

遺伝子トラップ法による 遺伝子破壊マウス作製技術

山村 研一

要約: ヒトゲノムプロジェクトの進展により種々の生物のゲノムの塩基配列は明らかとなったが、塩基配列のみでは、遺伝子およびコード領域以外の部分がどのような機能を持っているのか推定すらできないし、また遺伝子自身の機能に関する情報も不十分である。このため全長 cDNA 配列の決定、DNA チップによる発現パターンの解析、タンパクの構造解析、タンパクに対する抗体作製等の機能解析系が必要であるといわれている。しかし、これらは重要ではあるが、あくまで機能を同定するための状況証拠を提供するにすぎないとみるべきである。具体例の一つあげれば、Cbfa1 は、リンパ球で発現する遺伝子の転写因子として発見されたが、その破壊マウスでは骨形成がみられず、骨形成のマスター遺伝子であることが分かった。このことは、構造や発現パターンからだけでは、必ずしも機能は推測できないことを示唆している。そこで、遺伝子改変マウスを用いた *in vivo* の解析の重要性が再認識され、欧米でノックアウトマウスプロジェクトが始まり、合計すれば年間約 40 億円に達する金額が投じられることとなった。その内容は、遺伝子トラップ法や相同組換え法を用いてほぼ網羅的にノックアウト ES クローンを取るプロジェクトであるが、当面は 129 系統由来の ES 細胞を用い、やがて確立されれば C57BL/6 由来の ES 細胞を用いて行うというものである。筆者らは網羅的遺伝子破壊を目指して、可変型遺伝子トラップ法を開発した。この方法により、第 1 段階で完全破壊が、第 2 段階でトラップベクター内のマーカー遺伝子を、別の遺伝子で置換、第 3 段階で条件的遺伝子破壊が可能となった。やがて、遺伝子破壊された ES 細胞が全世界に配られ、遺伝子破壊マウスが多量に作製され、保存される時が来る。熊本大学生命資源研究支援センターでは、世界の主要なリソースセンターが参

加し、保存と供給の支援を行う FIMRe (Federation of International Mouse Resources) にも創立メンバーとして参加し、また、アジアにおけるミュータジェネシスとリソースセンターの連合体である AMMRA (Asian Mouse Mutagenesis and Resource Association) も立ち上げ、今後の対応も視野にいたした活動を行っている。

1. 変異マウス作製法

変異マウスの作成法は、大きく分けて 2 つあり、自然突然変異と誘発突然変異とがある。自然突然変異は、飼育中に偶然に発見する変異で、古典的ではあるが、過去 1000 種類ほどが知られており、この中にはヌードマウスや NOD マウス等があり、貢献度の高いマウスも存在する。誘発変異には、放射線や変異原物質による方法、相同組換え法、遺伝子トラップ法がある。放射線では、欠失等の大きな変異が生じることが多いが、ENU (ethylnitroso urea) 等の変異原物質では、点突然変異が生じる。ENU を用いたミュータジェネシスが 1997 年にドイツで始まり、英国、米国、わが国でも始められたが、現在ほぼ収束に向かっている。相同組換え法は、別項で述べられるので省略する。遺伝子トラップ法は、以下に述べる。

2. 遺伝子ノックアウトの歴史

歴史を振り返ると、実は古くから方法論が発達してきている。相同組換えについては、1981 年の ES 細胞の樹立が始まりで、1984 年に ES 細胞を用いて作製したキメラマウスから初めて生殖系列への伝達が認められている。1985 年には Smithies らによる培養細胞での相同組換えが、1987 年には Capecchi らによる ES 細胞での相同組換えが報告された。そして、1989 年に ES 細胞を用いた遺伝子破壊マウスの誕生が初めて報

告された。

一方、遺伝子トラップ法については、1978年に大腸菌で、転写が活性化されている領域を見つけるエンハンサートラップ方法として開発されたのが最初である(1)。ついで、これが培養細胞に応用されたのが、1983年である(2)。このあたりまでは、遺伝子を発見する方法として使われている。1987年には、ショウジョウバエ個体に応用され、遺伝子を発見するとともに遺伝子を破壊する方法として用いられた(3)。翌1988年にはマウス受精卵を用いてエンハンサーを見つける方法が報告されたが(4,5)、哺乳類ではエンハンサーが必ずしもコード領域の近くにないこと、受精卵を用いたのでは効率が悪く、なかなか遺伝子を発見できないことから、1989年にはES細胞を用いた遺伝子トラップ法が開発された(6)。

3. 遺伝子トラップ法

遺伝子トラップ法には、原理的には4種類ある(図1)。第1は、エンハンサートラップ法であり、この場合は弱いプロモーターとマーカー遺伝子とポリAをもつ構造となる。第2は、プロモータートラップ法であり、プロモーターを持たないが、ポリAを持つマーカー遺伝子を用いる。第3は、エクソン/イントロントラップで、この場合はスプライスアクセプターをマーカー遺伝子につなぎ、ポリAもつけておく。第4は、ポリAトラップベクターで、弱いプロモーターとマーカー遺伝子だけの構造である。しかし、当初考案されたポリAトラップベクターでは、機能しないことが明らかになった。その理由は、マーカー遺伝子のポリAが、トラップした遺伝子のポリAより50-60塩基対より上流にあると、いわゆる nonsense mediated DNA decay (NMD) が起こり、mRNAが破壊されること、したがって、このポリAトラップベクターでは、遺伝子上流にトラップベクターが入った

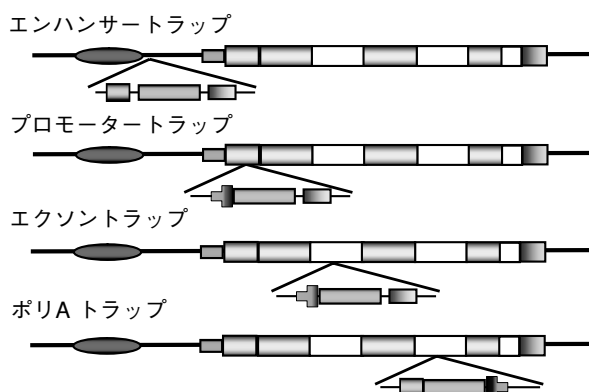


図1 遺伝子トラップ法

場合は、クローンとして取れないことがわかったからである。現在は、IRESを挿入することにより、NMDを回避できるベクターが開発されている(7)。

4. 可変型遺伝子トラップ法

筆者らは、単なる遺伝子機能の解析ではなく、ゲノム医学のためのヒト疾患モデルマウスの作製、あるいはゲノム創薬の展開のためのモデル作製も可能な方法論の開発を行った。このためには、ひとつの遺伝子あたり10個の異なる変異を導入し、解析する必要があると考えられている。そこで、遺伝子をトラップした後に、興味ある遺伝子を挿入し、必要に応じて条件的に遺伝子破壊ができる方法論の開発が必須である。あとで興味ある遺伝子を挿入したとき、トラップした遺伝子の一部分が発現すると、そこから翻訳されたタンパクが何らかの機能、たとえばドミナントネガティブに働くタンパク、を持ってしまうことも予想される。そこで、内在性遺伝は完全に破壊する必要が生じる。そこで、プロモータートラップベクターにすることとした。このため、IRESを用いないこと、また、マーカー遺伝子上流に停止コドンが来るようにした。このようなベクターであれば、もし遺伝子の途中に組み込まれたとしても、上流からの翻訳は停止コドンで終了し、マーカー遺伝子内の薬剤耐性遺伝子であるネオも発現しないことになる。つまり、このようなクローンが、ネオ選択しても取れてこないことになる。したがって、プロモーター付近にベクターが挿入され、正しくネオが発現するクローンのみが単離できることになる。さらに、いったん遺伝子を完全破壊したあと、遺伝子置換を行うため、つまり beta-geo 部分を他の遺伝子等に置換するため、上流に lox71 を、下流に loxP-polyA-lox2272 を挿入した。この lox71 や lox2272 は、loxP 配列の反復配列部分またはスペーサー領域に変異をもつものである。これを用いた理由は次のとおりである。Cre-loxP システムは、大腸菌内では切り出しと挿入反応が観察されるが、哺乳類細胞では核の体積が大きいため、いったん Cre により切り出された断片が、Cre とともにゲノム上の loxP の近傍に存在することは物理的に困難で、そのため挿入反応は結果として殆ど観察されていない。そこで挿入するための方法として、loxP 配列に変異を挿入し、いったん挿入されれば削除ができなくなるように改変を試みた。原理は、次のようなものである。まず、左端の反復配列に変異を導入した lox71 と、右端に変異を導入した lox66 を準備する。lox71 は細胞に導入しゲノム上に組み込んでおく。挿入したい

DNAを含むプラスミド上に lox66 を組み込んでおく。Cre と lox66 を含むプラスミドを、細胞にエレクトロポレーションすると左端に変異を有する lox71 と右端に変異を有する lox66 の間で組換えが起こり挿入される。いったん挿入されると、左側には左端および右端とも変異をもつ lox71/66 が、右側には正常の loxP が配列することになる。Cre は、両端に変異をもつ lox71/66 を認識する効率が悪く、したがって、削除の反応の効率が悪くなり挿入されたままとなる。筆者らは ES 細胞に応用し、10% 程度の効率で挿入されたクローンが単離できることを明らかにした。その後、loxP あるいはスペーサー部分に変異を持つ lox2272 を利用することにより、lox71 と loxP または lox2272 ではさまれた部分のみを入れ替えることも可能であることを明らかにした。この変異型 lox を利用したトラップベクターを作製し pU17 と命名し、それを用いた方法を可変型遺伝子トラップ法と命名した(図2)(8-10)。

5. 世界のノックアウトマウスプロジェクト

1) 現状

これまで ES 細胞を用いた「個々の」遺伝子破壊マウス作製は大きな威力を発揮し、その機能解析のための「戦術」として用いられてきた。しかし、個々の研究室でこの方法を用いて遺伝子破壊マウスを作製すると、膨大なコストと労力と時間が必要であるという欠点がある。例えば、1 系統の破壊マウス樹立には最低 500 万円かかるとしても、3 万個の遺伝子については 1,500 億円必要である。この方法による律速段階は ES 細胞を用いた相同組換えであり、世界中で作製されて

いる遺伝子破壊マウスの数は多くても 1 年間約 1,000 系統であり、これだと 30 年かかることになる。そこで、集中的に大規模に突然変異マウスを「網羅的」に作製する構想が浮上した。つまり、マウス変異体作製がこれまでの「戦術」から「戦略」目標となったのである。

現在、世界では 3 つのプロジェクトが始動した。第 1 は、EU の EUCOMM プロジェクトである(11)。遺伝子トラップ法と相同組換え法を併用し、20,000 個の遺伝子破壊 ES クローンを取る、3 年間で 1300 万ユーロの計画である。第 2 は、カナダの NorCOMM プロジェクトで、主に遺伝子トラップ法を用い 4 年間で 840 万カナダドルのプロジェクトである。第 3 は、米国の KOMP プロジェクトであり(12)、5 年間で 5200 万ドルで、相同組換え法のみで、約 8000 の遺伝子破壊 ES クローンを取る予定である。さらに、中国でも 3 年間で 1 億中国元でのプロジェクトが始められることが決定された。世界中の予算を合計すると、年間約 40 億円のプロジェクトとなる。筆者らも、我が国のプロジェクトの必要性を叫んでいるが、まだ実現していない。早く始めないと、日本は何の貢献もできないことになる。

2) ノックアウトプロジェクトの理念と思想

理念は、生命科学の全領域における研究推進であり、リサーチのためのリソースの創出であり、個人の利益ではなく公の利益のためである。したがって、このプロジェクトは大規模で網羅的でなければならず、それゆえ国家プロジェクトとして実施し、成果は共有するという思想が必要である。また、世界でプロジェクトが進行する中で、我が国が影響力を発揮でき、発言権

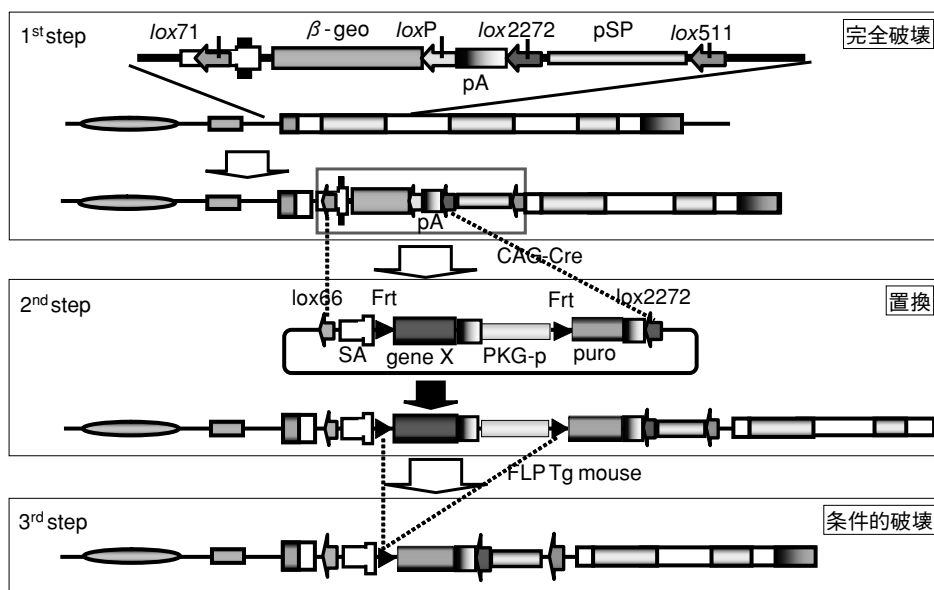


図2 可変型遺伝子トラップ法

を確保できるリソースを持つ必要がある。

3) 必要性

ヒトゲノムプロジェクトにおいて、我が国は8%のゲノムの塩基配列を決定した。ゲノムの塩基配列の決定により、多額の研究費を持たず自ら塩基配列の決定を大規模に行えない研究者にとっても、大きく研究を推進させることができている。遺伝子破壊マウスから得られる情報は、非常に多量であるが、そのコストが高いゆえ、誰でも可能ということではない。多くの研究者が行いたくてもできない状況にある。したがって、個々の研究者にとって、大きな価値がある。ばらばらに進めれば、同じ遺伝子を複数の研究者が作製するという重複が生じるし、コスト、労力、時間が無駄になる。さらに、研究者は遺伝子破壊マウスを作製することが仕事ではなく、それを解析して新しい発見をすることであるので、遺伝子破壊マウスの作製に時間を取られることがなくなれば、それだけ解析に集中でき、研究が進展する。

6. わが国のノックアウトマウスプロジェクト

現在、マウスには少なくとも4種類の亜種が存在している。それらは、*Mus Musculus Domesticus*, *Mus Musculus Castaneus*, *Mus Musculus Musculus*, および *Mus Musculus Molossinus* である。Domesticus は、欧米に分布し、現在ほとんどの研究者が用いている実験用マウス、たとえば 129, C57BL/6 や BALB/c, の起源は *Mus Musculus Domesticus* という亜種である。

Castaneus は東南アジアに、*Musculus* は、ロシアから中国の東北部に分布している。一方、日本には *Mus Musculus Castaneus* と *Mus Musculus Musculus* の雑種である *Molossinus* が分布している。これらの亜種は、約100万年前に分離したといわれ、ゲノムの塩基配列も約1%異なっていることがわかった(図3)。ヒトとチンパンジーの違いが約1.23%といわれているので、この1%の違いは大きいと考えている。また、60,000個のBACクローンもあり、50万種類のSNPも判明している。幸いなことに、この亜種に属する野生マウスが、1978年に国立遺伝学研究所の近くで捕獲された。森脇たちは、このマウスから近交系化を図り、MSM/Msと名づけた。現在までにすでに80代となっている。表現型には、特徴的なものがあり、自発運動は活発で、エネルギー代謝も節約型で、がん等の疾患に対して抵抗性である。つまり、がんが好発する実験用マウスとはかなり異なっている。このMSM/Msとは異なるが、やはり *molossinus* 由来のJF1も樹立されている。筆者らは、これらのマウスからのES細胞の樹立に成功し、生殖系列への伝達も確認した。我が国としては、独自性のあるプロジェクトが求められており、MSM/Ms由来のES細胞を用いることが必要であると思われる。

7. 熊本大学生命資源研究・支援センターの活動

1) 目標

5つの目標を掲げている。すなわち、①遺伝子改変

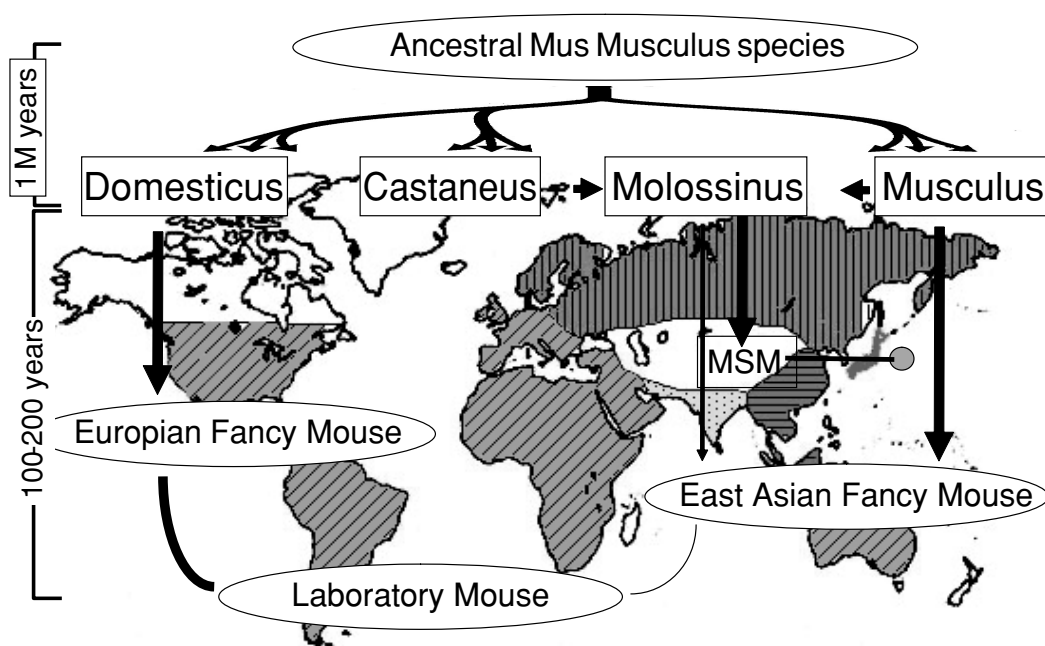


図3 マウスの起源と亜種 (Moriwaki K. Genetics in Wild Mice. 1994 より改編)

マウスの作製、保存、供給の一体化を目指し、かつアジア独自のリソースの確立も目指す、②技術の陳旧化を防ぐため、遺伝子改変マウスの作製、保存、供給に関する技術開発を行う、③マウスのやり取りによる感染リスクを低減あるいは撲滅するため、凍結胚および精子による供給体制の確立を目指す、④凍結胚および精子による供給体制の確立のため、講習会の実施等による人材育成を行う、⑤マウスリソースの活用のため、国内および国際的なネットワーク形成を行う、である。

2) 遺伝子改変マウスの作製について

① 独自リソースの開発

可変型遺伝子トラップ法を用いて、トラップ ES クローンの収集とトラップマウスの樹立を行っている。マウスまで樹立できたものについて、すでに立ち上げた EGTC (exchangeable gene trap clone) データベースに、順次組み入れている。また、アジア独自のリソースの開発のため、MSM/Ms 由来の ES 細胞の樹立を行い、これを用いた遺伝子導入および破壊マウスの作製を行いつつある。

② 受託による遺伝子改変マウスの作製

研究者からの依頼を受け、毎年平均 70 件程度の遺伝子改変マウスの作製を行っている。また、ES 細胞の講習会も行っているが、最近では希望のある講習内容が多様化しており、個別に対応することになっている。

3) 凍結保存と関連した研究開発

① C57BL/6 マウスの精子は、従来の方法では凍結により受精率が 20% と低かった。そこで、高い受精率が得られる新規凍結保存液を開発した。これにより受精率が約 60% と各段に向上したので、企業を通し FERTIUP という商品名で発売を開始した。

② マウス胚や配偶子の凍結保存法はルーチン化しているが、輸送において液体窒素とそのタンクが必要であり、小型化したとはいえ、輸送の準備、輸送元から輸送先へタンクを送るコストのみならず、輸送先から輸送元へタンクを送り返すコストがかかる。そこで、ドライアイス詰めにした発泡スチロールでのマウス精子の輸送法、さらに、凍結乾燥精子による保存法を開発を行っている。

③ 生殖工学の技術を解説した生殖工学マニュアルの CD 版 (日本語、英語、中国版) を作成し、販売している。

4) 受託による凍結保存、供給、クリーニング

毎年 100 件を超える系統収集と凍結保存を行っている。

5) 微生物学的統御

外部からのマウスは、すべてアイソレーターに収容し、一定期間飼育し感染がない場合にのみ、一般飼育室に移すこととしている。また、遺伝子を注入した受精卵やキメラ胚を移植した仮親は、アイソレーターにて飼育し、感染のないことを確認した後、搬出する態勢をとっている。

CARD 搬出時の検査項目は、Mouse hepatitis virus, Sendai virus, Citrobacter rodentium, Clostridium pili-forme, Corynebacterium kutscheri, Helicobacter hepaticus, Mycoplasma spp., Pasteurella pneumotropica, Salmonella spp., Aspicularis tetraptera, Giardia muris, Syphacia spp., Spironucleus muris, Trichomonas spp., Ectoparasite である。

6) 講習会

毎年 2 回の生殖工学技術講習会を行い、技術の普及を行っている。

7) データベース

① CARD R-BASE

国立遺伝学研究所の山崎博士、浜松医科大学の加藤博士の協力の下、CARD R-BASE を立ち上げ、凍結保存しているマウス系統に関する情報を公開している。FIMRE 参加機関等のデータベースを統合した IMSR (international Mouse Strain Resources) が構築された (<http://www.informatics.jax.org/imsr/index.jsp>)。

② EGTC データベース

可変型遺伝子トラップ法を用いて作製した ES トラップクローンについて、EGTC を作成し公開している。International Gene Trap Consortium の参加機関で、統合データベースが構築された (<http://www.igtc.ca/FAQ.html>) (13)。

8) 国際活動

① Federation of International Mouse Resources (14)

この設立に参加し、国際間でのマウスリソースの保存供給のネットワークの形成を行いつつある (<http://www.informatics.jax.org/imsr/fimre.html>)。

② AMMRA

アジアでのマウスリソースの開発と保存供給のネットワーク形成のための活動を行い、2006 年 11 月 22 日—24 日に中国上海において、北京大学生命科学学院、協和医科大学・中国医学科学院、上海生命科学学院上海実験動物センター、上海模式生物研究センター、南京大学模式動物研究センター、台湾実験動物センター、韓国生物科学・バイオテクノロジー研究所、シンガポールリソースセンターとの間で連合体を形成した。

文 献

- 1) Casadaban MJ, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1979;76:4530-4533.
- 2) Fried M, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1983;80:2117-2121.
- 3) O'Kane CJ, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84:9123-9127.
- 4) Allen ND, et al. Nature. 1988;333:852-855.
- 5) Kothary R, et al. Nature. 1988;335:435-437.
- 6) Gossler A, et al. Science. 1989;244:463-465.
- 7) Shigeoka T, et al. Nucleic Acids Res. 2005;33:e20.
- 8) Araki K, et al. Nucleic Acids Res. 1997;25:868-872.
- 9) Araki K, et al. Cell Mol Biol. 1999;45:737-750.
- 10) Araki K, et al. Nucleic Acids Res. 2002;30:e103.
- 11) Auwerx J, et al. Nat Genet. 2004;36:925-927.
- 12) Austin C, et al. Nat Genet. 2004;36:921-924.
- 13) Nord AS, et al. Nucleic Acids Res 34(Database Issue). 2006; D642-D648.
- 14) FIMRe Board of Directors. FIMRe. Mammalian Genome. 2006;17:363-364.

著者プロフィール

山村 研一 (やまむら けんいち)

熊本大学 発生医学研究センター・臓器形成分野, 教授, 医学博士.

◇ 1973年3月信州大学医学部卒業, '78年3月大阪大学大学院医学研究科博士過程修了(医学博士), 同年4月富山医科薬科大学和漢薬研究所助手(病態生化学部門), 同年10月米国Yale大学 Department of Biology 研究員, '80年10月富山医科薬科大学和漢薬研究所助手(復職), '81年4月大阪大学医学部助手(老年病医学講座), '84年7月同上講師, '86年4月熊本大学医学部 教授, '00年4月熊本大学発生医学研究センター 教授(改組に伴う配置替).

◇ 研究テーマ: 哺乳類の発生と疾患発症における遺伝と環境の相互作用. ◇ 趣味: シュノーケリング. ◇ 主な著書:

1. 山村研一. 考える遺伝学. 南山堂; 1997年2月 pp1-180.
2. 森脇和郎, 山村研一, 米川博通編集. モデル動物の作製と維持. Life-Science Information Center; 2004年7月.

