

NKT細胞を用いた核移植法によるクローンマウス作製

1. はじめに

原核生物においては細胞分裂により自己と同一の個体を作り出すこと（クローン）は常識であるが真核生物，殊に高等生物の場合は生殖を介するため，子孫がその親と遺伝的に同一であることはない．さらに高等生物の場合，受精卵は発生・分化によってその性質を刻々と変遷させていく．子孫を作製しうる細胞は生殖細胞のみであろうか？ 個体中で分化の終了した細胞には個体を再生する能力（全能性）はないのであろうか？ この疑問は長い間，発生生物学者たちの間で議論されてきた．

歴史的には高等生物細胞の核が分化後も全能性を保持・発揮しうるか否かの実証実験は1952年のBriggsとKingによる核移植実験に遡る．彼らはカエル胞胚（blastula）の核を脱核した卵細胞に移植すると完全なおたまじゃくしができることを見いだした．ところがさらに分化段階が進んだ状態の体細胞の核を用いるとおたまじゃくしは生まれてこなかった¹⁾．これらの実験から個体の発生が進み，細胞が分化するに従い，その核は全能性を発揮できなくなると考えられるようになった．しかし，1975年になってGurdonはカエルの水かき由来の上皮細胞の核を用いて核移植を行い，これを繰り返すことによりついにとおたまじゃくしを誕生させることに成功した²⁾．これらのおたまじゃくしは給餌以前に死んでしまったが，分化が終了したと考えられる上皮細胞の核がそのプログラムをリセットし，おたまじゃくしになる能力を有していることを初めて示したものであった．

哺乳動物の細胞においては1981年IllmenseeとHoppeによってマウスのプラストシストの内部細胞塊由来細胞の核移植によるクローンマウス誕生が報告されたがその後だれも追試に成功できなかったため，真偽は長らく不明であった³⁾．1986年になってヒツジの初期胚細胞を用いた核移植によるクローン産生の可能性が示唆された⁴⁾．そして1996年，この方法によりクローンヒツジの誕生が報告された⁵⁾．以上の実験では初期胚細胞を用いているのでカエルの例になぞらえてクローンが産生されても不思議ではない．それでは哺乳動物の分化した細胞を使用した場合はどうであろうか？ 1997年，Roslin研究所のWilmutらによってヒツ

ジ乳腺の細胞を用いた核移植により，クローンヒツジDollyが生まれた⁶⁾．核ドナーとして用いた乳腺細胞はFinn-Dorset種由来であり，脱核した未受精卵はScottish blackface種由来のものであったので，生まれてきたクローンはFinn-Dorset種特異的なゲノムを持つと予想されたがDNA finger print法などによりクローンの正当性が証明された．

2. 何が問題なのか？

Dollyの報告後，ウシやマウスの体細胞を用いた核移植によるクローン誕生が次々と報告された⁷⁻¹⁰⁾．これで発生生物学の課題，「分化した細胞の核は全能性を保持・発揮する」は解決したのであろうか？ 分化した組織から採取した細胞だからこれらは全て分化が終了した細胞である，と結論づけてよいのであろうか？

近年，体性幹細胞とよばれる一群の幹細胞に注目が集まっている．これらの細胞は血液幹細胞や神経幹細胞などに代表される細胞で再生医療ならびに細胞治療の面から注目を集めている．これらの細胞は様々な細胞群へと分化する能力を有するので，ある意味では胚性幹細胞に近いと言えよう．しかしこれらは分離・精製しないかぎり分化の終了した細胞群と区別できない．カエル，ヒツジの例でも示したように初期胚細胞などはクローンを産生するのが容易であり，これら幹細胞も同様な性質を持つとするとクローンを誕生させた細胞がこれら幹細胞であった可能性もあながち否定できない．

それではどのようにしたら最終分化細胞が全能性を有することを証明できるのであろうか？ 一つの解答法は末梢リンパ球の細胞の核を使用することである．これらの細胞は分化終了後，抗原受容体を発現している．さらにこの受容体産生の過程で遺伝子再構成が起り，できあがりリンパ球のゲノムDNAは，T，B細胞抗原受容体遺伝子座の部分欠損を伴っている．この性質を巧みに利用することによりこれらの細胞が全能性を有するか否かクローンができた後で確認できる．すなわち，もしクローンが単一リンパ球由来であれば，そのゲノムDNAは元の細胞が有していた遺伝子再構成済みの配置を持っていると考えられる．B細胞であればB細胞抗原受容体を構成する重鎖，軽鎖であり，T細胞の場合にはT細胞抗原受容体（TCR）を形成しているアルファ鎖とベータ鎖若しくはガンマ鎖とデルタ鎖の組み合わせである．

実験の結果，これらリンパ球からは胚性幹細胞（ES細胞）は樹立可能であったが，クローンマウスは得られな

かった¹¹⁾。すなわち、再び、哺乳動物において最終分化した細胞の核は本当に全能性を有するのか、という疑問が再浮上してきたのである。

3. リンパ球, NKT (natural killer T) 細胞の核は全能性を発揮する

我々はこの疑問に答えるためNK細胞の受容体を有するT細胞であるNKT細胞の核を用いて上記の問いに答えようとした。NKT細胞は多種多様なサイトカインを免疫反応の初期に産生することから自然免疫と適応免疫とを結ぶ、いわば架け橋であり、免疫系においては免疫制御細胞として作用していると考えられている¹²⁾。興味深いことにこの細胞のTCRはV α 14-J α 281として一義的に決定されている。通常のTCRはランダムなV α とJ α の組み合わせによって成っており、そのレパトアー (repertoire) 同定はこれらの組み合わせの数が膨大であるため事実上不可能である。この事実はクローン動物の由来を解析する上で非常に有利となる。

まずNKT細胞核の核移植における再構築胚の生成・生存率と他のT細胞のそれらとを比較検討した。NKT細胞の核を使用した場合には約70%が桑実胚/blastocystの段階まで進んだがT細胞の場合にはわずか12%のみがこの段階まで達することができた¹³⁾。またここからES細胞樹立を試みたところ核移植した再構築胚から4%という効率でES細胞が樹立できた¹³⁾。この効率はマウス子宮内の卵丘細胞、マウスの繊維芽細胞からのES細胞の樹立効率に匹敵する。なお、これらNKT細胞由来ES細胞からはキメラマウスが作製可能であることを確認している。一方、Hochedlingerらの実験によると末梢のB、T細胞からのES細胞樹立効率はせいぜい0.2%程度であった¹¹⁾。以上の結果からNKT細胞核は通常のB、T細胞よりもより高効率で再構築胚を形成する能力がある、と結論できる。

それでは、全能性についてはどうであろうか？ この可能性を検討するためT細胞・NKT細胞由来再構築胚をマウスの子宮に戻し、クローンマウスが誕生するか調べたところNKT細胞の核を持ったものは4匹のクローンマウスを誕生させたが(約1.5%の効率)T細胞の核からはマウスが生まれてこなかった。さらに興味深いことにNKT細胞よりの再構築胚からは受胎産物の形成がしばしば子宮内で観察されたのに対し、T細胞由来のものではこれも全く形成されなかった。よって後者の核を用いた再構築胚では発達・増殖があまり芳しくないといえる。この差異を詳細に解析すれば全能性を制御する分子機構が明らかにできる

であろう。

4. NKT細胞由来クローンマウス

これらのクローンマウスはいったいどのような表現型を示すのであろうか？ 成長したクローンは2匹のみであったので、末梢血中のTCRV β レパトアーなどのプロファイルのみを調べた。FACS解析の結果、両クローンともTCRV β を発現している細胞はほぼすべてTCRV β 8を発現しているという、いわゆる対立遺伝子排除が観察された。またMac-1, Gr-1, B220, NK1.1, TCR γ δ , CD3 ϵ などの発現を検討したがクローンマウスとコントロールとの間に有為な差異は存在しなかった¹³⁾。

また別の特徴としてこれまでクローン化された多くの動物ではその成長途上において何らかの異常が発症し、正常の動物より短命であったのに対して、これらのマウスは大きな異常を示さず、1年半程生きながらえた。マウスの寿命を2年と考えればこれらのクローンはその約8割まで正常に発育・生存したことになる。

先にも述べたようにこれまでに作製されたクローン動物ではその起源となった細胞はゲノムの物理的変化を有していなかったか、あったとしても検出不可能であった。よってそのクローンのドナー細胞の種別については区別可能であったが、その細胞がES細胞、体性幹細胞のように未熟細胞であったのか、最終分化した細胞であったのか区別することは不可能であった。しかしながら、上記のクローンマウスは末梢NKT細胞由来であり、かつV α , J α の組み合わせが一義的に決定されているのでこれらマウスのゲノムDNAは遺伝子再構成済みのV α , J α すなわち、V α 14-J α 281という配置を有するはずである。

このゲノム上の変化はサザンプロットによって確認することができる。クローンマウス由来のゲノムDNAを適当な制限酵素で処理した後、V α 14のエキソン部分とイントロン部位を含む配列をサザンプロットのプローブとして使用することにより、遺伝子再構成前のゲノム配置と再構成後のそれとを区別できる(図1)。TCRV α 14のプローブを使用した場合にはNKT細胞のドナーとなったマウス(C57BL/6 \times 129/Sv, 図2レーン3)では約13kbのバンド(C57BL/6由来, レーン1を参照)と2.5kb(129/Sv由来, レーン2を参照)の2本のバンドが存在するが、生まれてきたクローンマウス1の尾から調整したゲノムDNA(レーン4)では遺伝子再構成が終了したゲノム由来と思われる8kbのバンドが出現している。これはこのマウスの胎盤(レーン5)でも同じであり同一の細胞から胎盤とマウス個体が

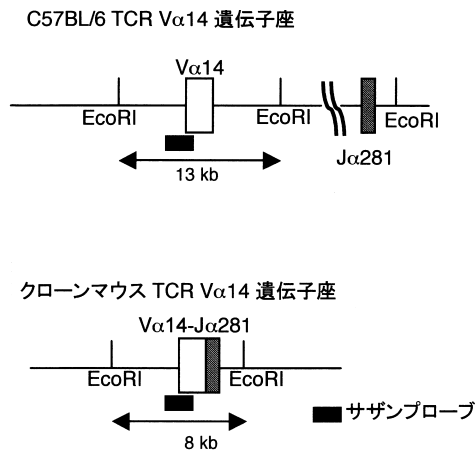


図1 C57BL/6 TCR V α 14 遺伝子座とクローンマウスの TCR V α 14 遺伝子座

V α 14 のエキソンは白い四角形で、また J α 281 のエキソンは灰色の四角形で示されている。ゲノム上の *EcoRI* サイトの位置ならびにその間の距離が示されている。サザンプロットに用いたプローブは黒塗りの棒で示されている。

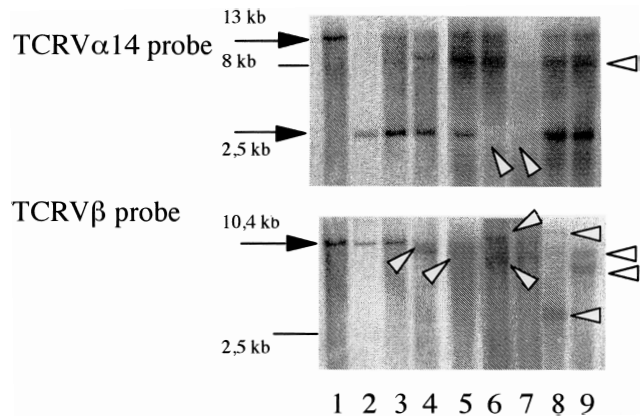


図2 クローンマウスおよび胎盤のゲノム DNA を用いたサザンプロット解析

白抜き矢印は遺伝子再構成の起こったバンドを示している。黒塗り矢印は遺伝子再構成の起こる以前のバンドを示している (germ line configuration)。

以下のゲノム DNA を使用して TCRV α 14, TCRV β のプローブでサザンプロットを行った。

1; C57BL/6, 2; 129/Sv, 3; C57BL/6 \times 129/Sv (ドナー), 4, 5; クローン1の尾と胎盤, 6, 7; クローン2由来の尾と胎盤, 8; 別のクローンの胎盤, 9; 死産クローンの胎盤

生成されたと考えられる (図2)。クローンマウス2でも TCRV α 14 のプローブを使用した場合 8kb のバンドが見られたが、同時に 129/Sv 由来の 2.5kb のバンドが消失していた (レーン6, 7)。これは両方の対立遺伝子において TCRV α 14 鎖の遺伝子再構成が起こったことを示してい

る。TCRV α 14 遺伝子座において遺伝子再構成が終了したことは 8kb のバンドの出現で明らかであるが、これらの場合でも約 13kb のバンドはそのまま残っていた (レーン4-9)。これは C57BL/6 においては TCRV α 14 遺伝子座が二つ存在しており、その一方が偽遺伝子であるがためと解釈される。

さらにゲノム DNA を鋳型として TCRV α 14, TCRJ α 281 遺伝子を挟み込むようなプライマーを用いて PCR 反応を行うことによって遺伝子再構成終了後のゲノムの配列を決定することができる。PCR の結果クローン1のマウスでもクローン2のマウスにおいても産物が生成し、その DNA 配列より、前者は C57BL/6 由来の、後者は 129/Sv 由来の TCRV α 14 を有することが明らかになった。

TCRV β 鎖についても C57BL/6 (レーン1), 129/Sv (レーン2), C57BL/6 \times 129/Sv (レーン3) のゲノム DNA と比較し、クローンマウスの尾・胎盤由来のゲノム DNA においてコントロール (10.4kb) からのバンドの位置のずれがサザンプロットにより観察された (レーン4と5)。これは TCRV β 遺伝子座においても遺伝子再構成が行われている証拠である。TCRV β 遺伝子座は TCRV α 遺伝子座と比較してその大きさは比較的小さく PCR が使用可能である。そこでこの方法によりこれらクローンマウスにおける TCRV β の組み合わせを決定した¹³⁾。その結果、クローン1では TCRV β 8S2-D1-J β 2S5 が、クローン2においては TCRV β 8S3-D1-J β 1S4 が使用されていることが判明した。以上の結果よりこれらクローンマウスは末梢の NKT 細胞由来であることが証明された。

5. 本技術の応用例

Dolly は元々、ヒツジの乳腺中でヒトの血液凝固因子などの有用医薬品を産生させ、それを大量にミルク中に分泌させるいわばバイオリアクターとしてのトランスジェニック動物を複製するために考案されたものである。トランスジェニックマウスを作製しても目的の遺伝子を高効率で発現させることができるとは限らず、相当数を作製しないと目的のマウスは得られない。これをヒツジで行うことを考えれば、その苦難は容易に想像し得る。まずトランスジェニックヒツジがミルクを産生するまでには数年かかる。また目的の遺伝子を高発現するヒツジが得られたとしてもそのミルクから目的産物を取得できるのはほんの数年であり、その子孫からの目的遺伝子の発現量は往々にして減少している。そのため、トランスジェニックヒツジを何度も作製し直さねばならない。この労力と時間を考えれば

Roslin 研究所がなぜ、クローンヒツジを作製したのか、その必然性が理解できよう。実際、ヒトの凝固因子 XI を発現するトランスジェニックヒツジのクローン Polly が同年に報告されている¹⁴⁾。NKT 細胞から核移植によってクローンマウスができた割合は 1.5% (4/272) であり、ヒツジの乳腺の場合と比較した場合よりも有為が高い (0.36%, 1/276)。従って選択されたトランスジェニックヒツジの NKT 細胞を使用して核移植を行えばより高効率でクローンが得られると考えられる。

- 1) King, T.J. & Briggs, R. (1956) *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 21, 271-290.
- 2) Gurdon, J.B., Laskey, R.A., & Reeves, O.R. (1975) *J. Embryol. Exp. Morphol.*, 34, 93-112.
- 3) Illmensee, K. & Hoppe, P.C. (1981) *Cell*, 23, 9-18.
- 4) Willadsen, S.M. (1986) *Nature*, 320, 63-65.
- 5) Campbell, K.H., McWhir, J., Ritchie, W.A., & Wilmut, I. (1996) *Nature*, 380, 64-66.
- 6) Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., & Campbell, K.H. (1997) *Nature*, 385, 810-813.
- 7) Yamazaki, Y., Makino, H., Hamaguchi-Hamada, K., Hamada, S., Sugino, H., Kawase, E., Miyata, T., Ogawa, M., Yanagimachi, R., & Yagi, T. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 98, 14022-14026.
- 8) Wakayama, T. & Yanagimachi, R. (1999) *Nat. Genet.*, 22, 127-128.
- 9) Wakayama, T., Perry, A.C., Zuccotti, M., Johnson, K.R., & Yanagimachi, R. (1998) *Nature*, 394, 369-374.
- 10) Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H., & Tsunoda, Y. (1998) *Science*, 282, 2095-2098.
- 11) Hochedlinger, K. & Jaenisch, R. (2002) *Nature*, 415, 1035-1038.
- 12) Godfrey, D.I. & Kronenberg, M. (2004) *J. Clin. Invest.*, 114, 1379-1388.
- 13) Inoue, K., Wakao, H., Ogonuki, N., Miki, H., Seino, K., Nambu-Wakao, R., Noda, S., Miyoshi, H., Koseki, H., Taniguchi, M., & Ogura, A. (2005) *Curr. Biol.*, 15, 1114-1118.
- 14) Schnieke, A.E., Kind, A.J., Ritchie, W.A., Mycock, K., Scott, A.R., Ritchie, M., Wilmut, I., Colman, A., & Campbell, K.H. (1997) *Science*, 278, 2130-2133.

若尾 宏

(北海道大学大学院医学研究科環境医学)

Generation of the cloned mice from NKT cells by somatic cell nuclear transfer

Hiroshi Wakao (Environmental Biology School of Medicine, Hokkaido University, N15W7, Kita-ku, Sapporo-shi 060-8638, Japan)

相同組換えのメディエーター

1. はじめに

相同組換え (HR) は、DNA 損傷の修復、崩壊した複製フォークの回復、減数分裂期における正常な染色体分配など、広範な生理機能に関わっている。HR の中心的な反応は、リコンビナーゼが触媒する相同な 2 分子 DNA 間の鎖交換反応であり、バクテリアでは RecA タンパク質が、真核生物では Rad51 と Dmc1 タンパク質が、この反応酵素として広く保存されている。Rad51 は、体細胞分裂期と減数分裂期の両方の組換え反応に必須の働きをしているが、Dmc1 は減数期分裂のみに働く。Rad51 と Dmc1 はアミノ酸配列上高い相同性を有し、また、ヒト Rad51 と大腸菌 RecA の場合でも、約 30% の相同性があることから、DNA 鎖交換反応における酵素学上の基本的メカニズムや機能を発現するタンパク質の立体構造的基盤は、進化を通じて高度に保存されていると考えられる。しかし、真核生物のリコンビナーゼの試験管内 DNA 鎖交換活性は、RecA と比べて格段に弱く、多くの補助因子が同定されている。なかでもメディエーターと呼ばれる補助因子の研究が最近大きく進展してきた。本レビューでは、この因子の相同組換え反応における役割について概説した。

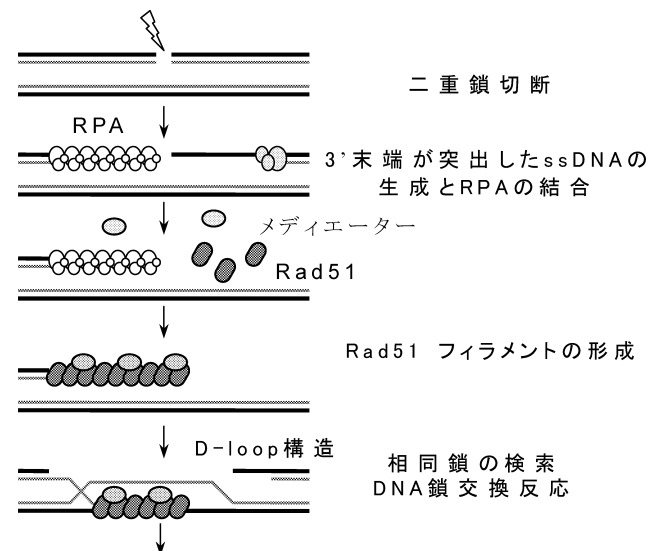


図1 相同組換え反応の初期過程