

マウス個体における遺伝子ノックアウト

八 木 健

(岡崎国立共同研究機構・生理学研究所)

1. はじめに

安定したマウス胚幹 (ES) 細胞株樹立と相同遺伝子組換え法技術開発により、マウス染色体を目的に応じ自在に変換したマウス個体の作製が可能となった。この技術革新により、染色体上に存在する遺伝情報が哺乳類個体レベルでの生理現象をどの様に制御しているかを解明する方向性が拓かれた。また、これらの手法は現在コンディショナルノックアウト法をも生みだし、特異組織の特異時期における遺伝子欠損法も可能となってきている。ここでは我々が生理学研究所において行っているノックアウトマウス作製技術について紹介したい。

2. ノックアウトマウス作製の原理

ES 細胞はマウス 4 日胚の内部細胞塊より樹立されたもので、マウス個体の全ての細胞に分化できる性質を持っている。LIF (leukemia inhibitory factor) は ES 細胞の分化を抑制する因子であり、この因子を培養液中に添加することにより安定した ES 細胞の培養が可能となる。現在までに、129 系統のマウスを中心として多くの ES 細胞株が樹立されているが、我々は CBA と C57 BL/6 マウスの F1 より徳永智行博士により樹立された TT2 細胞からサブクローン化した細胞を用いている(1)。このマウス系統の遺伝的背景は重要であり、マウス系統によっては生理現象が全く異なっている場合があることに注意する必要がある。129 系のマウスでは空間学習課題として用いられるモリス水迷路学習ができない系統であることが報告され議論を醸し出している。相同組換え細胞を得てキメラマウスを作製し、特定遺伝子ノックアウト

マウスを得る原理を図 1 に示す。

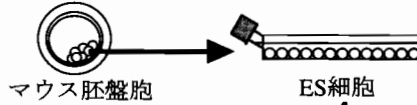
3. ターゲティングベクター構築法

ターゲティングベクターを構築する際に重要となるのは、遺伝子変換マウスを作製する目的である。遺伝子欠損による効果を明らかにする場合も null となるのか、一部の遺伝子発現が残るのか考慮をする。現在特に、後に述べるような Cre-loxP システム、テトラサイクリンによる遺伝子発現制御システムを用いることができるので遺伝子変換マウスができた後の研究の展開まで考えておきたい。その際、特に重要となるのは遺伝子座のどの位置に変異を導入するかであるが、翻訳開始コドン、機能ドメイン、スプライシング領域のどの位置に変異を挿入するか十分考えることが必要である。

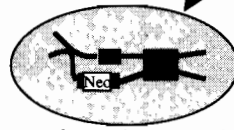
4. ゲノミック遺伝子のスクリーニング

どの位置に変異を導入するかがきまったら、その cDNA 領域をプローブに用いてスクリーニングを始める。用いるゲノミック DNA ライブラリーは、できるだけ用いる ES 細胞由来のものを用いる。我々の用いている TT2 細胞などの様なヘテロな遺伝的背景を持つ細胞株については実際に解析を行うマウス系統側でのライブラリーを選択する。マウス系統によりゲノミック DNA の遺伝子配列が完全に一致しているかは不明な場合が多く、系統差による遺伝子配列の違いにより相同組換え体が得られない場合もあるので注意する。我々は杉野英彦博士により作製された EMBL3 の BamHI サイトに TT-2 細胞ゲノミック DNA を MboI で partial digestion した15から 20 kbp が入ったライブラリー (EMBL-TT2) を主に用いている。

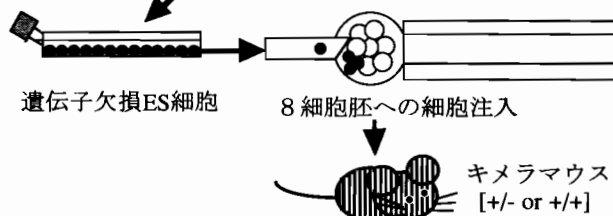
(1) ES細胞の樹立



(2) 相同遺伝子組換えによる遺伝子変換



(3) キメラマウスの作製



(4) 遺伝子欠損マウスの作製

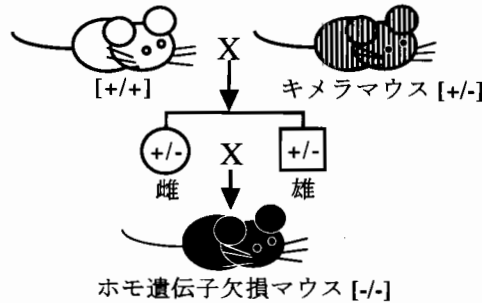


図1. ターゲティングマウス作製の原理

ライブラリーのスクリーニング法は一般的な方法であるが、宿主の大腸菌 XL1-blue MRA (P2) を用い、約106のファージをスクリーニングしている。1st スクリーニングでポジティブがあれば、イエローチップの先をハサミで切ったものを用いてピックアップする。SM 溶液中でピッピングして1/100量のクロロフォルムを加えて保存する。2nd スクリーニングでは10 cm ディッシュに約10から100個のプラークができるように撒き、シングルプラークをとる。ファージ DNA と ES 細胞ゲノミック DNA を3種ほどの制限酵素で消化し、サザン

プロット法で比較する。得られた DNA が ES 細胞ゲノミック DNA と同様に消化されているか確認する。もし、異なる場合は偽遺伝子、DNA の組換わりなどが考えられるので、更に取り直す必要がある。

次にこのゲノミック DNA を Bluescript 等のプラスミドに挿入する。多くの場合 SalI サイトで切り出されるが、もしゲノミック DNA 中に SalI サイトがある場合は、部分的に入れておき、制限酵素地図より前後をしっかりと決める。ゲノミック DNA がプラスミド中に挿入されたものを用いて、大まかな制限酵素地図、ター

ターゲティングベクター

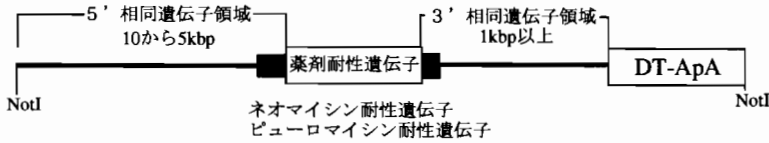


図2. ターゲティングベクターの略図

ゲティングするエクソンの位置の決定, そのエクソン周辺の塩基配列を決定する.

5. ターゲティングベクターの相同遺伝子組換え

ターゲティングベクターは目的とした遺伝子座の DNA と相同組換えさせるためのベクターであり, 挿入したい外来遺伝子を相同遺伝子により挟んで, その両側で相同組み換えを起こさせる. しかし, 相同遺伝子組み換えの頻度は低く, その効率をあげる工夫も必要となる.

1) 5' 側, 3' 側の相同遺伝子領域をなるべく長くする. 通常どちらかの片側を 5 kbp 以上にする. 10 kbp 以上でもよく, 長いことが望まれる. 一方が長ければ, もう片方は短くてもよく, 0.5 kbp 以上あればよいという報告もある. しかし, 安全性を考慮して, もう片方も 1.0 kbp 以上にした方がよい.

2) 外来遺伝子の長さには相同組み換えの頻度は影響しないことが報告されているが, 挿入する遺伝子座のある長さ削除してその代わりに外来遺伝子を導入したい場合, 削除される遺伝子領域より外来遺伝子領域が短いと極端に相同組み換えの頻度が低下する.

3) 挿入する外来遺伝子には薬剤耐性遺伝子を用いる. 現在, 多くの場合 neo 遺伝子を用いられているが, ピューロマイシン耐性遺伝子も効率よく用いることができる. ハイグロマイシン耐性遺伝子も用いられている.

4) 相同組み換えがおこる外側にネガティブ遺伝子を導入する. このネガティブ遺伝子には, HSV-tk 遺伝子, DT-A 遺伝子を用いられているが, 我々は培養液中に薬物を加える必要がない DT-A 遺伝子を用いている(2). 今までトラ

ンジェントな発現による細胞死が DT-A 遺伝子で危惧され, poly A 付加シグナルを付けないベクターを用いてきたが, トランジェントな発現による細胞死は ES 細胞では起こりにくいことが最近我々の研究室で明らかとなり, 現在我々は DT-A と neo 遺伝子の polyA 付加シグナルを抜くこと無しに選別を行っている.

5) 相同組換え体を選別する際に PCR 法を用いることにより, 労力, 培養スペースを押さえることができる. しかし, PCR の条件検討を十分行う必要があり, 偽陽性が多く得られる場合があるので, 現在我々は, 直接サザンブロット法により解析を行っている.

以上の条件を満たす理想的なターゲティングベクターを図2に示す. なお, ターゲティングに必要なベクターは pGKNeopA, pGKPacpA, pMC1DT-ApA である. また, 遺伝子導入の際にターゲティングベクターを線状化する必要があるので注意する. 我々は pMC1DT-ApA に NotI サイトを線状化用に挿入している. これらのライブラリー, ベクターについては我々の研究室より供与可能である.

6. ターゲティングベクターの ES 細胞への導入法

タイムテーブル

日数	ES 細胞	フィーダー細胞
1		凍結プライマリー細胞を戻す.
2		
3		
4		
5		フィーダー細胞の調整.
6	凍結 ES 細胞を戻す.	
7		凍結プライマリー細胞を戻す.
8		

9. エレクトロポレーション法

1) 0.4 cm 幅のエレクトロポレーション (Bio-lad 社) チューブに調製した 50 nM の DNA を 50 μ l 入れ, 細胞懸濁液を 0.45 ml 加えて 1 ml のピペットでよく混ぜる.

2) 250 mV, 960 mF., 抵抗無限大でエレクトロポレーションをかける.

3) 電気の流れる時間は約 40 msec となる. 35から 45 msec では問題ないが, 極端に違う場合は機械の設定, HBS の組成に誤りがある場合であり, 調べる必要がある.

4) 10分間静置後, 20 ml の培養液に懸濁して, フィーダー細胞を敷き詰めた 10 cm dish に 10 ml ずつ撒く.

10. 薬剤選別

1) エレクトロポレーションした翌日に, 通常の培養液交換を行う.

2) エレクトロポレーション後36から48時間で選別培地を加える.

G 418 の場合, 150~200 mg/ml, ピューロマイシンの場合, 0.1~1 mg/ml で選別する.

3) 以後毎日, 培地交換を行うが, ピューロマイシンの場合は 2 日間で十分である.

4) エレクトロポレーション後 6 日目でコロニーがはっきりし始めるが, ピックアップは 7 日か 8 日目に行う.

11. ピックアップ法

我々はピペットマンによりコロニーをピックアップしている.

1) あらかじめ24穴プレートの培養液を ES 用培養液に変えておく.

2) 10 cm dish 培養皿の培養液を吸い取り, EDTA-PBS を 10 ml 入れる.

3) 20 μ l のピペットマンを 10 μ l に設定して, コロニーの周りをつつき一気に吸い取る.

4) 明らかに分化したもの以外はコロニーを拾う.

5) チップ中に吸い込まれていることを確認

して, 96穴プレートに回収する. 12から24個を 1 ステップとして拾う.

6) 50 μ l の 2.5% トリプシン溶液を加え, 24穴プレート中より取った培養液を 150 ml を加えて, 10回ほどピペティングして24穴中に戻す.

7) 24穴プレートで細胞が増えたら, トリプシン処理をして半分を凍結し, 半分をゼラチンコートした24穴に撒く.

12. サザンブロット法による解析

1) ゼラチンコートした24穴プレートに撒いた細胞が増えたら, 無菌的に PBS で洗い, DNA 溶出緩衝液を 1 ml ずつ加える.

2) 3分程したら 1 ml のピペットマンでどろどろとなった溶液を吸い取り 2 ml のエッペンンドルフチューブに入れる.

3) Proteinase K を加え 55°C で一昼夜置く.

4) フェノール, フェノール・クロロフォルムを順次加える. この時 1 分間ボルテックスをかける.

5) エタノール沈澱により DNA を回収し, 適当な制限酵素消化を行い, 相同組み換え体を判定する.

6) 相同組み換えが起こると, 通常 1 本であったバンドが 2 本となるようにプローブ, 制限酵素を設定する. プローブはできるだけターゲットベクターを含まない領域を用いる. 相同組み換えが起こった場合, 得られた 2 本のバンドの濃さは同じになるはずであり, 極端に異なる細胞株は避ける.

7) サザンブロットで確認された細胞株については, 凍結したものを起こし, キメラマウス作製に用いる. この際, 段階的に細胞を凍結保存して行く.

13. キメラマウス作製法

キメラマウス作製法については熟練が必要である. その方法に関しては他にまとめているので参考としてもらいたい(3,4). 現在キメラマウス作製法には, マウス胚に ES 細胞を注入す

るマイクロインジェクション法と、透明帯を除いたマウス胚に ES 細胞を凝集させるアグリゲーション法がある。双方ともマウス胚が正常発生する時点で ES 細胞を導入し、宿主細胞と ES 細胞が混在したキメラマウスをつくる方法である。得られたキメラマウス中で ES 細胞が生殖細胞に分化すれば、ES 細胞中で操作した染色体が子孫に遺伝する。ヘテロ遺伝子欠損マウスができる。これが雄で性染色体上に存在する遺伝子である場合はこの段階で遺伝子欠損マウスが得られることになる。

14. ヘテロ遺伝子欠損マウスからホモ遺伝子欠損マウスの作製

ヘテロ遺伝子欠損マウス同士を掛け合わせるにより、1/4の確率でホモ遺伝子欠損マウスが得られる。ヘテロの状態で異常となり交配が行えないなどの問題が生じる場合も考えられるが、これらの場合は体外受精などの胚操作により解析可能となる場合もある。ホモ遺伝子欠損マウスでは胎生期、離乳期前に死亡することも多く、生まれた遺伝子型の頻度には注意する必要がある。

15. ジーンターゲティングによる新たな戦略

1) ノックイン法

ジーンターゲティング法により遺伝子座を改変できるようになったことから、ターゲット遺伝子の発現を利用することもできる。今までこのような実験は、トランスジェニックマウスによりなされてきたが、トランスジェニックマウスでは発現させたい遺伝子に特定のプロモーター及びエンハンサーを付加する必要がある。この発現制御領域がはっきり決められているものには限りがあった。また、トランスジーン染色体上の挿入位置により発現様式が変化するので、発現様式を定めたトランスジェニックマウス系統毎に確かめる必要があった。lacZ, GFP 遺伝子の挿入による発現様式解析, DT-A 遺伝子などの毒性遺伝子導入による特定細胞の削

除, 薬剤耐性遺伝子導入による特定細胞培養系の確立等が考えられる。

2) コンディショナルノックアウト法

遺伝子ターゲティング法は染色体上に存在する遺伝情報の個体レベルでの役割を解析する方法である。しかし、種々の遺伝子欠損マウスの解析結果により幾つかの問題点が指摘されている。その1つは特定の遺伝情報がある組織のある時期に限って用いられているわけではなく、個体発生において重複して用いられていることが多いため、遺伝子を発生の初期より欠損させる遺伝子ターゲティング法では、欠損した遺伝子が最も初期に機能する組織での異常の解析となってしまうことである。例えば、生後に脳神経系で学習・記憶に関連すると想定される遺伝子をターゲティングしたマウスが発生中に死亡してしまったときには、この遺伝子の学習・記憶での分子機能を解析できなくなる。また、死亡しない場合でも遺伝子欠損による二次的異常の問題が残る。この問題を克服する方法として最近、時期及び組織特異的遺伝子ターゲティング法(コンディショナルノックアウト法)が開発され応用されている。この戦略に関しては幾つかの方法が指摘されているが、現在展開されているのは Cre-loxP 系を用いた方法(5)とテトラサイクリンによる阻害・誘導系を用いた方法である(6)。原理については図3に示した通りであるが、それぞれの利点と欠点について考えてみたい。Cre-loxP 系を用いた方法では Cre を発現させることにより、loxP 配列の組み換えを起こさせて遺伝子を欠損させる。この方法の利点としては、一度組み換えが起これば完全に遺伝子発現を押さえることができることである。よって、Cre を時期及び組織特異的に発現させることが可能となれば2つの loxP 配列間での組み換え後は、その細胞由来の子孫細胞では特定の遺伝子発現を完全に押さえることができる。しかし、これを使うにあたり問題点が指摘されている。1つは Cre を時期及び組織特異的に発現させることがどれだけ有効に行

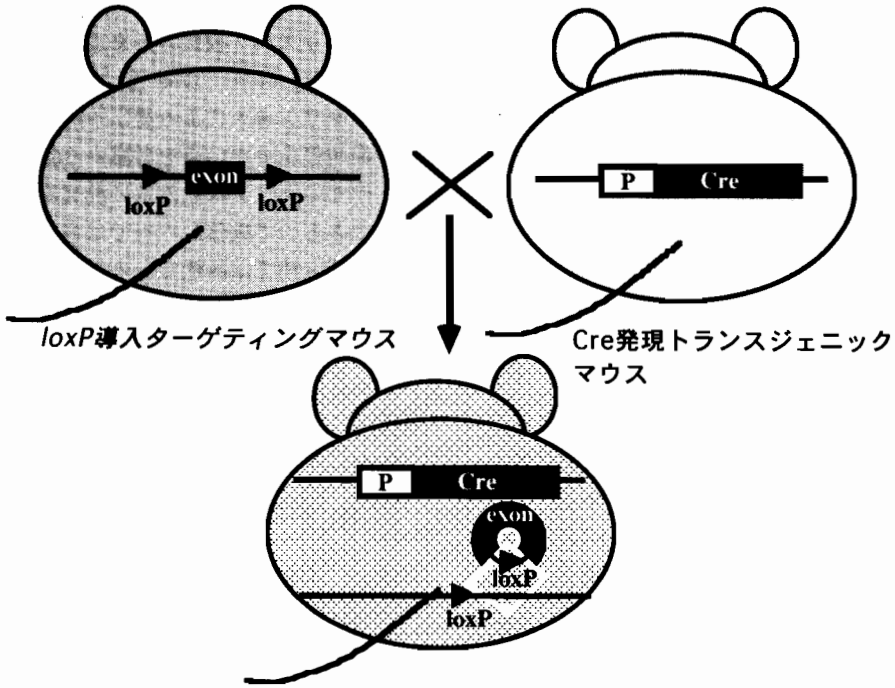
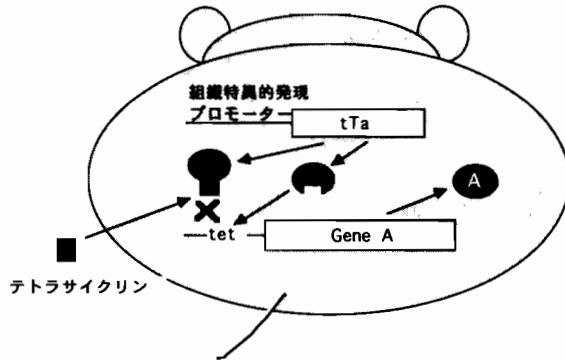


図3 A. Cre-loxP系を用いたコンディショナルノックアウト法
Cre が組織及び時期特異的に発現するとその領域及び時期以降の遺伝子欠損が実現する。P; プロモーター



テトラサイクリントランスアクティベータ (tTak) を用いた遺伝子発現トランスジェニックマウス。テトラサイクリンの投与により遺伝子Aの発現を抑制できる。A遺伝子欠損マウス中でこの系を導入するとコンディショナルA遺伝子欠損を実現できる。

図3 B. テトラサイクリントランスアクティベータを用いたコンディショナル遺伝子発現制御法

組織特異的プロモータ下でテトラサイクリントランスアクティベータ (tTa) を発現させると、Gene A の遺伝子発現が誘導される。そこにテトラサイクリンを投与することにより tTa がプロモータ領域に結合できず Gene A の発現が抑制される。tet; テトラサイクリントランスアクティベーター結合配列。

えるかということである。トランスジェニックマウスにおいて有用性が確認されているプロモーターには限りがあり、自らの系に関する有効なプロモーターを開発する必要がある。また、Cre が十分に作用するだけの発現量と発現時期が求められる。Cre の発現により全ての細胞で組み換えが起これば問題はないが、組み換えがどれだけの頻度で起こるかは不明である。この場合には、遺伝子が欠損している細胞と欠損していない細胞とを区別して機能解析する必要がある。

また、テトラサイクリンの遺伝子発現調節系を用いたコンディショナルノックアウト法は、遺伝子欠損マウスに対しテトラサイクリンの遺伝子発現調節系を別に導入することにより、テトラサイクリン投与により遺伝子発現を on-off

する系である。この場合、遺伝子ターゲティングしたマウスに2種類の外来遺伝子を導入する必要がある、作製に時間がかかる。また、テトラサイクリン導入による遺伝子抑制は完全な遺伝子発現停止でない点を考慮する必要がある。テトラサイクリンは飲み水に混ぜることにより投与できるので成体レベルでは容易であるが、胎生・哺乳期では困難である。また、テトラサイクリン投与は導入時期を制御できる利点があるものの、生体内での組織特異性には厳密性が欠けることが予想される。よって、ある組織特異的なプロモーターと組み合わせたストラテジーをとる必要がある。

16. 将来性を見越したストラテジー

コンディショナルノックアウト法は今後必要

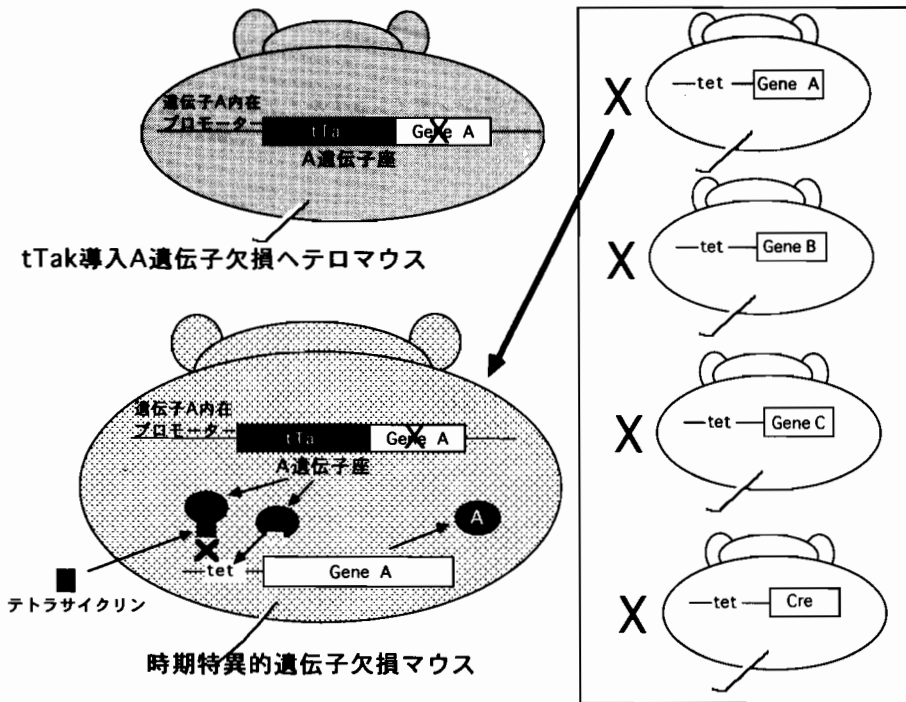


図4. テトラサイクリントランスアクティベータを用いた遺伝子ターゲティングによるコンディショナルノックアウトマウスの作製。相同遺伝子組換えにより tTa 遺伝子をノックアウトしたい遺伝子座 (Gene A) に挿入することにより、Gene A の代わりに tTa が発現する。この発現を利用して tet 下で Gene A を発現させることにより遺伝子欠損を解消しておく。この状態のマウスにテトラサイクリンを投与すると Gene A の発現が抑制されコンディショナルノックアウトが実現する。このマウスは他の遺伝子 (Gene B, C, Cre) を発現させテトラサイクリン投与により発現抑制されることにも用いることができる。

不可欠になると予想されるが、現時点での問題としては、時期及び組織特異的に遺伝子を発現させる方法をどの様に系列化していくかである。我々はこの点に関して、次のようなストラテジーを提唱したい。すなわち、遺伝子ターゲティングしたい遺伝子座にテトラサイクリントランスアクティベーター (TET-A) 遺伝子を導入する方法である(図4)。TET-A はテトラサイクリンによって抑制される転写活性因子で、テトラサイクリン非存在下では特定の塩基配列を認識して転写を活性化する。この方法では目的の遺伝子産物は欠損し、代わりに導入されたTET-A が挿入遺伝子座の発現パターンを反映して発現することになる。例えば、TET-A 認識配列の下流に欠損遺伝子をつないだ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスとこのマウスを交配すれば、見かけ上遺伝子発現を回復した正常なマウスが得られる。そしてこの正常化したマウスにテトラサイクリンを与えれば、その時期だけ遺伝子発現を抑制することができる。すなわち、時期特異的な遺伝子ターゲティングが実現するのである。さらに挿入遺伝子座の発現パターンがユニークであった場合、TET-A 認識配列の下流につなぐ遺伝子を変えれば、挿入遺伝子座の発現パターンを他の遺伝子発現に応用することが可能となる。このようにして行けば、種々の時期及び組織特異的な遺伝子発現マウス系列を揃えることができる。また、ジーントラップ法でTET-A 導入マウスを系列化することも検討する必要がある。その結果、TET-A 下で自らの目的とした遺伝子を発

現させるトランスジェニックマウスを1種つくれば、これらの系列マウスとの掛け合わせにより様々な組織特異的な遺伝子発現マウスの作製が実現でき、テトラサイクリンの投与により時期特異的に発現を抑制することもできる。

ま と め

ここでは基本的なジーンターゲティング技術とその展開について解説してきた。現在多くの遺伝子操作の道具がそろい、マウスにおいてはほぼ自由自在に染色体上の遺伝子配列を変換できるようになってきた。この技術により個体レベルでの生理現象を分子レベルで迫る可能性が広がってきた。生理学を目指す研究者にこれらの手法を有効に使ってもらえることを希望する。

文 献

- 1) Yagi, T., Tokunaga, T., Furuta, Y., Nada, S., Yoshida, M., Tsukada, T., Saga, Y., Takeda, N., Ikawa, Y. and Aizawa, S. A novel ES cell line, TT 2, with high germline-differentiating potency., *Analytical Biochemistry* **214**: 70-76 (1993)
- 2) Yagi, T., Nada, S., Watanabe, N., Tamemoto, H., Kohmura, N., Ikawa, Y. and Aizawa, S. A Negative selection for homologous recombinants using diphtheria toxin A fragment gene., *Analytical Biochemistry* **214**: 77-86 (1993)
- 3) Joyner, A. L. 'Gene Targeting', IRL press, at Oxford.
- 4) 新生物化学実験のてびき4, 化学同人, 第5章
- 5) Gu, H., Zou, Y. R. and Rajewsky, K. : *Science*, **265**: 103-106, 1994
- 6) Mayford, M., Abel, T. and Kandel, E. R. : *Curr. Opin. Neurobiol.*, **5**: 141-148, 1995