シリーズ「生理学者のための分子生物学技術講座」

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て個体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日齢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っている。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C57BL/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した細胞を用いている。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目する必要がある。129系のマウスでは空間学習課題として用いるならば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。相同組換え細胞を用い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を考慮する。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る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、翻訳開始コードン、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領域をブ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細胞などの様々なヘテロな遺伝的背景を持つ細胞株についても実際に解析を行うマウス系統関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サイドにTT2細胞ゲノミックDNAをMboIでpartial digestionした15から20kbが入ったライブラリー（EMBL-TT2）を主に用いている。
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 (P 2) 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1/106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 10cm ディッシュに約10から100個のブラークができるように散き、シングルブラークをとる。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 の組換え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、部分的に入れており、制限酵素地図より前後をしっかりと決めめる。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、アーキ

図 1. ターゲティングマウス作製の原理
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、その両側で相同組換えを起こさせる。しかし、相同遺伝子組換えの頻度は低く、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、もう片方側は短くてもよし、0.5 kbp 以上あればよいという報告もある。しかし、安全性を考えて、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、挿入する遺伝子座を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 遺伝子が用いられているが、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 遺伝子が用いられているが、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)。今までトラノジェントな発現による細胞死が DT-A 遺伝子で危惧され、polyA 付加シグナルを付ける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択を行っている。

5）相同組換え体を選択する際には PCR 法を用いるが、労力、培養スペースを抑えることができる。しかし、PCR の条件検討を十分に行う必要があり、偽陽性が多く得られる場合があるので、現在我々は、直接サザンプ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 pGKNeoA, pGKpA, pMC1DT-ApA である。また、遺伝子導入の際には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。これからのライブラリー、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

<table>
<thead>
<tr>
<th>日数</th>
<th>ES 細胞</th>
<th>フィーダー細胞</th>
</tr>
</thead>
<tbody>
<tr>
<td>1</td>
<td>冷凍プライマリー細胞を戻す。</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>2</td>
<td>冷凍プライマリー細胞を戻す。</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>3</td>
<td>冷凍プライマリー細胞を戻す。</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>4</td>
<td>冷凍プライマリー細胞を戻す。</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>5</td>
<td>フィーダー細胞の調整。</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>6</td>
<td>冷凍 ES 細胞を戻す。</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>7</td>
<td>冷凍プライマリー細胞を戻す。</td>
<td></td>
</tr>
<tr>
<td>8</td>
<td>冷凍プライマリー細胞を戻す。</td>
<td></td>
</tr>
</tbody>
</table>
7. ターゲティングベクターの精製

ターゲティングベクターが得られたら、large scaleでDNAを精製する。
1) 精製法はCsCl密度を用いる必要はなく、アルカリ法で抽出、PEG沈殿で精製している。
Quiagen kitによる抽出でもよい。
2) 綿状化は約500μgのDNAに対して、500unitsのNotIを加え、3時間からオーバーナイトで切断する。電気泳動によりチェックして切れ残りがないかみる。切れ残りがある場合は更に制限酵素を加えて切断する。
3) 同量のフェノール・クロロフォルム溶媒でボルテックス、遠心、上清をとる。
4) 1/10容量の3M酢酸ナトリウム、2.5倍容量の冷エタノールを加え、エタノール沈殿を行う。
5) 70％エタノールを加えよく振り、室温で5分ほど置く。この処理により残菌が行われる。
6) クリーンベンチ内で70％エタノールを吸い取り、無菌的に開封した100％エタノールを加え、洗う。エタノールは沈殿を吸い取らぬよう注意する。
7) クリーンベンチ内でふたを開け、10分程風乾する。くれぐるみUVランプを付けることのないよう注意する。
8) 細菌HBS溶液を加え、50nMのDNA溶液になるように調製する。エタノール沈殿で約80％が回収されるため、はじめは濃いめに調整し、DNA量を測定した後に容量を増やす。
最終的に5nMとする。10kb DNAで100nM=650mg/mlとなる。
9) 一度調整したベクターは-20℃で保存できる。

8. ES細胞の調製

1) 2.5×106で凍結してある細胞を42℃で融解し、フィーダー細胞上に撒く。
2) 毎日培養液の交換を行い、3日目に継代する。
3) 細胞数を計算し1×10³/6cm dishに撒く。この際にできた培養皿数によりエレクトロポレーションできる数が決まる。1種類あたり1枚以上必要である。もし数が足りない場合は、もう一度継代して数を増やす。
4) 毎日培養液を交換し、3日目は朝一番に交換しておく。
5) 暖めた3mlのEDTA-PBSで洗い、0.5mlの2.5％トリプシンで処理する。（37℃、5分間）
6) 軽くゆらして細胞が剥がれる状態ならば、細かくすり細胞を浮遊させる。
7) 4.5mlの培養液を加えよくピペットイングする。このピペットイングは戦えない内は一枚ずつ行う。
8) 1000rpm、5分間遠心した後、よくタッピングして室温にしたHBSを加える。この時の全細胞数を計算する。（死細胞数は数えない）
9) 再度遠心した後、2×10⁷/mlとなるようにHBSで懸濁する。
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 μl 入れ、細胞懸濁液を 0.45 ml 加えて 1 ml のビ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、絶対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る、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、フィンガーフィルを敷き詰めた 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1日目でコロニーがはっきりと始めるが、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 μl のピペットマンを 10 μl に設定して、コロニーの周りをつつき一気で吸い取る。
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かから24個を 1 ステップとして拾う。
6) 50 μl 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回ほどピペットティングして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ティングした24穴に撒く。

12. サザンプロット法による解析

1) ゼラチンコーティングされた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 淀出溶液液を 1 ml ずつ加える。
2) 3 分間後で 1 ml のピペットマンでどれほどとなった溶液を吸い取り 2 ml のエッフェルフチューブに入れる。
3) Proteinase K を加え 55℃ 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、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、相変換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ゲティングベクターを含まない領域を用いる。
7) 相同組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) サザンプロットで確認された細胞株については、凍結したものを使う、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
マウス個体における遺伝子ノックアウト

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クリ
ゲーション法がある。目的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
ことにより、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、逐期前に死亡すること
も多々、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
の様な実験は、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り、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、トランスジェンの染色
体上の挿入位置により発現様式が変化するの
で、発現様式をでき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割
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のある組織のあ
る時期に限って用いられているわけではない。

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
していたときには、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、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
されて用いられている。このストラテジーに関し
てはいく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抑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
発現させることができただけなら 2 つの loxP 配
列間での組み換え後、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抑えることができる。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できただけ有効に行
図3A．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

図3B．テトラサイクリントラスアクティベータ（tTa）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ー下でテトラサイクリントラスアクティベータ（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がプロモーター領域に結合できずGene Aの発現が抑制される。tet；テトラサイクリントラスアクティベータ結合配列。
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、自らの系に関しての有効なプロモーターを開発する必要がある。また、Creが充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り、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
マウス個体における遺伝子ノックアウト

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抜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ある。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る、その時期だけ遺伝子発現を抑制することができると、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、様々な時期及び組織特異的な遺伝子発現マウス系列を備えることができる。また、ジーンツール法でTET-A導入マウスを系抜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入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追える可能性が広がってきた。生理学を目指す研究者にこのような手法を有効に使ってもらえることを希望する。

文献
4) 新生物学実験のてきび４，化学同人，第5章