



技術解説

in vitro と in vivo で異なる レポーター遺伝子アッセイの結果

岡田 欣晃^{*}, 土井 健史^{**}

Importance of in vivo reporter gene assay
for investigating physiological promoter functions

Key Words : transcriptional regulation, reporter gene assay, Hpvt-targeting, epigenetics

1. はじめに

我々の体を作るひとつひとつの細胞の中に存在するゲノム DNA には、2 万個を超える遺伝子が存在し、それらの遺伝子が、適切な時期に、適切な場所で、適切な量だけ発現するよう別々に精密な調節を受けている。この遺伝子の発現は、多くの場合、遺伝子配列の近傍に存在する DNA 配列（プロモーター）によって調節されている。これまで、遺伝子発現調節メカニズムは、プロモーターに遺伝子の発現を調節するタンパク質（転写因子）が結合し、遺伝子発現をオン・オフするようなシンプルなモデルで説明されてきた。しかし、近年の研究の進歩に伴い、ゲノムをコンパクトに折りたたむための糸巻き役を担うヒストンやゲノム DNA の化学的修飾、またそれらが引き金となり構築されるクロマチン構造が遺伝子発現を制御することが明らかとなってきた。このエピジェネティクスの遺伝子発現制御への関与

が明らかになったことから、今後の遺伝子発現制御研究は、転写因子という役者だけでなく、ゲノム構造すなわち、役者が立ち回る舞台装置も考慮にいれ、それを再現できる実験系を用いなければならないことになる。これまでの研究においては、プロモーターの機能評価は、培養細胞に一過的にプロモーターを含むプラスミド DNA を導入する in vitro プロモーター解析法が用いられてきたが、この実験系では生理的条件下におけるクロマチン構造を完全には再現できていない可能性があるため、近年、より生理的条件に近い遺伝子改変動物を用いた in vivo プロモーター解析法を用いることが重要であるとの考えが提唱されつつある。

本稿ではまず、著者らの研究テーマである血管内皮細胞における遺伝子発現制御研究から明らかとなってきた in vivo プロモーター解析実験の重要性について述べ、次に、in vivo 解析に用いることができる遺伝子改変マウスの種類と特徴について概説し、最後に、血管内皮細胞特異的に発現する Robo4 遺伝子をモデルとした in vivo プロモーター解析実験例を紹介する。

2. in vitro と in vivo で解析結果が異なるレポーター遺伝子アッセイ

プロモーターの機能を評価する方法にレポーター遺伝子アッセイがある。この実験法では、プロモーター配列にレポーター遺伝子を連結し、プロモーターの活性をレポーター遺伝子の発現量に置き換えて評価する。レポーター遺伝子は通常、ルシフェラーゼや LacZ 遺伝子が用いられるが、これらの遺伝子の発現量はそれぞれの基質を用いた発光・発色反応を利用して容易に測定することができる。

レポーター遺伝子アッセイを行うためにはまず、各遺伝子のプロモーター配列をクローニングし、こ



*Yoshiaki OKADA

1975年6月生
大阪大学大学院薬学研究科生命情報環境科学専攻博士後期過程修了（2003年）
現在、大阪大学大学院 薬学研究科 生命情報環境科学専攻 蛋白質情報解析学分野 助教 薬学博士 血管と血液における遺伝子発現制御
TEL : 06-6879-8164
FAX : 06-6879-8164
E-mail : okadabos@phs.osaka-u.ac.jp



** Takefumi DOI

1955年8月生
大阪大学大学院薬学研究科薬品化学専攻博士課程修了（1984年）
現在、大阪大学大学院 薬学研究科 生命情報環境科学専攻 蛋白質情報解析学分野 教授 薬学博士 分子生物学
TEL : 06-6879-8158
FAX : 06-6879-8158
E-mail : doi@phs.osaka-u.ac.jp

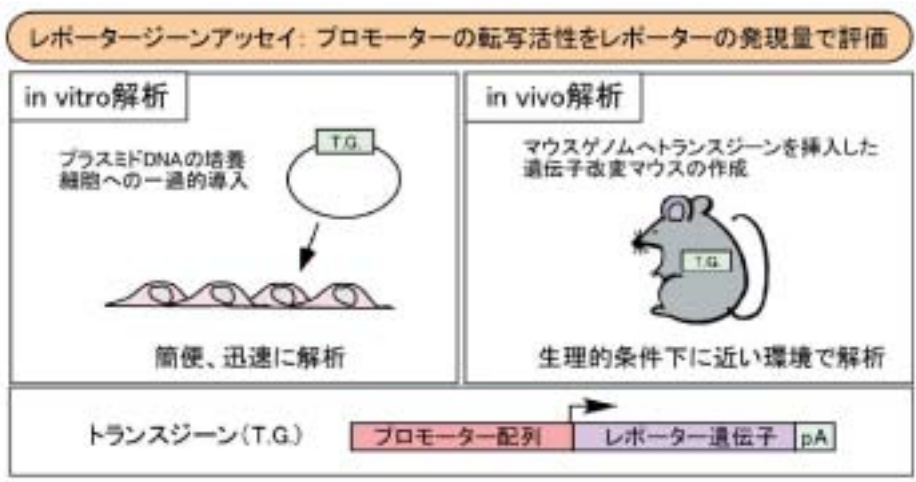


図1 in vitro と in vivo におけるレポーター遺伝子アッセイ

れにレポーター遺伝子を連結したトランスジーンを製作する必要がある(図1)。in vitroで行うレポーター遺伝子アッセイでは、このトランスジーンを持つプラスミドを細胞に一過的に導入しレポーター遺伝子の発現量からプロモーター活性を評価する。これに対し、in vivoで行うレポーター遺伝子アッセイでは、遺伝子組換え法を用いてトランスジーンをゲノムに挿入したマウスを作製し、そのマウスにおけるレポーター遺伝子の発現組織、発現量からプロモーターの機能を評価する。in vitro手法は、操作が簡便であり、迅速に解析できる。in vivo手法は、プロモーター配列がゲノム内に取り込まれているという点で、より生理的条件下に近い状態でプロモーターの機能を評価できるというメリットをそれぞれ持つ。これまでのプロモーターについての研究は、主にin vitro手法のみが用いられてきた。しかし、Longらは、生理的条件下でのプロモーターの機能を正確に評価するにはin vivo手法を用いて検証する必要があると述べている⁽¹⁾。血管内皮細胞におけるプロモーター解析研究においても、両手法を用いた解析結果が報告されているが、しばしば、in vitro解析とin vivo解析では、解析結果が異なることが示されている。例えば、ElvertやKappelらは、in vitroとin vivoの両方の手法を用いて行ったFlk-1遺伝子のプロモーター解析研究の中で、in vitroで活性の強いプロモーターがin vivoでは活性をもたなかったり、in vitroで重要だと示された転写因子結合サイトがin vivoでは重要ではなかったりするなど異なる結果を得ている⁽²⁾⁽³⁾。この結果の相違は、種々の血管内皮細胞特異的遺伝

子のプロモーターを用いた著者らの研究においても確認されたことから、in vitro、in vivoの解析結果の相違は、ある程度の頻度でおこる現象であると考えられる。

近年、Matoukらは、in vivoにおいて血管内皮細胞特異性を持つと証明されたeNOSプロモーター配列が、in vitroでは血管内皮細胞特異性を持たない例を示し、その原因がエピジェネティクスにあるのではないかと考察している⁽⁴⁾。すなわち、生理的条件下においては、ゲノム上に存在するプロモーター配列は、DNAメチル化やヒストン修飾などエピジェネティクスによる制御を受け、正常な活性や組織特異性を持ったプロモーターとして、遺伝子発現を調節している。しかし、in vitro解析においては、細胞に導入されたプロモーター配列はプラスミドの形で存在するため、本来必要なエピジェネティクスによる制御を受けられないと予想される。このため、プロモーター配列はクロマチン構造を正常に形成できず本来の活性や組織特異性を発揮できないと説明している。このMatoukらの仮説は、in vitroとin vivoにおける解析結果の相違をうまく説明できており、in vitro解析で得られた結果は、より生理的条件下に近いin vivo解析を用いて検証することが最良であると考えられる。

3. in vivoプロモーター解析法に用いられる遺伝子改変マウス

先にも述べたが、in vivoにおけるプロモーター解析は、プロモーター配列の下流にレポーター遺伝子を連結したトランスジーンをゲノムに持つマウス



図2 in vivo プロモーター解析に用いられる遺伝子改変マウス

を作製し、そのマウスにおけるレポーター遺伝子の発現組織や発現量を解析することで行う。ここでは、in vivo 解析に用いることができる3種の遺伝子改変マウスを紹介し、その特徴について述べる(図2)。

まず、一般的なトランスジェニックマウスについて紹介する。このマウスは、トランスジーン配列を含むDNA断片をマウス受精卵に導入し、ゲノム上のランダムな位置にトランスジーンを挿入する(ランダムインテグレーション)方法で作製する。特別なベクター作製は必要なく、短期間でマウスを作製することができる。しかし、挿入するトランスジーンの数(コピー数)と挿入位置を制御できないため、作製するごとに異なるゲノム配列を持ったマウスができ、内在性の遺伝子が破壊される可能性もある。そのため、異なるトランスジーンを持つマウスを別々に作製し、マウス間でレポーター遺伝子の発現量を比較するというような実験には向かない。このように、本マウスを用いた解析には、多ラインのマウスを作製し、それらのマウスにおけるレポーター遺伝子の平均的な発現量と発現パターンを解析する必要があるため、解析に時間がかかる。

2種目の遺伝子改変マウスとして、ノックインマウスについて紹介する。ノックインマウスの作製は、マウスES細胞のゲノムに含まれる内在性のプロモーターを本来の場所から移動させず、その下流に存在する遺伝子をコードする配列をレポーター遺伝子と置き換えることにより行う。つまり、この方法では極めて生理的条件下に近い状態でプロモーター解析を行える利点がある。しかし、本マウスの作製は、遺伝子を組換えるためのターゲティングベクターの作製、ES細胞の遺伝子組換え、キメラマウスの作製などを行う必要があり、マウスの完成までに長い

時間を要する。また、本マウスでは、マウスのプロモーターしか解析できないことや、解析したい遺伝子を必ず1個壊してしまうという問題もある。

最後に、生理的条件下に近い状態で解析が行え、比較的作製が簡便なHprtターゲティングマウスについて紹介する。Hprtターゲティングマウスの作製は、まず、1コピーのトランスジーンを相同組換えによりマウスES細胞のHprt遺伝子上流に挿入し、このES細胞を用いてキメラマウスを経てトランスジェニックマウスを作製することで行う⁽⁵⁾。作製法はノックインマウス作製法とほぼ同じであるが、ターゲティングベクターの構築は、相同組換え用親ベクターにトランスジーンを挿入するのみの簡単な方法で行える。さらに、Hprt遺伝子が欠損したES細胞を用いて相同組換えを行い、Hprt遺伝子が補完されたかどうかを指標に薬剤選別することで、短時間、高効率でES細胞の遺伝子組換えを完了することができる。また、トランスジーンのコピー数と挿入位置が同じである利点を生かし、異なるトランスジーンを持つ2種のマウス間でのレポーター遺伝子の発現の比較をすることができる。

以上の3種の遺伝子改変マウスはそれぞれ異なる長所と短所を持っており、研究の目的に合わせて最適なものを選択することができる。著者らはこのうち、Hprtターゲティングマウスとノックインマウスを用いて血管内皮細胞特異的に発現するRobo4遺伝子のプロモーター解析を行ったので、その結果を次章で紹介する。

4. ヒトRobo4遺伝子についてのin vivo プロモーター解析

血管内皮細胞は、血管の管の内側に層を形成して

張り付き、常に血液と接する細胞である。著者らは、この血管内皮細胞に特異的に発現する遺伝子として2002年にクローニングされたRobo4遺伝子に注目した。Robo4遺伝子が血管内皮細胞特異的に発現するという事は、言い換えれば、Robo4遺伝子のプロモーターは、血管内皮細胞でのみ活性を持ち、他の細胞では活性を持たないことを意味する。著者らは、このユニークな性質を持つRobo4プロモーターの解析を行うため、まず、ヒトRobo4遺伝子のプロモーター配列のクローニングを考えた。この段階では、ゲノム上のどの配列がRobo4の発現制御に必要な領域であるか全く手がかりがなかったため、Robo4遺伝子付近のDNA配列を解析し、ラットやマウスなど種間で高く保存されている領域を含み、かつ既に知られている転写因子結合配列を多数含む3kbの配列をクローニングし、Hprtターゲティングマウスを用いてその機能を解析することを考えた。そこで、実際に3kbのプロモーターのクローニングを行い、レポーター遺伝子であるLacZ遺伝子を連結させたトランスジーン1コピーを、マウスES細胞のHprt遺伝子上流に挿入した。得られたES細胞を用いてトランスジェニックマウスを作製し、マウスのLacZ遺伝子の発現を、LacZ染色(LacZの発現部位が青く染色される)を用いて解析したところ、LacZは胎児と成体の全ての臓器において血管内皮細胞に特異的に発現し、各臓器における発現量(臓器分布)は内在性のマウスRobo4の発現パ

ターンとほぼ同じであった(図3)⁽⁶⁾。この結果から、著者らのクローニングした3kbの領域が、血管内皮細胞特異的に発現するヒトRobo4の発現制御に十分な領域を含んでいることがin vivo解析により証明された。

5. Hprtターゲティングマウスを用いた転写因子結合配列の機能解析

前章では、Hprtターゲティングマウスを、ヒトRobo4遺伝子の発現制御領域を同定する目的で用いた。ここではHprtターゲティングマウスがトランスジーン挿入位置とコピー数を完全に制御され作製されていることを利用し、Robo4プロモーター中の転写因子結合配列の機能を解析した例を紹介する。

3kbのRobo4プロモーター中には、種間で完全に保存されたETSサイト(転写因子であるETSファミリータンパク質が結合すると報告されている配列)が存在した。そこで、このETSサイトがin vivoにおいてヒトRobo4プロモーターの活性に重要な機能を持つかどうかを明らかにするために、前述の実験で作製した天然型の3kb Robo4プロモーターを持つマウスに加え、ETSサイトの塩基を置換し変異を加えたプロモーターを用いたHprtターゲティングマウスを作製し、2種類のマウスのLacZの発現を比較した(図4)。その結果、天然型プロモーターを持つマウスに比べ、ETSサイトに変異を持つマウスにおいては、全ての臓器の血管内

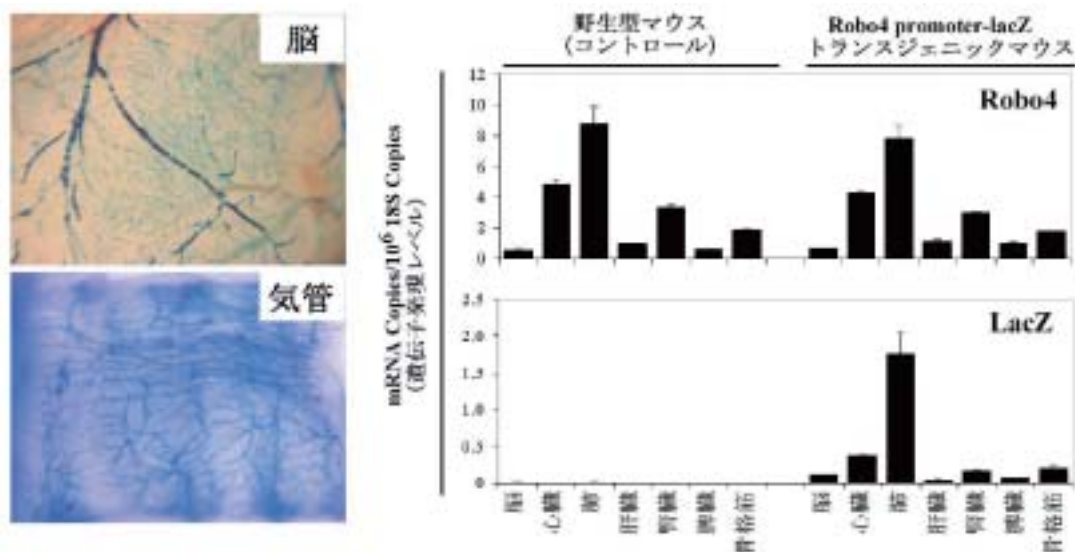


図3 Robo4プロモーターを用いたHprtターゲティングマウスにおけるLacZの発現

皮細胞においてLacZの発現が大きく低下していることが明らかとなった⁽⁷⁾。これら2種のマウスのゲノム配列の違いは、ETSサイトへの変異導入の有無だけであるため、今回のLacZの発現量の減少は、ETSサイトへの変異が原因で起こったものと結論付けられる。本結果より、ETSサイトはin vivoにおいてヒトRobo4プロモーターの活性化を担う配列であることが証明された。

6. ノックインマウスを用いたRobo4プロモーターの解析

Hprt ターゲティングマウスを用いた解析においてその重要性が証明された、ヒトRobo4プロモーター中のETSサイトは、マウスのRobo4プロモーター中においても、その位置と配列がほぼ完全に保存されている。そこで著者らは2種のノックインマウスを作製し、マウス内在性Robo4プロモーターにおいても、ETSサイトが重要であるかを検証しようと考えた。具体的には、Robo4遺伝子をコードする配列をLacZ遺伝子に置き換えたLacZノックインマウスと、このマウスのRobo4プロモーター中のETSサイトに変異を加えた変異ノックインマウスを作製し、2種のマウスにおけるLacZの発現を比較した(図5)。その結果、LacZノックインマ

ウスにおいて全ての臓器でみられた血管内皮細胞特異的なLacZの発現が、変異ノックインマウスにおいては大きく減少していた⁽⁷⁾。この結果から、マウス内在性Robo4プロモーターにおいてもETSサイトはRobo4プロモーターの活性を担う配列であることが証明された。

7. おわりに

以上、本稿では、遺伝子発現制御メカニズムの研究にin vivoプロモーター解析法を用いる重要性について、解析に用いられる遺伝子改変マウスの特徴を解析例を踏まえて紹介してきた。特にHprtターゲティング法は、1コピーのトランスジーンを位置特異的に導入するユニークな相同組換え法であり、この手法で作製したマウスは、転写因子結合配列の重要性評価などプロモーター解析の強力なツールとなることを強調して述べた。

遺伝子発現制御の研究のみならず、生命科学において、「in vitroで明らかになった結果は、より生理的条件下に近いin vivoで検証するべきである」という考え方は、誰もが直感的に認知している。また、この理由について、「in vitroの実験は、生命現象の一部を切り取り試験管内で再構築するシステムであるため、in vivoで起こる現象を完全には再現でき

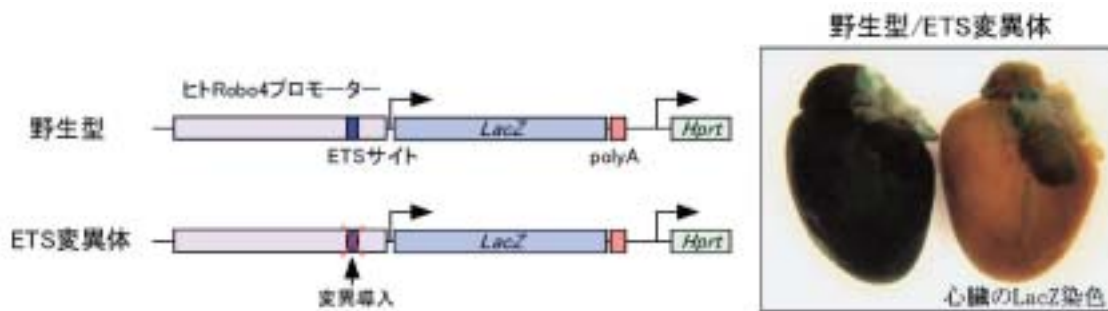


図4 2種のHprtターゲティングマウスを用いた天然型、変異型プロモーターの機能解析

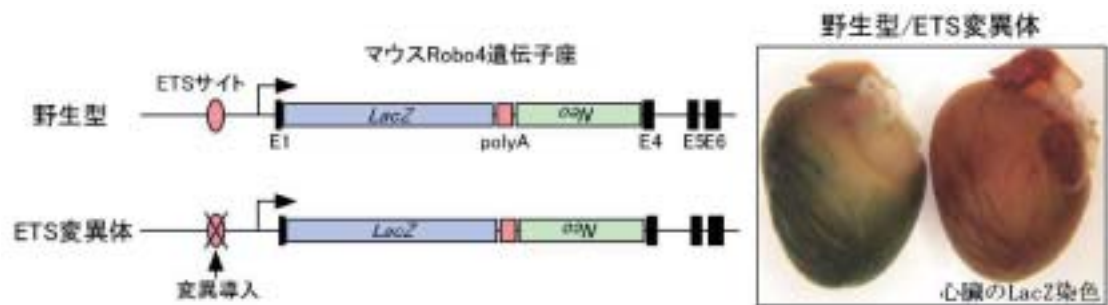


図5 2種のノックインマウスを用いた天然型、変異型プロモーターの機能解析

ない可能性がある」という説明がなされるが、では、「何を再現できていないのか？」という質問に明確に答えることは難しい。Matoukらはこの点について、現状の *in vitro* プロモーター解析においては、エピジェネティクスによる制御を再現できていない可能性を指摘した。本稿では、*in vivo* 解析が生理的条件下に近いことが経験的に明らかになっていることを前提に述べてきたが、現状の *in vivo* 解析システムがエピジェネティクスを完全に再現できているかどうかの証明はなされていない。この点を踏まえ、著者らは、現状の *in vivo* プロモーター解析法がエピジェネティクスをどの程度再現できているのかを詳細に検証し、近年、盛んに遺伝子発現制御研究においてその重要性が叫ばれているエピジェネティクスを解析できる次世代のプロモーター解析法を提案したいと考えている。

引用文献

- 1) Long, X. & Miano, J.M. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 15941-15945.
- 2) Elvert, G., Kappel, A., Heidenreich, R., Englmeier, U., Lanz, S., Acker, T., Rauter, M., Plate, K., Sieweke, M., Breier, G., & Flamme, I. (2003) *J. Biol. Chem.*, 278, 7520-7530.
- 3) Kappel, A., Schlaeger, T.M., Flamme, I., Orkin, S.H., Risau, W., & Breier, G. (2000) *Blood*, 96, 3078-3085.
- 4) Matouk, C.C. & Marsden, P.A. (2008) *Circ. Res.*, 102, 873-887.
- 5) Bronson, S.K., Plaehn, E.G., Kluckman, K.D., Haggaman, J.R., Maeda, N., & Smithies, O. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93, 9067-9072.
- 6) Okada, Y., Yano, K., Jin, E., Funahashi, N., Kitayama, M., Doi, T., Spokes, K., Beeler, D.L., Shih, S.C., Okada, H., Danilov, T.A., Maynard, E., Minami, T., Oettgen, P., & Aird, W.C. (2007) *Circ. Res.*, 100, 1712-1722.
- 7) Okada, Y., Jin, E., Nikolova-Krsteovski, V., Yano, K., Liu, J., Beeler, D., Spokes, K., Kitayama, M., Funahashi, N., Doi, T., Janes, L., Minami, T., Oettgen, P., & Aird, W.C. (2008) *Blood*, 112, 2336-2339.

