

新世代のジーンターゲティング：その問題点と展望

崎村建司, 阿部学, 山崎真弥, 薄井宏

ノックアウトマウスに代表される遺伝子改変動物は、生命現象を分子レベルで解析する生命科学においてなくてはならないリソースである。一方、単純なノックアウトマウスでは解決できない問題点も指摘され、新たな方法の開発も進んでいる。第2世代のノックアウト法とC57BL/6由来ES細胞を用いた遺伝子組換えマウス作成法を紹介すると共に、現在世界で進んでいる網羅的ノックアウトマウスの動向を解説する。

はじめに

トランスジェニックマウスから始まった遺伝子改変動物は、1990年代にES細胞を用いた相同遺伝子組換え法が実用化され、現在では生命科学のなくてはならない研究材料となっている。とりわけ、特定の遺伝子を欠損できるノックアウトマウスは、それまで不可能であった分子の働きを個体で検証することができ、生命科学の研究方法に革新的な変化を引き起こしたといっても過言ではない。一方、この手法の限界も様々に指摘されるようになってきた。例えば、解析対象遺伝子の欠損が致死となる場合は、成体での解析が不可能である。さらに、一般的にノックアウトマウス作成に利用されているES細胞は129系統由来のものであるが、このマウスには免疫の異常や脳の奇形など様々な問題があり、多大な時間と労力が必要な戻し交配を行って解析する必要がある。これらの問題を解決するために、第2世代のノックアウト法と呼ばれるコンディショナルノックアウト法の開発や129系統以外のマウスES細胞の樹立が進められてきたが、技術的な問題も多くいまだ一般的な実験方法とはなっていないのが現状である。本小論では、我々が開発したC57BL/6 ES細胞を用いたコンディショナ

ルノックアウトマウス作成方法を中心に、多くの研究者がつまりずく遺伝子改変動物作成の問題点とその解決法を概説すると共に、今後の研究の方向も展望する。

1. 発生工学の基礎

遺伝子改変動物を作成するためには、各発生段階の胚の採取や、体外での培養、さらに偽妊娠した仮親の卵管や子宮への胚の移植など発生工学の手法を用いなければならない。この研究分野の人には当たり前のことであるが、意外と知られていないことも多いので、最初にマウス発生工学と呼ばれる一連の技術の概要をみてみよう。一般に哺乳類の発生工学と呼ばれるのは、卵母細胞から着床するまでの胚を対象にしている(図1)。多くの人は、卵子と精子が受精し受精卵ができるとそこに一つの個体ができたと考えてしまうが、未受精卵から胚盤胞までの胚は、この考えから逸脱した性質を示す。例えば、2細胞期、4細胞期の胚の細胞は分割するとそれぞれの割球から別々の個体に発生することが可能である。1卵生双生児は、2細胞期の胚が何らかの理由で分離し、別々に個体発生したものであることは良く知られている。逆に、この時期の胚を形成する細胞は、融合すると一つの個体に発生する。例えば8細胞期の胚から透明体を除き2個、あるいは3個の胚を接触させると一つの塊になり、1個の胚として発生し子供になる。最初融合させた胚は大きいですが、発生の過程で細胞数は一定の量になるので特別大きな子供が生まれるわけではない。また、胚盤胞の内部細胞塊と呼ばれる将来体細胞を形成する細胞は、他の胚盤胞に入れると融合して一つの個体として発生する。これらの個体の体は、複数の細胞が入り子になった状態でありキメラ動物と呼ばれる。白い体色を持つ

新潟大学脳研究所細胞神経生物学分野 (〒951-8585 新潟市旭町通1-757)

A new-generation gene targeting technique: Its problem and prospect

Kenji Sakimura, Manabu Abe, Maya Yamazaki and Hiroshi Usui (Department of Cellular Neurobiology, Brain Research Institute, Niigata University, Asahimachi-dori 1-757, Niigata 951-8585, Japan)

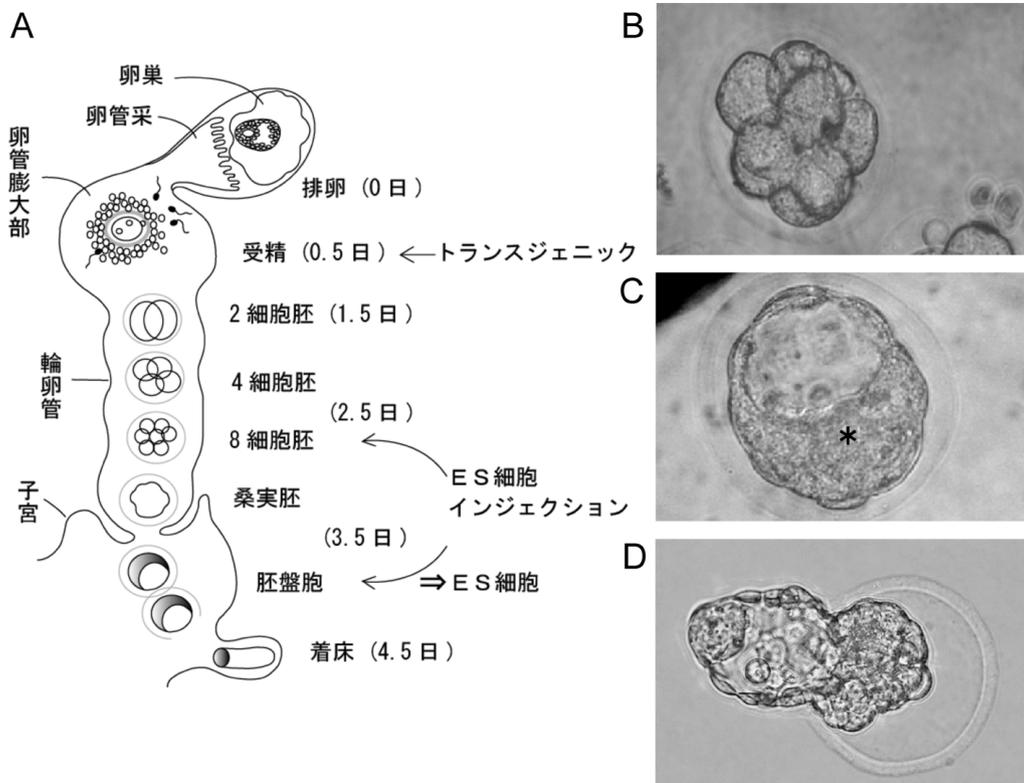


図1 発生工学の対象になるマウス発生初期
A, 排卵から着床まで. B-D, それぞれ8細胞期, 胚盤胞, 脱出胚. *は内部細胞塊を示す.

たマウス胚と黒い体色を持ったマウス胚を融合させ、その胚を偽妊娠したマウスの子宮に移植すると白黒まだらの産子が得られる。白黒の割合は、融合したそれぞれの胚の貢献度合により変わるが、これらの動物の体は2種類のマウス由来の細胞が混在して構成している。遺伝的には、細胞ごとに異なった性質を持つことになるので、遺伝する形質は生殖細胞に分化した細胞の形質を持つことになる。キメラマウスは、複数の胚由来の細胞から一つの個体を作成する方法であり、詳細に後述するが、ES細胞からマウスを作る最も大切な過程である。また、この方法を用いて、そのままでは致死になる遺伝子異常を持つ胚と正常胚のキメラを作成することにより、発生過程での異常を回避して、遺伝子異常による表現型を成体で解析することができる¹⁾。ただ、キメラ率のコントロールは意外と難しいので、多くの個体を作成して解析する必要がある。

現在研究対象とされるほとんどの遺伝子改変動物は、着床する前までの時期の胚を用いて作成する。主な手法のトランスジェニックマウスは、外来遺伝子(cDNA, 遺伝子DNA, 合成DNA)を受精直後の胚の雄核に直接注入して作成する。発現させたい領域で転写活性を持つプロモーターの下流に外来遺伝子をつなぎ、そのDNA断片を胚の遺伝子に取り込ませることにより、目的の遺伝子を発現する個体を得る。DNAの導入方法は、受精卵への直接イン

ジェクションの他、ウイルスベクターを用いたものや精子を対象にした導入法など多様な方法が開発されている²⁾。通常、DNAを導入した胚を仮親^{脚注1)}の卵管か子宮に移植し産子を得る。また、一般にクローン動物と呼ばれるのは、卵母細胞あるいは受精卵から核をマイクロマニピュレーションにより除き(除核)、そこに他の体細胞核を移入した胚を培養し、正常に発生が進んだものを偽妊娠した仮親に移植した産子である³⁾。特定の形質を持つ個体から生殖系列を介さないで遺伝子を継承できる利点はあるが、技術的に難しくその成功率は高くない。これらキメラ、トランスジェニック、クローンという各技術は胚を直接の対象としたものだが、ノックアウトマウスの作成には少し異なった過程が含まれる。

2. ノックアウトマウスの作成法

ノックアウトマウスの作成は、三つの鍵になる発明があり初めて可能になった。胚性幹細胞(embryonic stem cells; ES細胞)の樹立、培養細胞での相同組換えとその同定、ES細胞からキメラマウスを作る手法の三つである。ES細胞は胚盤胞の内部細胞塊を起源とする株化細胞であり、す

脚注1) あらかじめ精管を結さくした雄と交配させ偽妊娠した雌のマウス

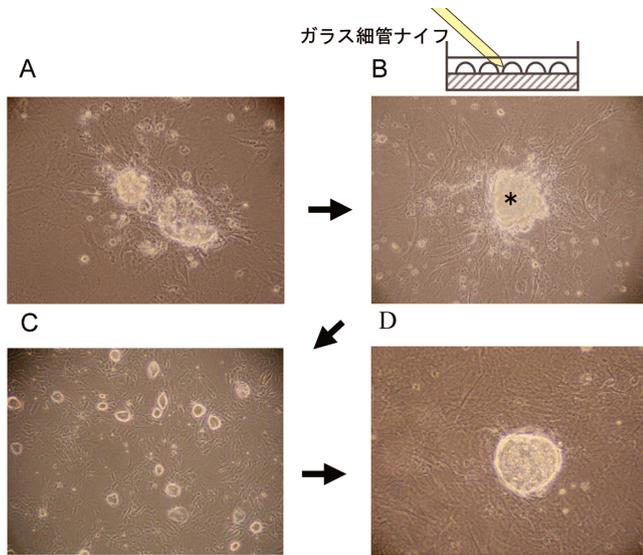


図2 C57BL/6 胚からの ES 細胞 RENKA 株の樹立
 A, フィーダー細胞上に静置した胚の分化増殖. 8 細胞期の胚から分化した細胞塊. 透明体がはずれ増殖を始めたもの (右下) と透明体をかぶったもの (左上). B, 成長する内部細胞塊. (*) の部分を鋭利なガラスキャピラリーで採取する. C, 内部細胞塊由来のコロニー. 内部細胞塊をトリプシンで分散しフィーダー細胞上に播種し, 単独の細胞からコロニーを形成させる. 形が均一で増殖速度が一定なコロニーを選び再分散させる. D, 樹立した RENKA 細胞のコロニー. 円形のコロニーで境界が明瞭であり, フィーダー細胞との境界に形の異なった細胞が存在しない.

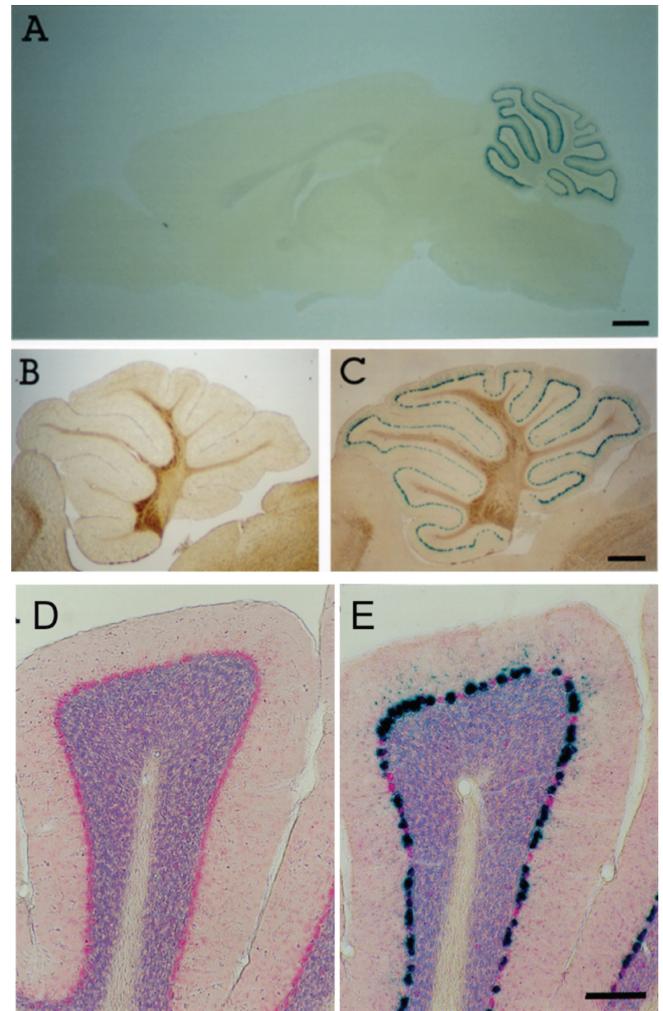


図4 誘導型 CrePR によるプルキンエ細胞特異的の遺伝子組換えマウス D2CPR

Cre リコンビナーゼ活性依存的に β ガラクトシダーゼが発現するレポーターマウスと D2CPR を交配させ, 両者の遺伝子を持つマウスに RU486 を投与したもの. A, 小脳プルキンエ細胞層に局限した β ガラクトシダーゼ活性が見られる. B, 誘導前の小脳と C, 誘導後 4 週間の小脳. D, E, 強拡大, プルキンエ細胞に局限した組換えが認められる.

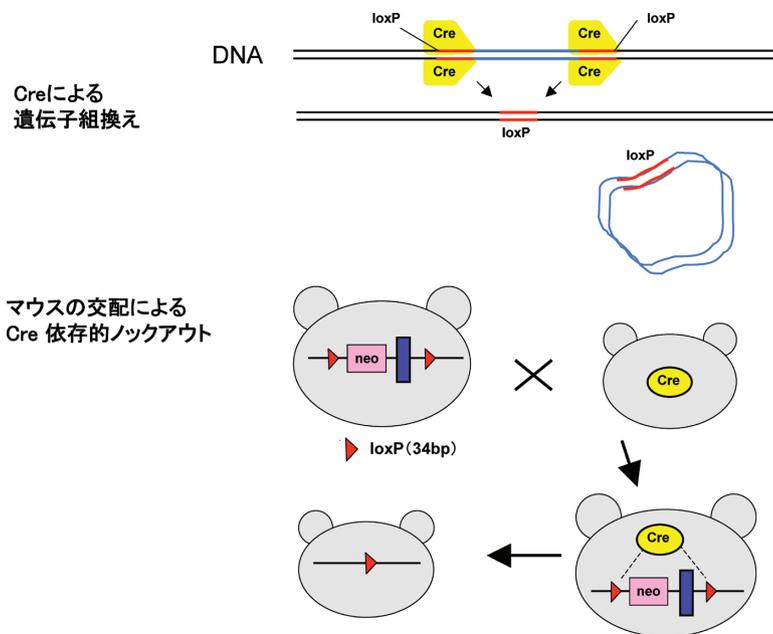


図3 Cre/loxP 組換え系による遺伝子ノックアウト
 Cre リコンビナーゼ (Cre) は loxP と呼ばれる 34bp からなる配列に結合し, loxP 間での組換えを触媒する. この反応は双方向に起こるが, 通常遺伝子上では切り出される方向にしか進まない. あらかじめ標的遺伝子に loxP 配列を持つ flox マウスを相同組換え法により作出し, Cre リコンビナーゼを解析したい部位で発現する Cre マウスと交配することにより, 標的遺伝子を目的の部位で選択的にノックアウトすることができる.

すべての細胞に分化する能力を持ち、生殖細胞にもなる。逆に多分化能を失った細胞は、いかに形態やES細胞に特異的なマーカーを発現していたとしても、それはすでにES細胞ではない。この細胞の樹立にはES細胞を見分ける眼と根気、さらに少しの幸運が必要である。このような言葉は非科学的であると思われるかもしれないが、この分野の研究では細胞を生き物であると正しく認識し、いたわってやる心が重要な要素である。ES細胞を樹立した報告は様々あるが、我々がC57BL/6系統マウス胚から樹立した方法は、フィーダー細胞^{脚注2)}と呼ぶ細胞の上に2.5日胚(4-8細胞期)を静置するところから始めた。培地には分化を抑制する目的でLIF(leukemia inhibitory factor)を添加する。しばらく培養を続けると胚は発生を続け、その幾つかは透明体を脱ぎ捨てあたかも着床するようにフィーダー細胞上で増殖を始める。この時盛り上がった内部細胞塊部分を鋭利なキャピラリーで採取し、トリプシンで分散させ再びフィーダー細胞上に播種する。位相差顕微鏡で見て、コロニーの縁が滑らかに光っている円形のをピックアップし再び分散、播種を繰り返す。2-3回この操作を繰り返し、生育速度が一定で、円形の均一コロニーのみができる株を樹立した。図2に示したのは、我々がC57BL/6N系統の胚から樹立したRENKAと名付けた細胞株である。マウスES細胞は、凝集し盛り上がったコロニーを形成するが、分散させると円形で、細胞質は乏しく細胞周期によりその大きさが変る。ES細胞は、生殖系列細胞に分化する能力を持つことが確認できて初めてES細胞と同定されるので、その樹立の過程では、ES細胞様の形態を持つものを見分ける目が要求される。この点は客観的な記述が困難であり、経験の要求される部分である。

ES細胞上で特定の遺伝子を標的に改変を行うために相同組換え法が開発されてきた。この方法の要点は、変異を入れたい遺伝子部分をはさむ形で両側の遺伝子配列を持つ相同組換えベクターを構築し、その中に組換え体を選別する薬剤選択マーカーを入れる(図6C参照)。通常この目的のためにネオマイシン耐性遺伝子やピューロマイシン耐性遺伝子が使用される。さらに領域の外に非特異的な取り込みを防ぐために、取り込みにより細胞死をもたらす遺伝子を結合する。この目的で、TK(チミジンキナーゼ)やDT(ジフテリア毒素A鎖)が用いられることが一般的である。相同組換えを起こしたクローンをスクリーニングするのはPCRでも良いが、最終的にはサザンプロットハイブリダイゼーションにより目的の組換えが起こっていることを複数のプローブと酵素で必ず確認することが必須であ

る。ターゲティングベクターの導入により、目的の相同組換え以外の様々なことが遺伝子上で起こる。単純なランダムインテグレーションが最も多いが、標的とした遺伝子の部分的多重化やベクター近傍での欠損など予期しないものもある。したがってこの段階の確認を十分しないとマウスができてから目的のものと違うと泣くことになる。経験したほとんどの失敗例は、サザンプロットの結果を自分の都合で解釈した場合である。バンドのサイズや濃さが予想と異なる場合は、慎重に対処することが重要である。

ES細胞をいくら培養しても個体ができるわけではなく、胚の助けを借りて初めてES細胞由来の体を持つキメラマウスが作成できる。このために胚盤胞の内腔あるいは8細胞期胚へES細胞をインジェクションするか、透明体をのぞいた8細胞期胚とES細胞のアグリゲーションによりキメラ胚を作成する。これらの胚を偽妊娠した仮親の子宮に移植してキメラ個体を得る。これらのキメラでES細胞の寄与が高いもの(通常は体毛色で判断する)を交配させ、生殖系列にES細胞の形質を持った個体を選別する。この段階がノックアウトマウスを作成する上でネックになる部分である。ES細胞が生殖系列に入るためには、未分化の状態であることが肝要である。ES細胞は少しでも分化の方向に行くと、形態的にはキメラマウスには成るが、生殖細胞に入らないという特性を示す。明らかに形態やカリオタイプが変わってしまった細胞は問題外であるが、一見何も変わらない細胞でもその培養過程で手を抜くと生殖系列に入らなくなる。また、ES細胞の寄与率の高いキメラマウスを作ることも大切な技術であるが、ここにも注意を要する点がある。何も処理していないES細胞株の成長速度は一定であるので、高いキメラ率の個体を作成するために宿主胚に注入するES細胞の数はあらかじめ定めたものでよい。しかし、実際の組換えを起こしたES細胞は、エレクトロポレーションのような処理や凍結操作などを経ることにより、その成長速度などの特性が変化することが多い。したがって、注入する細胞数を3段階ぐらいの幅を持たせることにより、一定の成績が得られる。もう一つ注意を要する点は、胚にES細胞を注入する操作時間である。顕微鏡のステージの上は、胚にとってもES細胞にとっても過酷な条件であるので、この時間をなるべく短くすることがその後の成績に影響する。面倒がらずに少数の胚での操作を繰り返すことである。生まれたての子供を冷たい机の上に何分も放置する人はいない。

あらかじめES細胞を移植する胚に操作を加えてキメラ作成効率を高める方法が開発されている。この方法では2細胞期の胚を採取し、電気的な手法でこれらの細胞を融合させて1細胞にしてしまう。この胚は4nの染色体を持ち胚の発生が途中で停止するので、この胚をES細胞の宿主として利用すると、注入したES細胞由来の細胞だけが産

脚注2) 栄養因子の供給や分化抑制を目的として分裂能をマイトマイシンCやX線照射により抑制した線維芽細胞など

子にまでなる⁴⁾。この方法は、手間もかかり注入胚の数に比して産子まで生育する割合が低いが、生殖系列には入りにくいES細胞からキメラを得るには有用である（これで生殖系列に入らなければあきらめつく）。

3. ノックアウトマウスの問題点

ここまでノックアウトマウス作成の実際を述べてきたが、苦勞して作ったノックアウトマウスには様々なことが起こり簡単に解析に進めないことも多い。最大の問題は、目的の遺伝子の欠損により個体の発生が途中で止まってしまい、解析できないことである。これまで通常行われてきた遺伝子ノックアウトは、標的とする遺伝子の一部を欠損させるか、薬剤選択マーカーカセットを挿入することで遺伝子機能を破壊するものであった。これらの方法で遺伝子破壊を起こすと発生の初期より分子欠損が全身で起こる。このことは、ノックアウトした分子が生存に必須なものであれば、発生の途中で死亡することを意味する。さらに、この分子が欠損したままで生存した場合、生体はあらゆる系を駆使して、欠損した分子の機能を補おうとする。正常発達とは異なったスキームで恒常性を維持している可能性がある。とりわけ組織の形成などに影響する分子の場合などでは、その表現型の解釈に注意を要する。神経系の研究では、神経細胞のネットワーク形成に異常があると、成体での解析結果の解釈が困難になる。

さらにもう一つの大きな問題は遺伝子背景の問題である。これまで作成された数千系統のノックアウトマウスのほとんどは129系統由来のES細胞が用いられている。C57BL/6由来ES細胞や、わが国で樹立されたTT2など他の系統由来のものも報告されているが⁵⁻⁷⁾、実際にマウスが作製されているものはそれほど多くはない。その理由は129系統以外のES細胞では生殖系列遺伝するキメラが作りにくいからである。しかし、129系統のマウスには前述したように、脳梁の形成不全など脳に奇形がある他、免疫系にも異常があることが報告されている^{8,9)}。さらにこのマウスは、交配が困難なこともあり、C57BL/6マウスに戻し交配して解析されるのが普通である。戻し交配は、長い時間と労力ばかりでなく多額の経費と飼育スペースを要する。さらに重要なことは、ノックアウトマウスの場合、遺伝子改変部位に注目して戻し交配を行うので、通常であれば10代交配すれば2の10乗分の1に減少する元の遺伝子が、変異した部分を常に選択する方法では、その近傍は組換えでしか入れ替わらない。たとえ12代戻し交配しても6センチモルガン程度の遺伝子が残る計算になる。この量はマウスではおよそ250から300遺伝子の数に相当する。したがって、ノックアウトした遺伝子の近傍には、相当な回数戻し交配をした個体でも129系統由来の遺伝子が約1%程度残ることになる。これだけの遺伝子が残ってい

るので、その解釈には注意が必要である。この問題を解決するためには最初からC57BL/6系統のES細胞を用いれば良いと誰しも思う。しかし、これまでに最も多く使用されてきたC57BL/6系統のES細胞Bruce4とBL/6-IIIからも、樹立から10年以上経った2004年までに、わずか38系統しか報告されていない¹⁰⁾。

4. C57BL/6由来ES細胞RENKAの樹立

遺伝子背景の問題を解決するには、129系統以外の近交系マウス、例えばC57BL/6系統のES細胞から高い効率で生殖系列遺伝するキメラマウスを作る方法が確立できればよい。命題はごく単純であるが、実際には前述のように生殖系列に効率よく入るES細胞は入手できなかった。そこで我々は約10年前に自分たちで独自にES細胞樹立から取り組みを始めた。その結果、C57BL/6系統マウス胚を培養すると、内部細胞塊からは比較的簡単にES細胞状態の細胞は樹立できることがわかった。しかしこれらの細胞を他系統の胚に移植して作成したキメラ動物において、生殖細胞に分化するものの割合は129系統に比較して低い。さらに、樹立直後の継代数の少ない細胞はそれでも生殖細胞遺伝キメラを作るが、継代を重ねるに従いその割合は低下していく。また、ノックアウトマウスを作成するために相同組換えクローンを単離する操作も生殖系列に入る割合を低下させることが明らかになった。これらの点を解決すべく幾つかの改良を行ってきた。

まず継代により生殖系列に入る割合が低下しにくい細胞の樹立方法とその培養条件について検討を加えた。我々の樹立したES細胞株RENKAは、C57BL/6N系統由来のものであるが、その未分化状態を保つために、フィーダー細胞とLIFを要求する。また、最も重要なことは、血清のロットであった。通常、血清のロットチェックでは、細胞に対する毒性や成長速度に関する事項、さらにLIF不添加の状態での分化細胞の出現とカリオタイプの逸脱を起こさないことなどを指標にして選択を行うが、これだけでは不十分である。最も大切な点は、評価対象の血清で培養した細胞が生殖系列遺伝キメラを作る能力があることを確認することである。したがって、このチェックだけでも最低15週間程度かかってしまう。このようなチェックを行うと、ES細胞用と銘打っているものでもRENKA細胞に適合しないものが存在する。成績の良い血清はあまり多くないのが現状である。また、GIBCO BRLブランドのKnockout Serum Replacementと称する血清に代わる添加剤が市販されている。この添加剤も血清に代わりES細胞の培養に使えるが、ロット間での差があるのでチェックは必須である。この添加剤は人工合成なのでロット間の差がないことが謳われているが、少なくともRENKA細胞では大きな違いがある。これは構成する成分にロット間の差がある生物製剤

が混和されているためと思われる。

RENKA細胞を未分化の状態に保つには、基本的な操作を忠実にやることに尽きる。129系統ES細胞に比べC57BL/6由来ES細胞は分化し易いので、細胞に不必要な刺激を与えないことである。例えば急激な温度変化や、栄養状態の変化、高い細胞密度などである。具体的には、使用する培地のpHや温度を適切な条件にしておくことや、培地交換のタイミングを決して遅らせないことである。また、オーバーグロースにならないように早めに継代してやることも重要な点である。ES細胞は同一プールから拾ったものでも、クローンごとに特性に違いがあると考え、常に状態を観察する必要がある。129系統ES細胞では問題にならない些細なことがC57BL/6系統ES細胞では致命的な変化を引き起こす。もちろん形態的な変化を引き起こす操作などは問題外だが、小さな問題の積み重ねが結果として生殖系列に入らないという現象に行き着くのである。人間は、翌日に起こる変化には対処しやすいが、数カ月後にマウスが生まれないということを想像するのは難しい。「ま、いいか」が命取りになる。

相同組換えの操作は、ES細胞にとって過酷な処理である。エレクトロポレーションにより細胞に穴を開けてベクター遺伝子を導入したり、薬剤選択によるクローニングの過程、さらに凍結保存など細胞にとってのストレスに曝すことになる。この過程でES細胞が生殖細胞に分化する能力がある割合で失っていくのは避けられない。このことを最小限にするためには、上記の細胞培養の基本と共にいくつかのポイントがある。コロニーピッキングや細胞の凍結を行う時間をなるべく短時間にすることである。これも前述の問題と共通するが、インキュベーターから外に出された細胞は、非常に大きなストレスを受けているという認識である。なるべくダメージを少なくするために、こまめにインキュベーターに戻す必要がある。細胞凍結を行うときには、凍結するフリーザーの中にドライアイスを入れておかないことも重要である(pH変化を起こしやすい)。さらに細胞の保存は -150°C 以下で行う。マイナス 80°C は長期の保存には向かない。また、細胞の運搬などでもドライアイスを使わないで液体窒素の容器で行うことも成績向上につながる。

5. コンディショナルノックアウト

通常のノックアウトマウスで問題になる発生途中の分子欠損の影響を避けるには、臓器や細胞に特異的にかつ発達の時期選択的に遺伝子発現を調節できればよい。第2世代のノックアウト法とかコンディショナルノックアウト法と呼ばれるこの手法は、世界中での様々な取り組みの結果、Cre/loxP組換え系を用いたノックアウト法とテトラサイクリン応答遺伝子を用いた発現制御法が実用化レベルにある

と言える。

Cre/loxP組換え系とは、P1ファージの酵素であるCreリコンビナーゼが、loxPと称する34bpからなる配列を認識し、loxP間での組換えを引き起こす反応を用いて遺伝子欠損を誘導するものである(図3)。この方法では、標的とする遺伝子の機能を担うエキソンを挟むイントロン部分に2個のloxP配列を同じ向きに挿入した標的マウスをあらかじめ相同組換え法により作成する。このように標的遺伝子にloxP配列を持つものは、floxedマウスと呼ばれている。このfloxedマウスとCreリコンビナーゼを発現しているマウスを交配させると、Creリコンビナーゼが発現している細胞でのみ選択的に組換えが起こることを利用し、遺伝子の欠損を誘導する。Creリコンビナーゼを発現するマウスをCreマウスと呼び、コンディショナルターゲティングを行う上で鍵を握る動物であるが、Creリコンビナーゼは、細胞内で一定の濃度にならないとその活性を發揮できない。しかし、特定の細胞に選択性高くかつ高濃度でCreリコンビナーゼを発現するマウス系統はそれほど多くはない。通常これらのマウスは、細胞特異的な発現をする遺伝子プロモーターを利用したトランスジェニックの手法で作成されるが、トランスジェニックマウスは、ランダムに遺伝子に組み込まれるために、挿入された場所によりそのプロモーターの調節が影響を受ける。その結果、想定した場所での発現が起こらなかったり、発現量が低いという、これまで多くのトランスジェニックマウスの場合と同じ問題に直面することになる。

この問題を解決する方法として、ノックイン法と呼ばれる方法によりCreリコンビナーゼ発現マウスを作る方法がある。この方法では、解析したい細胞に特異的な発現をする遺伝子の開始メチオニンにフレームを合わせてCreリコンビナーゼを挿入したマウスを相同組換え法により作成する。この方法で作成したCreマウスは、ほとんどの場合挿入された遺伝子発現に近い分布でCreリコンビナーゼが発現するため、ノックインマウスを作る手間を差し引いてもトランスジェニック法より歩留まりが良い。ただこのマウスの欠点は、Creリコンビナーゼを発現させる遺伝子がノックアウトされるので、ヘテロ欠損で影響がない遺伝子を選択して使う必要があることである。もう一つの方法は、BAC(bacterial artificial chromosome)クローンをを用いたトランスジェニックマウスである^{11,12)}。ノックイン法と同様に解析したい細胞に特異的な発現をする遺伝子の開始メチオニンにフレームを合わせてCreリコンビナーゼを挿入したBACクローンを相同組換えにより大腸菌の中で作成する。このBACにコードされている100-200kbの長さの遺伝子断片を用いてトランスジェニックマウスを作成する。この方法を用いると、ノックイン法に近い効率で細胞特異的な発現をするマウス個体が取れるのがメリットであ

り、今後利用が増えることが期待される。技術的には、BACクローンからトランスジーンを効率よく切り出すのにパルスフィールド電気泳動装置が必要である。さらにウイルスベクターで特定の細胞をねらい Cre リコンビナーゼを発現する方法¹³⁾、胎児期の個体で電気穿孔法により特定の領域で Cre リコンビナーゼを発現する方法¹⁴⁾なども開発されている。解析目的に合わせてこれらの手法を使い分ける必要があるが、いずれにしても単純な交配より難しいので経験のあるラボで教を請うことが成功の秘訣である。

組換えの部位特異性は、利用するプロモーターの発現特異性で規定されるが、時期特異性については、Cre リコンビナーゼの活性を薬物で制御する方法が考案されている。実用レベルと言えるのは、ステロイドホルモン受容体と Cre リコンビナーゼの融合タンパク質を使用したものである。例えば、プロゲステロンのリガンド結合領域と Cre リコンビナーゼの融合タンパク質である CrePR は、プロゲステロンのアンタゴニスト (RU486) を投与したときのみその活性が誘導される^{15,16)}。この分子はレセプターにリガンドが結合しない状態では、ヒートショックタンパク質が結合して Cre リコンビナーゼ活性は持たない。したがって、細胞特異的なプロモーターの下流に CrePR をつないだマウスでは、特定の時期に特定の細胞での遺伝子組換えを起こすことができる。CreER も同様な考え方で作成されたもので、変異型エストロゲンレセプターのホルモン結合部位と Cre リコンビナーゼの融合分子で、タモキシフェン投与により Cre リコンビナーゼ活性が誘導できる。誘導前にリークする活性を抑えるために、Cre リコンビナーゼのアミノ末端側とカルボキシル末端側 2 カ所に MER を結合したのも開発されている¹⁷⁾。

実際に我々が作成した小脳プルキンエ細胞特異的にかつ誘導可能な組換えマウスを示す¹⁸⁾。このマウスは、プルキンエ細胞特異的に発現するグルタミン酸受容体 $\delta 2$ サブユニット (GluR $\delta 2$) 遺伝子プロモーター制御下で、活性誘導が可能な CrePR タンパク質を発現する。このために、GluR $\delta 2$ 遺伝子の翻訳開始点にフレームを合わせて CrePR 遺伝子を挿入した、いわゆるノックインマウスを作成した。このマウス系統 (D2CPR) を Cre リコンビナーゼ活性によって、lacZ 遺伝子が発現するトランスジェニックマウスと交配し、得られた子のうち、両遺伝子をヘテロに持つ個体をレポーターマウスとして使用した。5-7 週齢のレポーターマウスに RU486 を投与し、経時的に β -ガラクトシダーゼ (β -gal) 活性染色を行った。その結果、プルキンエ細胞特異的な染色が認められた (図 4)。このように、D2CPR マウスは、プルキンエ細胞選択的に遺伝子組換えを人工的に誘導できるマウスであり、小脳プルキンエ細胞で働く分子の機能を成体において解析する非常に有用な

ツールとなる。

これらの誘導型の Cre リコンビナーゼの問題点は、元の Cre リコンビナーゼに比べて活性が低いことである。したがって、CrePR あるいは CreER を通常の Cre リコンビナーゼタンパク質濃度より高くしてやる必要があり、強いプロモーターでの発現を必要とする。また、誘導薬剤はいずれも脂溶性であるため、取り扱いが難しく、融合 Cre リコンビナーゼを活性化する薬剤濃度を長時間にわたり高く保つ投与方法は、検討の余地がある。

6. テトラサイクリントランスアクチベーターを用いた遺伝子発現調節法

遺伝子発現を外から自由に調節して、対象分子の機能を解明するという方法は、大変魅力的なものである。例えば、神経系で記憶・学習の研究をする場合、ある分子が記憶の獲得に必要なのか、保持に必要なのかという問いには、可逆的な発現調節ができる方法があれば対処できる。このような薬剤による遺伝子発現の調節を目的にテトラサイクリントランスアクチベーターを用いた方法が開発されてきた¹⁹⁾。この原理は、図 5 に示したが、テトラサイクリントランスアクチベーター (tTA) は、テトラサイクリントランスアクチベーター結合配列 (tetO) に結合し、その下流の転写を ON にする。ここにテトラサイクリンを投与すると、tTA は tetO との結合ができなくなりその下流の転写が OFF になる。すなわち、テトラサイクリンの有無で遺伝子転写の ON/OFF ができるのである。この方法が使用されている例は、あらかじめ解析対象分子をノックアウトしたマウスで、解析対象の分子を薬剤により制御するという方法で利用されている。今後大きな発展が期待される手法であるが、tetO のプロモーター活性はマウス個体の中で必ずしも高くないので、発現させる分子は限られてくる。ドミナントネガティブのような多量の分子発現が必要な実験などには向かない。

7. ベクター構築法

現在 ES 細胞を用いて遺伝子組換えマウスを作成するには、いくつか律速になる段階があるが、最初に引かかるのはターゲティングベクターの構築である。その最も大きな原因は、DNA のクローニングなどは非常に初歩的な技術で誰でも簡単にできるという誤解である。なるほど、現在では様々なキット類があり、DNA 断片をプラスミドにつなぐことなど学生実習でもやっている朝飯前だと思われる。しかし、効率よく組換えを起こすことのできるターゲティングベクターは 15kb を超えることも珍しくない。プラスミドベクターは大きな DNA 断片を保持するにはできておらず、挿入部分が 7kb を超えるとその長さに従い、指数関数的にライゲーションの効率が下がる。した

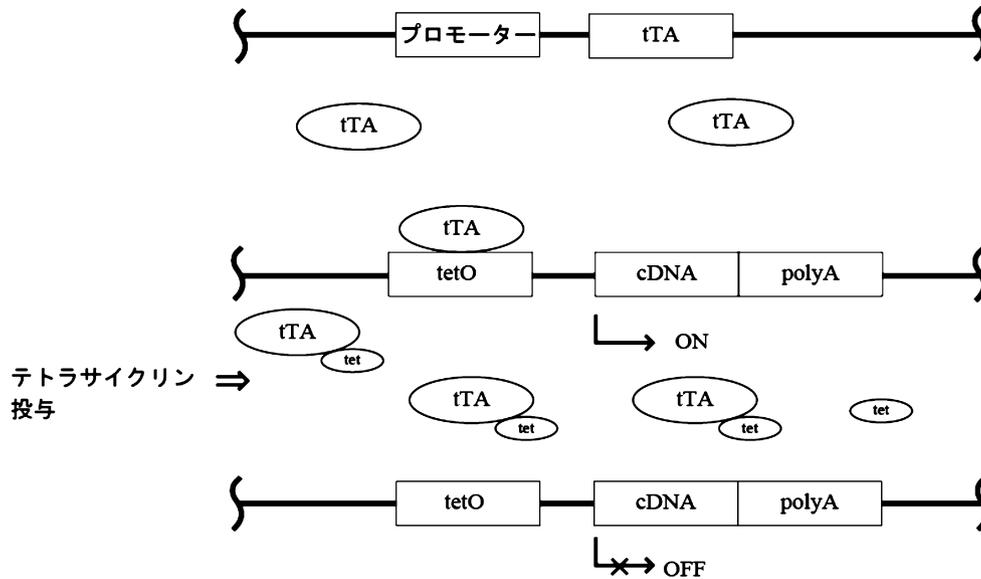


図5 テトラサイクリンによる遺伝子発現調節法

テトラサイクリントランスアクチベーター (tTA) を発現するトランスジェニックマウスと tTA で活性化されるオペレーター (tetO) の下流に発現させたい遺伝子を持つトランスジェニックマウスを交配させ、両者の遺伝子を持つ個体を選別する。この個体では、tTA 依存的に tetO 制御下のトランスジーンが発現している。ここにテトラサイクリン (通常はドキシサイクリン) を投与すると tTA が tetO 結合能力を失い tetO 制御下のトランスジーンが発現が止まる。

がって、ライゲーションされる DNA 断片を高度に精製してやり、その効率を高めてやる必要がある。簡便なキットを用いた方法で 3kb の断片をつなげると数千個のコロニーが生じる方法でも、10kb の断片をつなぐとコロニーが出現しないということはよくある。DNA の精製法やライゲーション法などは、古典的ともいえる実験書を参照するか²⁰⁾、最近あまり実験されていない偉い先生に聞くと喜んで教えてくれる。一方、標的とする部分の遺伝子クローニングは、マウス遺伝子配列が明らかにされ劇的に変化した。手元にゲノムのクローンがなければ、標的とする遺伝子の情報をもとにプライマーを設定し、購入した BAC クローンやゲノムに直接 PCR をかけてクローニングすればよい。読み違いが少なく長い配列を増幅できる耐熱酵素 (KOD plus, Platinum Pfx など) が開発されたのでこのようなことが可能になった。また、BAC クローンから直接 DNA 断片をプラスミドにクローニングする Red/ET システムを使うと、目的領域の長鎖 (~20kb) DNA を簡便に得ることができる²¹⁾。

単純なノックアウトであれば、標的とする遺伝子を破壊して目的のタンパク質の生成ができないようにしてやれば良いが、コンディショナルのターゲティングの場合は、組換えによるノックアウトをする前には、標的遺伝子を正常に発現させなければならないので、少し慎重なベクター設計が必要である。図 6 に我々が通常用いている方法を示す。このベクターシステムを用いると短時間に複雑なコンディショナルターゲティングベクターが構築できる。通

常、標的とする遺伝子がコードするタンパク質の機能ドメインを含むエキソンを loxP 配列で挟むが、この時、挟まれる領域は 1kb 以下にすることが望ましい。これは、片方の loxP 配列の近傍に neo カセットがあり、この部分を中心に組換えは起こるので、loxP 間での組換えが起こることがある。そうすると片側の loxP 配列が落ちてしまうので loxP 間を短くすることでこの確率を下げるのである。また、標的エキソンはその欠質でフレームシフトが起こるものが良い。フレームシフトがないとアミノ酸配列を一部欠失したタンパク質ができる可能性があり、その分子が影響を与えることがあるからである。flox マウスを作成するときに neo カセットの存在が問題になることが多い。このカセットには通常 pgk のような強いプロモーターが使われており、イントロン中に挿入された neo カセットは本来の遺伝子発現に影響を与えるからである。flox マウスでの遺伝子発現に異常があれば、コンディショナルノックアウトにならないことは言うまでもない。我々はこの問題を酵母組換え系 Flp/frt を用いて解決している。neo カセットを frt 配列で挟んでおき、マウスにしてから Flp リコンビナーゼ発現マウスと交配して neo カセットを除いている。もちろん *in vitro* で Flp リコンビナーゼを作用させ除去することも可能であるが、ES 細胞に必要な以上のストレスを与えないという観点から我々はマウスにしてからの除去という手法をとっている²²⁾。最近 BAC クローンをを用いて大腸菌の中で組換えを起こしベクターを作成する方法が開発されてきている²³⁾。方法の詳細は文献を参照していただければ

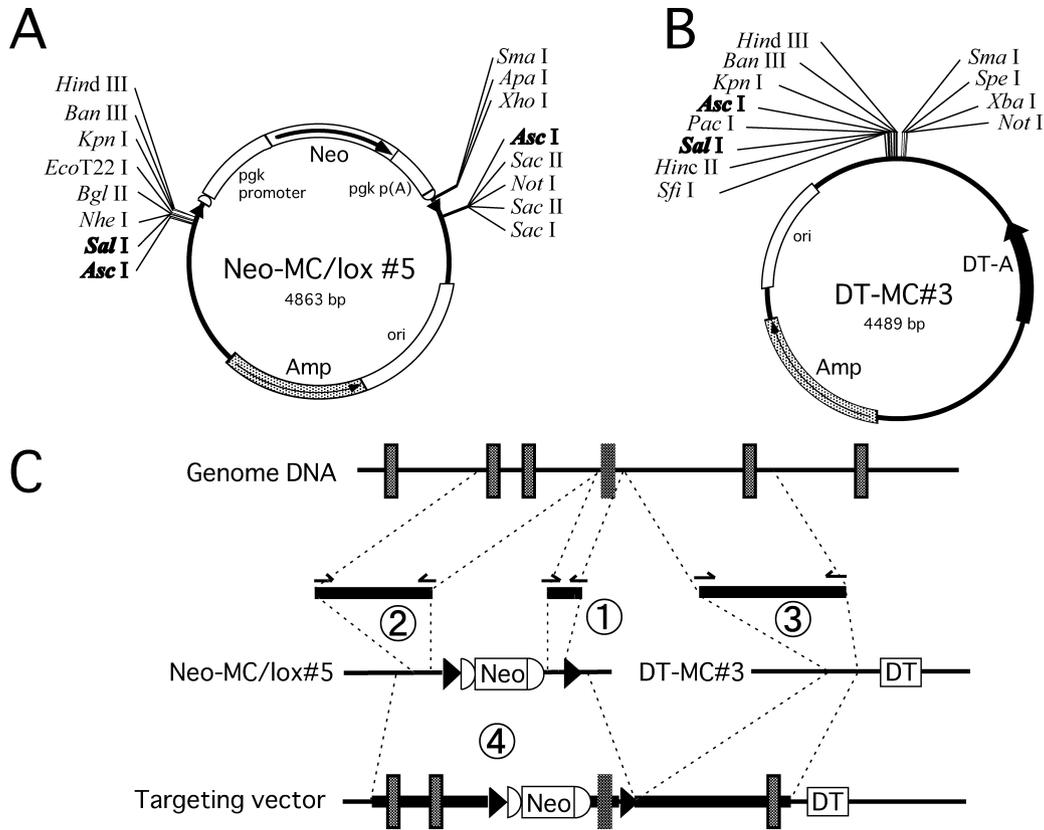


図6 コンディショナルノックアウト作成用汎用型ベクター

A, *frt* 配列ではさんだ *neo* カセットと *loxP* 配列を持つ Neo-MC/lox #5. B, ネガティブ選択用 DT カセットを持つ DT-MC#3. C, 相同組換えベクターの構築. ①欠損させるエクソン部分を ES 細胞遺伝子か BAC クロンを鋳型にし, PCR で増幅して Neo-MC/lox #5 の *Sma*I-*Xho*I 領域に挿入する. ②標的エクソンの上流部分 2-8kb を PCR で増幅し, *pgk* プロモーター上流のマルチクローニングサイトに結合する. ③標的エクソンの下流部分 2-8kb を PCR で増幅し, DT-MC#3 のマルチクローニングサイトに結合する. この時, 上流と下流の相同領域の長さの合計は 10kb 以上にした方が組換え効率が良い. ④②のクローンより *Sal*I-*Asc*I あるいは *Asc*I で *neo* カセットを含む挿入部分を切り出し, ③のベクターの同一サイトに結合する. この方法を用いると未経験者でも短時間に相同組換えベクターが構築できる.

良いが, 大腸菌の中での組換えは短い相同性部分でも起こるので, 完成したベクターの配列を相当丁寧に見ておいた方が無難である. ベクターに含まれるエクソン部分 (この部分はいずれのベクターでも配列確認が必須) だけでなく, *neo* カセットの配列や *loxP* のつなぎ目なども計画どおりか確認した方がよい. また, BAC クロンの使うときの大切な注意点がある. 入手したクローンから抽出した BAC DNA の中に, 目的とした領域が確かに存在することをマウスゲノムと並べて PCR やサザンプロット解析で確認することが必要である. BAC クローンの中にはある確率で遺伝子の欠損したものなどが含まれるからである. したがって, 可能であれば目的の領域を含む複数の BAC クロンを入手して確認することが望ましい.

8. 遺伝子改変マウスを用いた研究の今後

現在世界では, 米国 NIH が KOMP, カナダで NorCOMM,

さらに欧州では EUCOMM と称するマウスの網羅的ノックアウトプロジェクトが相次いでスタートした. いずれの計画でも遺伝子トラップ法と相同組換え法等の併用によりマウス全遺伝子をノックアウトした ES 細胞のライブラリー構築を目指している. 欧州が, コンディショナルノックアウトを前提としたベクターを使用するのに対し, 米国 NIH の計画では現実的な遂行を前提に単純ノックアウトとなっている. 使用するマウスの系統は欧州が 129 系統 ES 細胞利用を前提にしているのに対し, NIH の計画では C57BL/6 由来 ES 細胞を使用することを謳っている. それぞれの計画でマウスまで作成するのは, 予算の関係もあり, 方法論の検証のために数百系統と計画されている. 一方我が国では, 残念ながら具体化された計画はまだないのが現状である. サイエンスのグローバル化が進み, 利用できるリソースはもらえばいいと考える人が多くなったが, 遺伝子ノックアウトマウスは, 薬剤開発などヒトの疾病予

防と治療のために利用できるリソースであり、経済的な理由での囲い込みも予想される。したがって、我が国の生命科学の研究推進とリソース確保、さらに日本ただ乗り論に対抗するためにもポストゲノム研究の国家プロジェクトとして位置づけるべきであると考え。何も国粹的な発想ではないが、我々が実用化してきたC57BL/6ES細胞を用いた相同組換えマウス作成法だけでなく、我が国にはPolyAトラップ法の新しいベクターを開発した石田等²⁴⁾、トランスポゾンを用いたユニークなトラップ法を開発した竹田等²⁵⁾、さらに多機能なトラップベクターを開発してきた山村等^{26), 27)}の技術的な蓄積があり、これらを結集することで、日本のリソースの充実を図ることが可能である。実際に相同組換えで作成するマウスは、生命科学それぞれの分野に焦点を絞ってコンディショナルターゲティングできるものを開発すべきである。具体的には、神経系の機能に関連する300種類の遺伝子とか発がんに関連する200種類の遺伝子など各分野研究者の要望を基にリスト化することにより費用対効果の高いプロジェクトになる。

一方、特定の分子に着目した実際の研究場面では、アミノ酸の置換による機能ドメイン欠損マウスの作成など各論的なマウス作成需要は無くならないと思われる。したがって、ベクター構築法の更なる簡便化とES細胞での相同組換え効率の改善が次の課題である。さらに今後大切な問題は、様々な細胞や組織で選択性高かつ効率的な組換えを起こすCreマウスの開発である。とりわけ、現在の誘導型Creリコンビナーゼは活性が低いので、新たな分子の開発を進める必要がある。

文 献

- Hgan, B., Beddington, R., Costantini, F., & Elizabeth, L. (1994) *Manipulating the Mouse Embryo*, 2nd edition, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Wassarman, P.M. & DePamphilis, M.L. (1993) *Guide to Techniques in Mouse Development*, Methods in Enzymology, 225, Academic Press Inc., San Diego.
- Wakayama, T. (2003) *Oncology Research*, 13, 309-314.
- Nagy, A., Gocza, E., Merentes Diaz, E., Prideaux, V.R., Ivany, E., Markkula, H., & Rossant, J. (1990) *Development*, 110, 815.
- Ledermann, B. & Burki, K. (1991) *Exp. Cell Res.*, 197, 254-258.
- Kontgen, F., Suss, G., Stewart, C., Steinmetz, M., & Bluethmann, H. (1993) *Int. Immunol.*, 5, 957-964.
- Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y., Nada, S., Yoshida, M., Tsukada, T., Saga, Y., Takeda, N., Ikawa, Y., & Aizawa, S. (1993) *Anal. Biochem.*, 214, 70-76.
- Wahlsten, D. (1982) *Brain Res.*, 239, 329-347.
- McVicar, D.W., Winkler-Pickett, R., Taylo, L.S., Makrigrannis, A., Bennett, M., Anderson, S.K., & Ortaldo, J.R. (2002) *J. Immunol.*, 169, 1721-1728.
- Seong, E., Saunders, T.L., Stewart, C.L., & Burmeister, M. (2004) *Trends Genet.*, 20, 59-62.
- Copeland, N.G., Jenkins, N.A., & Court, D.L. (2001) *Nat. Rev. Genet.*, 36, 361-388.
- Lee, E.C., Yu, D., Martinez de Velasco, J., Tessarollo, L., Swing, D.A., Court, D.L., Jenkins, N.A., & Copeland, N.G. (2001) *Genomics*, 73, 56-65.
- Wang, Y., Krushel, L.A., & Edelman, G.M. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 3932-3936.
- Davidson, B.P., Tsang, T.E., Khoo, P.L., Gad, J.M., & Tam, P. P. (2003) *Genesis*, 35, 57-62.
- Kellendonk, C., Tronche, F., Monaghan, A.P., Angrand, P.O., Stewart, F., & Schutz, G. (1996) *Nucleic Acids Res.*, 24, 1404-1411.
- Tsujita, M., Mori, H., Watanabe, M., Suzuki, M., Miyazaki, J., & Mishina M. (1999) *J. Neurosci.*, 19, 10318-10323.
- Tannour-Louet, M., Porteu, A., Vaulont, S., Kahn, A., & Vasseur-Cognet, M. (2002) *Hepatology*, 35, 1072-1081.
- Kitayama, K., Abe, M., Kakizaki, T., Honma, D., Natsume, R., Fukaya, M., Watanabe, M., Miyazaki, J., Mishina, M., & Sakimura, K. (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 281, 1134-1140.
- Mayford, M., Bach, M.E., Huang, Y.Y., Wang, L., Hawkins, R.D., & Kandel, E.R. (1996) *Science*, 274, 1678-1683.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Zhang, Y., Myrner, J.P.P., Testa, G., & Stewart, A.F. (2000) *Nature Biotech.*, 18, 1314-1317.
- Takeuchi, T., Miyazaki, T., Watanabe, M., Mori, H., Sakimura, K., & Mishina, M. (2005) *J. Neurosci.*, 25, 2146-2156.
- Testa, G., Zhang, T., Vintersten, K., Benes, V., Pijappel, P., Chambers, I., Smith, A.J.H., Smith, A.G., & Stewart, A.F. (2003) *Nature Biotech.*, 21, 224-227.
- Shigeoka, T., Kawaichi, M., & Ishida, Y. (2005) *Nucleic Acids Res.*, 33, e20.
- Horie, K., Yusa, K., Yae, K., Odajima, J., Fischer, S.E., Keng, V.W., Hayakawa, T., Mizuno, S., Kondoh, G., Ijiri, T., Matsuda, Y., Plasterk, R.H., & Takeda, J. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, 23, 9189-9207.
- Araki, K., Imaizumi, T., Sekimoto, T., Yoshinobu, K., Yoshimuta, J., Akizuki, M., Miura, K., Araki, M., & Yamamura, K. (1999) *Cell. Mol. Biol.*, 45, 737-750.
- Taniwaki, T., Haruna, K., Nakamura, H., Sekimoto, T., Oike, Y., Imaizumi, T., Saito, F., Muta, M., Soejima, Y., Utoh, A., Nakagata, N., Araki, M., Yamamura, K., & Araki, K. (2005) *Dev. Growth Differ.*, 47, 163-172.