCGCAAACAGTAATATCAC
TPM5-184	Nubpl	GTTGGCTTGTTAGATGTGGATGT	GCGCAGTCTCTTCAACCAAAA
TPM5-185	Slc14a1	ATGAAGGAATTCGCCAACTG	GACCAGAAGTCCCACCAGAA
TPM5-189	FrmD8	TCCCACCGAAGTAGCGTCT	ATGGGCACTGATTGAGGACAA
TPM5-192	Zc3h7a	AAAGTGTGAGTATGTTGGCAACT	CCCGTTTTCTTTGCTACAGTGA
TPM5-203	Neur1b	TACCCTACAGTCCAGTTCTGAG	AAGGTCATGTCTGAATCGCTG
TPM6-011	Crhr1	GGAACCTCATCTCGGCTTTCA	GTTACGTGGAAGTAGTTGTAGGC
TPM6-090	Sncaip	AAGCCCCTGAATACCTTGATTTG	GCTGGGATGGTCTTGAGAGAG
TPM6-098	Cda	GATCTTCTCTGGGTGCAACATAG	CCTGAAATCCTTGACCTTCCG
TPM6-105	Nxn	GGAGATCGTCTTCGTGTCTTCG	GGAATGTTGGAGACTCGGTATTT
TPM6-181	Idh2	GGAGAAGCCGGTAGTGGAGAT	GGTCTGGTCACGGTTTGAA
TPM6-202	Krt71	ATGAGCCGCCAATTCACCTG	CTGCCCGGTAGGAGGATGA
TPM6-233	Mpz	CGGACAGGGAAATCTATGGTGC	TGGTAGCGCCAGGTAAAAGAG
TPM6-267	Dstn	GAGTTCAGGTTGCGGATGAAG	TGCACTGAGACAGAAAATGACAG
TPM6-295	Kifap3	GAGGACGCCAGATACCTCAA	TTTCTCCAAGAATGGTAGCTTCC
TPM6-356	Rprd1b	AGAATCGGCGCTGGAAAAGAA	CACGGAGACGATGGGTCCCT

Table 3. Intra-vector integrity and efficiency of the FLPo-mediated recombination

Clone number	Gene-trap vector	Gene identity	Gene symbol	Genebank accn number for trapped gene	Vector integration site	Total number of ESC-Derived ESTs	RNA-Seq (RPKM)	Intra-vector amplified region					Efficiency of the FLPo-mediated recombination	Gene specific primers for FPLo clones	
								1	2	3	4	5		Upstream	Downstream
TM13-006	dDT176	Cathepsin S preproprotein	Ctss	NM_021281	intron 4	0	0.000	+	+	+	+	+	Not performed		
TM13-030	dDT176	Neuron-specific vesicular protein calydon	Caly	NM_001190385	intron 1	0	0.000	+	+	+	+	+	Not performed		
TM14-040	dDT176	GRB2-related adaptor protein 2	Grap2	NM_010815	intron 1	0	0.000	+	+	+	+	+	86.7%	5'-CCATTGAGACACACCATACCCGAACTGTCATCC-3'	5'-CTTGAGCCACTCTCTGGTGTGCTTAG-3'
TM14-091	dDT176	Kelch-like 10 (Drosophila)	Klhl10	NM_025727	intron 2	0	0.637	+	+	+	+	+	62.1%	5'-ACGTGAAGCAGGAGGAGCGCATTCGAGG-3'	5'-ACGTGAAGCAGGAGGAGCGCATTCGAGG-3'
TM14-151	dDT176	RIKEN cDNA D630013G24 gene	D630013G24Rik	AK052650	intron 1	0	N/A	+	+	+	+	+	79.3%	5'-CAGAAAGTGCACATCAAACTGACGCTCACC-3'	5'-CGTACAGAAATCTGTTCTGCATCCACC-3'
TM14-188	dDT176	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	Ptpro	NM_011216	intron 2	0	0.000	+	+	+	+	+	86.7%	5'-TGGACAGAAAGGCGTACAGCATGAGTGA-3'	5'-TGTGTGACTCCAGCGGTGGCTGGCATCTGG-3'
TM14-193	dDT176	hemitecinin 2	Hmtn2	BC034076	intron 1	0	N/A	+	+	+	+	+	37.9%	5'-GACTGTGTGAAAGCTTATGACCTCAGCAGTC-3'	5'-CACTCATACACTCCAGCATCTCCAGGCTTCC-3'
TM14-197	dDT176	Apollipoprotein F	ApoF	NM_133987	exon 1 (UTR)	0	0.245	+	+	+	+	+	Not performed		
TM16-014	dDT176	X-ray radiation resistance associated 1	Xrra1	NM_001164258	intron 10	0	0.103	+	+	+	+	+	Not performed		
TM16-033	dDT176	Hematopoietic cell specific Lyn substrate 1	Hcls1	NM_008225	exon 10	0	0.050	+	+	+	+	+	91.7%	5'-TTCCCTGTTTGTGTCTGCAGCCTCCAGTGG-3'	5'-TTCCTGGGCTCATCTTTTACCA CAGGCTTTTCG-3'
TM16-111	dDT176	Tumor suppressor candidate 5	Tusc5	NM_177709	intron 1	0	0.000	+	+	+	+	+	Not performed		
TM16-146	dDT176	Cardiotropin-like cytokine factor 1	Cicf1	AA015243	intron 2	0	0.206	+	+	+	+	+	22.0%	5'-GGCATTCTGTGCTCTGCTCTCTGTCACAGG-3'	5'-TGTGCGGAGTTCTAAGCATCTCCACATGC-3'
TM16-160	dDT176	gap junction protein, alpha 5	Gja5	AK038780	intron 1	0	0.021	+	+	+	+	+	44.4%	5'-GCTGCCACACCTTACAAATGTCAGTAGTC-3'	5'-ATGACTGACCCAGGAGTATGATGCTCTGGA-3'
TM16-162	dDT176	Chemokine (C-X3-C) receptor 1	Cx3cr1	NM_009987	intron 1	0	0.000	+	+	+	+	+	Not performed		
TM16-182	dDT176	Adhesion molecule, interacts with CXADR antigen 1	Amlca1	NM_001005421	intron 6	0	0.055	+	+	+	+	+	Not performed		
TM16-188	dDT176	RIKEN cDNA CS30008M17 gene	C530008M17Rik	AK016430	intron 2	0	0.291	+	+	+	+	+	85.7%	5'-TCAACCGTGCAGGCTGTTGAGAGCCTTCAGAC-3'	5'-AGAAGAGGGTGTGGATACCCCTGGGACTGG-3'
TM28-008	dDT176	Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1-like 1	Gdap11	NM_144891	intron 1	1	0.510	+	+	+	+	+	83.3%	5'-TCCACCAGGTACAGTCAACA-3'	5'-ATCTGCAGAGCCAGAGAAA-3'
TM28-026	dDT176	Perilipin-1	Plin1	NM_00113471	intron 5	0	0.000	+	+	+	+	+	100.0%	5'-GCTTACTGGCCCTGCTCTG-3'	5'-ATGTGACATTTTGGGGGAAA-3'
TM28-030	dDT176	Transient receptor potential cation channel subfamily M member 3	Trpm3	NM_001035240	intron 19	1	0.000	+	+	+	+	+	72.0%	5'-CTGGCGTATATTGGATACCTGATGCTCTTC-3'	5'-AAGTCTATGA GGGCAGGGGC AGCCATGATC-3'
TM18-042	dDT176	Pyruvate dehydrogenase kinase, isoenzyme 1	Pdk1	NM_172865	intron 8	23	55.585	-	-	-	-	-	Not performed		
TM15-064	dDT176	Proleasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 14	Psm14	NM_021526	intron 2	26	131.876	-	-	-	-	-	Not performed		
TM18-047	dDT176	Basigin	Bsg	BI415956	intron 6	47	140.352	+	+	+	+	+	Not performed		
TM16-047	dDT176	Cell division cycle 5-like (S. pombe)	Cdc5l	NM_152810	intron 14	13	154.706	-	-	-	-	-	Not performed		
TM16-056	dDT176	Ubiquinol-cytochrome c reductase core protein 1	Uqcrc1	AA518728	intron 1	31	198.697	+	+	+	+	+	Not performed		
TM25-002	dDT	N/A						-	-	-	-	-			
TM25-004	dDT	N/A						-	-	-	-	-			
TM25-007	dDT	N/A						-	-	-	-	-			
TM25-010	dDT	N/A						-	-	-	-	-			
TM25-012	dDT	N/A						-	-	-	-	-			
TM26-004	dDT	Gamma-crystallin E	Cryge	NM_007777	intron 1	0	0.306	+	+	+	+	+	100.0%	5'-TCAACAGCACATATCCCATCCGACCTGCC-3'	5'-GTCACCTGAAACCCCATCCACTGCTGGTAGTC-3'
TM26-005	dDT	N/A						+	+	+	+	+			
TM26-026	dDT	N/A						+	+	+	+	+			