

遺伝子改変動物の作製とその応用



技術解説

磯谷 綾子*, 岡部 勝**

Production of genetically modified animal and its applications

Key Words : green fluorescent protein, transgenic mouse, green mouse, transplantation

【はじめに】

古くからの品種改良によって一頭のウシから大量の牛乳が得られるようになった。乳牛は年間10000リットルのミルクを産出しその中には300kgもの蛋白質を含ませることが可能である。この蛋白質がヒトの病気を治すような、たとえばヒトの血友病を治療するのに使用されているヒト血液凝固因子であれば、その牛の価値は計り知れないくらい貴重なものになる。

しかし、いくら交配を続けてもミルクの中にウシとは全く関係のないヒトの血液凝固因子蛋白質が分泌されることはない。そこで発生工学の力が必要になり、牛のミルクの中に我々の望む蛋白質を分泌させることが可能になる。

【遺伝子改変動物の作製】

それではどうすればヒト以外の動物にヒトの遺伝

子を発現させることができるのであろうか。実は当たり前のようであるが、動物はすべてDNAという共通の言語を使用しており、広く動物から植物までかなりの部分を共有している。いろいろな種の動物からの遺伝子を組み合わせて機能する遺伝子を作り出すことが可能である。これは人間同士でさえ国が違えば意志の疎通に問題が生じていることを考えれば、ハエとヒトなど異種間のDNA同士がお互いの配列の意味を理解できることを意味しており、よく考えると画期的な発見である⁽¹⁾。我々の行った実験を例として以下に解説するが、その前に緑色蛍光蛋白質(GFP)について述べる。

【緑色蛍光蛋白質(GFP)】

緑色蛍光蛋白質(GFP)は発光性のクラゲであるオワンクラゲに由来している。オワンクラゲの発光のしくみは、体にある発光器官にエクオリンと呼ばれるタンパク質があり、カルシウムイオンが結合するとルシフェリンに相当するcoelenterazineを酸化して青色の蛍光(極大発光波長： $\lambda_{em}=469nm$)を発することに由来する。この反応を利用して、これまでエクオリンはカルシウムイオンの定量に利用されてきた。その後、明らかになったことであるが、オワンクラゲにはGFPも存在しており、励起されたエクオリンから直接エネルギーを受け取るほか、エクオリンから放出された青色光によって励起され、緑色蛍光($\lambda_{ex}=509nm$)を出すことがわかった。このような仕組みで、オワンクラゲは青色ではなく緑色の蛍光を発するのである。GFPは238個のアミノ酸から成る約27kDのポリペプチドであり、その内65-67番目のアミノ酸であるSer-Tyr-Glyが環状化した後、酸化されて発色団を形成する。GFPは発色団を取り囲むように11枚のbeta-sheetが配位する樽型構造をとることがX線解析により明らかにさ



* Ayako ISOTANI
1978年6月生
2003年大阪大学大学院・薬学研究科・博士前期課程修了
現在、大阪大学大学院薬学研究科博士後期課程学生、生殖生理学
TEL 06-6879-8375
FAX 06-6879-8376
E-Mail isotani@gen-info.osaka-u.ac.jp



** Masaru OKABE
1948年9月生
大阪大学大学院薬学研究科修士課程修了
現在、大阪大学遺伝情報実験センター、教授、薬学博士、発生工学
TEL 06-6879-8374
FAX 06-6879-8376
E-Mail okabe@gen-info.osaka-u.ac.jp

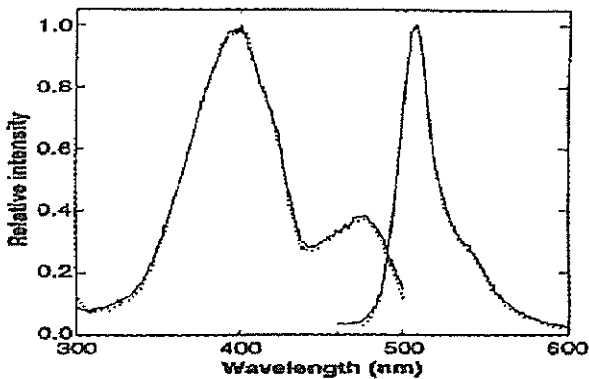


図1. GFPの励起波長と蛍光波長

れている。図1に、Aequorea victoriaのGFPの励起波長と蛍光波長を示す。発色団を形成するためにはクラゲ由来の特殊な酵素など、第二の因子は必要ではなく、蛋白質が生成されれば、嫌気的条件下で限り環状化がoccurり、発色に適した高次構造を形成するようである。

GFPは蛋白質でありながら励起エネルギーを受け取れば直ちに蛍光を発する機能があり、この性質をあらわすために、いかなる基質もコファクターも必要としない。wild-type(wt)GFPは極大励起波長が紫外領域($\lambda_{ex}=395\text{nm}$)にあるため、通常、励起光源として488nmのレーザー光を用いるセルソーターを用いた解析には適していなかった。GFPの変異体を作製するのはできた変異体を発現する大腸菌コロニーの蛍光が明るくなったり、あるいは色調が変わったりするのを目で観察するだけでできるので、いろいろな方法で変異を導入したGFPが作られ、スクリーニングがなされた。その結果、励起波長が長波長側にずれ、しかも効率よく発光する変異型GFPがいくつも見つかっているほか、アミノ酸を指令するDNAのコドンもクラゲでよく使用されるものから哺乳類でよく使用されているものに変更した変異体がよく光るため、頻繁に使用されている。最近ではクラゲにかぎらずイソギンチャクなど別種の動物から赤い蛍光蛋白質などもとられ、色調のレパートリーはかなり広がっている。

1992年にGFPのcDNAの塩基配列が報告され、1994年にレポーターとしての有用性が示されて以来GFP遺伝子をなんらかのプロモーターに接続することにより遺伝子の発現の様子やGFPとの融合蛋白質を作製することが盛んに行われ現在ではマーカー

として揺るぎない地位を持つに至っている。それはとりもなおさずGFPがマーカーとして大きな利点を持っていることによる。すなわち、観察に先立つ前処理を必要としないという性質のために生きた細胞における遺伝子の発現をreal timeにしかも連続して観察することが可能な点にある。つまりGFPをトランスジーンとして導入して発現させれば、バクテリアから植物・哺乳類にいたるまで自然条件下で青色光を吸収し緑色蛍光を出す生物や細胞を作り出すことができる。

【トランスジェニックマウスの作製】

遺伝子の重要な部分は蛋白質を指令する部分であるコーディング領域のほかにコーディング領域からmRNAを作るように指令するプロモーター領域、その指令を増強するエンハンサー領域、さらには、mRNAの蛋白質への翻訳に必要なpolyA付加シグナルなど多くの領域から成り立っている。遺伝子の重要かつおどろくべき性質は、DNAの配列を言語と考えると、動物の種の垣根をこえて、これらの言語が共通言語である点である。すなわちクラゲもハエもウシも同じ言語体系を使用しているので、上記のプロモーター領域、コーディング領域、polyA付加シグナルなど様々な動物からのものを混合して使用しても問題なく協調的にはたらき、新しい遺伝子として完璧に機能する点である。我々は図2に示すように、Niwaらが作製していたウイルスのエンハ

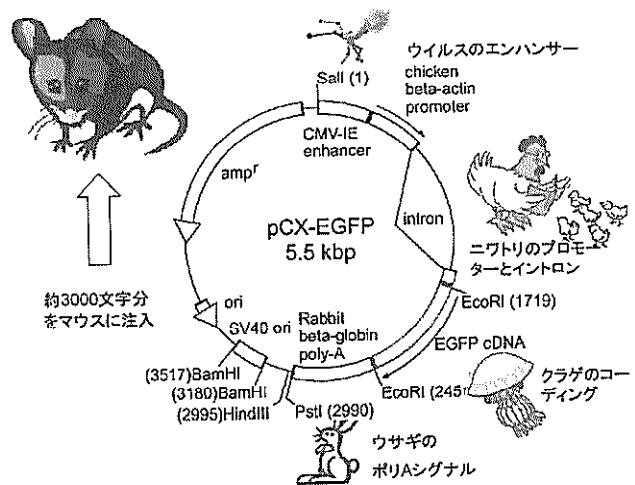


図2. 全身でGFPが発現するように種々の動物由来の遺伝子で構成されたベクター

ンサー、ニワトリのベータアクチンのプロモーター、牛のイントロン配列を利用し⁽²⁾、その後ろにクラゲ由来のGFPの配列を結合し、ウサギのpolyA付加シグナルを組み合わせたものを作製した。これをトランスジーンと呼ぶ。

トランスジーンをマウスの染色体内に組み込ませた物がトランスジェニックマウスであり、いったん染色体に組み込まれさえすれば、子々孫々同じ性質が安定に伝達される。仮に最初に述べたようにヒトの血液凝固因子をミルク内に分泌するウシが得られれば、その子孫であるウシも同じ性質を有する訳である。染色体へトランスジーンを組み込ませる方法にはいろいろとあるが、もっとも広範に行われている方法は、受精卵の前核期にトランスジーンを少量前核内に打ち込むという方法である。このためには受精卵を顕微鏡で観察しながらマイクロマニピュレー

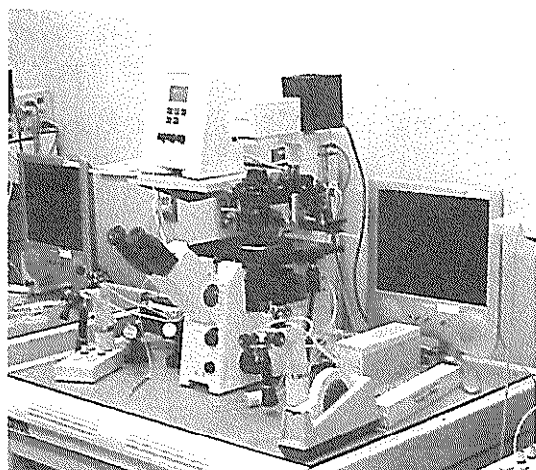


図3. マイクロマニピュレーター



図4. 全身の組織からクラゲのGFPを発現するようになったグリーンマウス

ター(図3)を使用して、ピペットで保持し、前核内に細いピペットでDNAを注入する。このような操作ののちに卵子を偽妊娠状態の雌の輸卵管に移植すると無事着床して産子が得られる。(偽妊娠の雌は、精管を結紮した雄マウスと交尾させることにより作製する。)

このようにして得られたのが図4に示すグリーンマウスである。このマウスは全身の組織からGFPに由来する緑色蛍光を発しており488nmの励起光をあてると暗闇で怪しく光ったのである⁽³⁾。

【グリーンマウスの応用】

“グリーンマウスはいったい何の役に立つのか?”という疑問を抱かれる方は多いかも知れない。以下にいくつかのグリーンマウスを利用した研究の例について簡単に紹介する。

雌雄の産み分け

もしY精子だけ(もしくはX精子だけ)をGFPでラベルできれば、雌雄の精子を生きたまま選別できるので雌雄の産み分けに利用できるかもしれない、というのがそもそもグリーンマウスを作るアイデアであった。残念ながら、精子には細胞質が殆どないのでグリーンマウスの精子は殆ど光っていなかったことと、精子細胞は精子形成の過程で細胞分裂後もcytosolic bridgeと呼ばれる構造でお互いの細胞質がつながっており、半数体になった後もmRNAや蛋白質を共有できる構造になっているため、トランスジーンの産物であるGFPも遺伝子を持つ、持たないにかかわらず共有されてしまう。トランスジーンを持つ精子だけにGFPを局在させるためには、もう一つ何らかの工夫をこらすことが必要でありまのところで成功に至っていない。

さて、精子がダメなら受精卵ではどうか? 雌親からGFP遺伝子を受け継いだグリーンマウスは初期胚の段階からGFPを発現している。まずはそのことを利用して、緑色蛍光を発する胚だけを選んで移植してやればトランスジーン(GFP遺伝子)を受け継いだマウスだけを産ませることができることを証明した⁽⁴⁾。次に我々は、GFP遺伝子が性染色体に組み込まれたラインを得るために、140ラインを超えるグリーンマウスを作製した⁽⁵⁾。残念ながらY染色体にGFP遺伝子が入ったラインは不妊であったが、X染色体に組み込まれたラインを得ることができた。

このトランスジェニックマウスの雄からもX精子とY精子が作られるが、X精子が受精したときだけGFPが子孫に伝わるので雌雄の産み分けが可能である⁽⁶⁾。現在は、選別した胚を用いて雌雄の違いがいつからどのように始まるのか研究を進めている。またこれらのラインはX染色体遺伝子の不活化メカニズムを研究するモデルマウスとしても利用できる。

細胞移植実験

グリーンマウス由来の細胞を移植してやれば、レシピエントマウス内での挙動を経時的に非侵襲的に観察できる。Ohtaらは、グリーンマウス由来の精原細胞(雄性生殖幹細胞)を精子形成不全マウスの精巣に移植し、精細胞が増殖・分化する様子を観察している。また最近幹細胞のtrans differentiationがよく研究されているが、グリーンマウス由来の骨髓細胞を放射線照射した野生型マウスに移植することにより、骨髓細胞から血管系細胞や神経様細胞に分化することが報告されている。これらのtrans differentiationの一部はドナー細胞とレシピエント細胞の細胞融合によるものかもしれないという報告もなされたが⁽⁷⁾、そういった問題も青や赤色などの蛍光蛋白質ラベルしたマウス細胞を組み合わせれば、比較的簡単に検証できるであろう。

キメラマウス作製と解析

グリーンマウスと野生型の胚が8細胞期のころに、胚を包んでいる透明帯を取り除き接合させると二種のマウスの細胞がまざりあったキメラ個体ができる。このような個体におけるキメリズムは各組織で緑色蛍光を観察することにより容易に判別できる⁽⁸⁾。本稿では述べないが特定の遺伝子を破壊するノックアウトという方法を使うと、せっかくノックアウトマウスを作製しても胚性致死となる場合がある。このようなときにその遺伝子の成体における機能解析ができないことになるが、グリーンマウスとのキメラを作製すれば野生型の細胞によりレスキューされたキメラ個体が得られるので、そのマウスを研究すれば、いろいろなことがわかるはずである。

発生工学・生殖工学的手法開発

クローンマウス作製のドナー細胞の供給源としてもグリーンマウスは便利である。GFPの蛍光を指標にすれば、ドナー細胞やレシピエント卵子の系統、クローン卵を移植する偽妊娠マウスの系統を気にする必要がない。グリーンマウス由来の胎児繊維芽細

胞から作製されたクローンマウスはドナーと同じように緑色蛍光を発することが確認されている。

グリーンマウスそのものではないが、GFP発現ベクター(CX-EGFP)は、トランスジェニック動物作製法を検討するのに使い勝手が良い。トランスジェニック動物を作る一般的な方法としてはDNAを受精卵の前核に注入するが、CX-EGFPをトランスジェンに組み込んでおくと産まれたマウスをハンドヘルドのUVランプで照らすだけでトランスジェニックマウスかどうか分かる。驚いたことに、CX-EGFPの断片を精子と短時間インキュベーションした後に、未受精卵に打ち込んで受精させると、効率よくトランスジェニックマウスが作製できることも発見された⁽⁹⁾。そのほかにCX-EGFPを組み込んだレンチウイルスベクターを受精卵に感染させてトランスジェニックマウスが作製できることも報告されている^(10,11)。レトロウイルスを用いた場合には、導入遺伝子の不活化が問題となるが、レンチウイルスベクターではその問題はないとされており、効率的なトランスジェニック動物の作製に使用できる。

またCX-EGFPを利用すればトランスポゾンが染色体間を移動するのを簡単に検出できる。堀江らは、CX-EGFPを人工トランスポゾンに挿入してトランスジェニックマウスを作製し、その中から組み込み部位の関係等でGFPが発現していないものを選んだ。それをSleeping Beauty(人工的にトランスポゼース活性を目覚めさせたことから「白雪姫」と呼ばれている)を発現するトランスジェニックマウスと交配すると、トランスポゾンが移動してEGFPが発現可能な状態になり、マウスが緑色蛍光を発することを報告している⁽¹²⁾。

【GFPを利用したマウス個体レベルでの解析】

最後に、GFPを遺伝子発現のレポーターや蛋白質局在のマーカースとしてトランスジェニックマウスで利用した例を紹介する。

遺伝子発現レポーター

アクロシンは先体(精子頭部にある分泌小胞)の内腔に含まれる酵素であり、受精の過程で先体から放出される。我々はアクロシンのプロモーターを利用することで、精細胞分化時期特異的にGFPを発現するトランスジェニックマウスを作製した⁽¹³⁾。他にもGFAP(astrocyte-specific glial fibrillary

acidic protein)⁽¹⁴⁾や, potassium channel promoter (pKv3.1)⁽¹⁵⁾, T lymphocyte-specific promoter(lck)⁽¹¹⁾などの組織特異的プロモーターの制御下にGFPを発現するトランスジェニックマウスも報告されている。また相同組換えにより内在性プロモーターの下流に挿入するノックインマウスを作製することもできる。これらの遺伝子操作マウスでは目的の細胞がGFPラベルされているので、抗体等で染色することなく目的とする細胞の挙動を経時的に観察することができる。さらにはセルソーター等で生きたまま目的とするGFP陽性細胞だけを選びだして他の個体に移植したりすることもできる。ただしGFPには欠点も指摘されている。たとえばGFP蛋白質は安定であるため遺伝子発現が停止しても直ちに蛍光がなくなるわけではないので短い時間内の遺伝子調節を見るには適していない。またGFPを過剰発現させると他の遺伝子の発現パターンに影響が出たり、時には細胞毒性が見られたりすることもある。これらの解決策として、半減期の短い変異体や毒性の低い変異体などいろいろなバリエーションが市販されている。

融合蛋白質, 細胞内局在, pHマーカー

シグナルペプチドを付加したり融合蛋白質にしたれば、さらにGFPの使い道が広がる。GFPは非常に水溶性が高く、そのままでは細胞内全体に広がるが、シグナルペプチドを付加すれば細胞内の小器官に局在させることができる。図5に示すように、アクロシンのシグナルペプチドを付加したGFPは内在性アクロシンと同様に精子の先体内腔に局在した⁽¹³⁾。現在では、細胞膜や核、ミトコンドリアに局在するシグナルペプチド付きGFPやBFPなども市販されており、細胞内小器官を異なった色でラベルすることもできる。

GFP一分子あたりの蛍光強度は酸性では低くpH

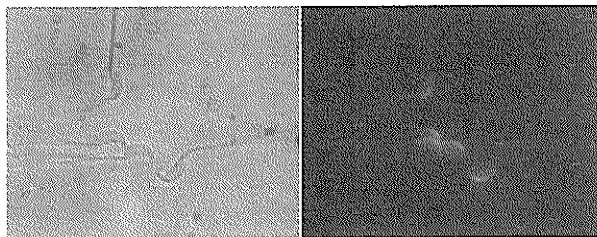


図5. 頭部にある先体と呼ばれる部分に特異的にGFPを発現させた精子

が中性さらにはアルカリ性になるに従い強くなるが、そのことを利用すれば細胞内小器官のpHが測定できる。我々はトランスジェニックマウス精子の蛍光強度を測定し、その値から精子先体内のpHを求めた⁽¹⁶⁾。体外に取り出してすぐの精子には受精能がないが、そのとき先体内pHは約5.3に保たれていた。先体内には多種のトリプシン様プロテアーゼが含まれているが、これらの酵素は酸性条件下では活性がない事実と良く合致する。また精子は培養している間に受精能を獲得するが、精子先体内のpHもそれに伴って上昇することを報告した。我々はEGFPを利用したが、GFPに変異を導入してpH感受性を上げたpHluorins⁽¹⁷⁾も開発されている。

短いシグナルペプチドではなく、目的蛋白質とGFPを融合蛋白質にして機能解析を同時に行うこともできる。さらにFRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer)を利用すれば、細胞内カルシウム濃度を測定したり⁽¹⁸⁾、GFP融合蛋白質の相互作用を観察したり⁽¹⁹⁾することも可能であり、個体レベルでの応用が期待される。ただし、GFP(他の蛍光蛋白質も含む)はホモダイマーやヘテロダイマーを形成しやすいことや、GFPを付加することにより蛋白質の性質が変化することもあるので、結果を解釈する場合には注意する必要がある。

【おわりに】

すでにGFPはレポーター遺伝子・マーカー蛋白質としての地位を確立しているが、特徴を活かせばまだまだ思いもよらない実験ができるであろう。ポストゲノムプロジェクト時代に、ますます重要となる個体レベルでの遺伝子機能解析には遺伝子改変動物を用いた研究が不可欠である。ここでは紙面の都合上GFPを用いる場合のみを紹介したが、特定の遺伝子を発現させるトランスジェニックマウス以外にも、特定の遺伝子を破壊するノックアウトマウスの作製なども重要である。我々が作製したグリーンマウスやグリーンラットなど多くの蛍光マウスは分与可能であるし、また共同研究ベースでトランスジェニックマウスやノックアウトマウスの作製や解析も行っている。いずれも詳しくはホームページに記載されているので参照願いたい。

<http://kumikae01.gen-info.osaka-u.ac.jp/EGR/index.cfm>

【参考論文】

1. G.Halder, P.Callaerts, W.J.Gehring, *Science* 267, 1788-92(Mar 24, 1995).
2. H.Niwa, K.Yamamura, J.Miyazaki, *Gene* 108, 193-9(Dec 15, 1991).
3. M.Okabe, M.Ikawa, K.Kominami, T.Nakanishi, Y.Nishimune, *FEBS Lett* 407, 313-9(May 5, 1997).
4. M.Ikawa *et al.*, *FEBS Lett* 375, 125-8(Nov 13, 1995).
5. T.Nakanishi *et al.*, *Genomics* 80, 564-74 (Dec, 2002).
6. A.K.Hadjantonakis, M.Gertsenstein, M.Ikawa, M.Okabe, A.Nagy, *Nat Genet* 19, 220-2(Jul, 1998).
7. N.Terada *et al.*, *Nature* 416, 542-5(Apr 4, 2002).
8. M.Ikawa, S.Yamada, T.Nakanishi, M.Okabe, *Curr Top Dev Biol* 44, 1-20(1999).
9. A.C.Perry *et al.*, *Science* 284, 1180-3(May 14, 1999).
10. A.Pfeifer, M.Ikawa, Y.Dayn, I.M.Verma, *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 2140-5(Feb 19, 2002).
11. C.Lois, E.J.Hong, S.Pease, E.J.Brown, D.Baltimore, *Science* 295, 868-72(Feb 1, 2002).
12. K.Horie *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9191-6(Jul 31, 2001).
13. T.Nakanishi *et al.*, *FEBS Lett* 449, 277-83 (Apr 23, 1999).
14. L.Zhuo *et al.*, *Dev Biol* 187, 36-42(Jul 1, 1997).
15. F.Metzger *et al.*, *Eur J Neurosci* 15, 40-50 (Jan, 2002).
16. T.Nakanishi, M.Ikawa, S.Yamada, K.Toshimori, M.Okabe, *Dev Biol* 237, 222-31 (Sep 1, 2001).
17. G.Miesenbock, D.A.De Angelis, J.E.Rothman, *Nature* 394, 192-5(Jul 9, 1998).
18. K.Truong *et al.*, *Nat Struct Biol* 8, 1069-73(Dec, 2001).
19. D.A.Zacharias, J.D.Violin, A.C.Newton, R.Y.Tsien, *Science* 296, 913-6(May 3, 2002).

この記事をお読みになり、著者の研究室の訪問見学をご希望の方は、当協会事務局へご連絡ください。事務局で著者と日程を調整して、おしらせいたします。

申し込み期限：本誌発行から2か月後の月末日

申し込み先：生産技術振興協会 tel 06-6395-4895 E-mail seisan@maple.ocn.ne.jp

必 要 事 項：お名前、ご所属、希望日時(選択の幅をもたせてください)、複数人の場合はそれぞれのお名前、ご所属、代表者の連絡先

著者の都合でご希望に沿えない場合もありますので、予めご了承ください。