◆総説◆

遺伝子ターゲティングの新展開

山 村 研 一*

New Development of Gene Targeting Technique

Ken-ichi YAMAMURA*

Key words: gene targeting, ES cell, homologous recombination, gene trap, mutagenesis

はじめに

近年のヒトゲノムプロジェクトの進展等により構造解析から機能解析の時代に入り、培養細胞ばかりでなく個体レベルの遺伝子機能の解析に移りつつある。この個体レベルの解析において主役を演じているのが、哺乳類においては遺伝子導入マウス（トランスジェニックマウス）であり、遺伝子破壊マウス（ノックアウトマウス）である。ここでは、遺伝子導入マウスと遺伝子破壊マウスを遺伝子改変マウスと総称する。これらの方法論は、組換え DNA 技術そのものに匹敵するぐらい革命的なものであるが、1990 年代に入り、新技術の開発が続々と行なわれ、新しい時代を迎えつつある。ここでは、それらについて概説したい。

1. ジーンターゲティング法の概要

ジーンターゲティング (gene targeting) は標的遺伝子組換えともよぶが、これには既知遺伝子への標的組換えである相同遺伝子組換え法 (homologous recombination)¹⁾ と未知遺伝子に対する標的組換えである遺伝子タギング法

(gene tagging)²⁾ とがある。前者は相同遺伝子組換えを用いて遺伝子の機能を失わせ表現型との関連を解析する方法である。遺伝子を破壊した時にどのような表現型が出現するかの解析が主として行なわれている。この方法を用いると、単なる遺伝子の完全破壊のみならず点突然変異等の小さな変異の導入やプロモーター領域の改変、さらには遺伝子の置換、例えばマウスの遺伝子をヒトの遺伝子で完全に置換してしまうことも可能であり、これらの研究も進展しつつある。一方、遺伝子タギングは遺伝子の単離解析とその破壊を同時に行うことを意図したもので、未知の遺伝子の解析に応用することができる。

2. 相同遺伝子組換え法の新展開

(1) 条件的遺伝子破壊

1) Cre-loxP 組換えシステムの概要

完全破壊を行なった時に、胚性致死となる場合がある。このときは、成人における遺伝子機能は解析できないことになる。そこで、望むときに、望む組織で遺伝子を発現または破壊する方法の開発が望まれた。ここで注目されたのが、

* 熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設 [〒 862-0976 熊本市九品寺 4-24-1]
 Institute of Molecular Embryology and Genetics Kumamoto University School of Medicine [4-24-1 Kuhonji, Kumamoto, 862-0976, Japan.]

図1 loxP 配列と Cre の反応

Cre は、loxP 配列のスペーサー部分を切断し、挿入または切り出しを行なう。右の図は、反応を分かりやすくするため、loxP 配列の色を違えてある。

バクテリオファージ P1 の Cre-loxP システムと酵母のプラスミド由来の FLP-FRT 配列である。Cre リコンビナーゼは 34 bp の loxP という配列を認識して (図1)³⁾、FLP リコンビナーゼは FRT とよばれる 48 bp の配列を認識して組換えを起こす。基本的には、挿入と削除の両方の反応を行なう。哺乳類細胞でも働くことが示され、がぜん注目されたり⁴⁾。しかし、哺乳類細胞では核の体積が大きいので、いったん切り出された断片が Cre とゲノム上の 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ほとんど観察されない。筆者らは、loxP に変異を導入し、挿入されれば切り出せないようにすることにより、挿入することに成功しているが、これについては後述する。初期は Cre-loxP システムが先に開発されたが、現在は、両方のシステムとも哺乳類細胞で同等に働くようである。

2) Cre-loxP を利用した遺伝子発現および遺伝子破壊の方法

a. Cre トランスジェニックマウスの作製

適当なプロモーターを接続した Cre 遺伝子をマウス受精卵に導入して作製する。これまでに多くの Cre トランスジェニックマウスが作製されているが、カナダのトロントマウントサイナイ病院研究所の Nagi 博士らが集計しているので、彼に手紙を出せばリストを送ってくれる。筆者が入手しているリストにはすでに 66 系統のトランスジェニックマウスの発現パターン

が概略まとめられている。

b. loxP の挿入

遺伝子を発現させたい場合はプロモーター、loxP、レポーター遺伝子 (lacZ 等)、loxP、発現させたい遺伝子の順に接続した遺伝子を構築する。これを導入したトランスジェニックマウスを作製する。レポーター遺伝子の発現を指標に実験に適した系統を選別できる。遺伝子を破壊させたい場合は、あらかじめ loxP を挿入した相同遺伝子組換え用のベクターを作製しておく必要がある。通常破壊したいエクソン部分の両端に loxP を挿入する。また、最近ネオ耐性遺伝子のプロモーターが悪い影響を及ぼすことが報告されているので、このネオ耐性遺伝子を除去する目的にも Cre-loxP が用いられることも多い。

c. Cre トランスジェニックマウスと loxP 挿入マウスとの交配

Cre トランスジェニックマウスと loxP 挿入マウスとを交配し、ダブルトランスジェニックマウスを作製すれば、Cre が発現する組織で遺伝子を発現または破壊することができる。最近では、アデノウイルスベクターに Cre を組み込ませたものも利用できる。この場合は、ウイルス感染をさせた場合に、感染した細胞でのみ組換えを起こせる利点がある。

(2) Cre-loxP システムの欠点

Cre-loxP システムは非常に有用ではあるが、次のような欠点がある。まず、すべての細胞で

図2 変異型 loxP による DNA 断片の挿入

左側は正常、右側は変異型の lox を用いたときの組換えの反応、左側では切り出された loxP を含む環状 DNA 物理的に離れるので、挿入よりも削除に反応は傾く。一方、染色体側に lox 71 および環状 DNA 側に lox 66 を用いると、組み込まれたときに生じる lox 71/66 を Cre リコンビナーゼは認識できにくくなり、削除反応より挿入反応に傾く。

Cre を発現できないか、もしくは発現レベルが十分でないため 100% の細胞で破壊できないことである。第 2 は、同じ系統由来であっても、Cre 発現レベルに個体差があることである。第 3 は、アデノウイルスベクターを用いたときは、強い免疫原性があり、感染細胞が排除されることである。これらの欠点を知りつつ有効利用が望まれる。

3. Cre-loxP による遺伝子挿入

筆者らは、loxP 配列に変異を挿入し、いったん挿入されれば Cre による削除ができなくなる方法を考案し、Cre-loxP システムによる遺伝子挿入を可能にした⁹⁾。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 lox 71 と、右端に変異を導入した lox 66 を準備する。lox 71 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 lox 66 を組み込んでおく。Cre と lox 66 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 lox 71 と右端に変異を有する lox 66 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 lox 71/66 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 lox 71/66 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 (図 2)。

4. 誘導的遺伝子発現システム

既存のプロモーターの解析が進み、組織特異的・時期特異的な発現ができるようになっていく。しかし、必ずしも研究者の意のままに遺伝子発現を誘導できるわけではない。この意味から、望むときに遺伝子を発現させたり、止めたりできるシステムの開発が進められている。残念ながら完全なものはまだできていないが、それらの試みを紹介しておきたい。現在のところ原理的に 3 つの方法がある。

(1) 誘導プロモーター (図 3)

古くは、亜鉛などで誘導されるメタロチオネイン遺伝子プロモーター、熱ショックタンパク遺伝子プロモーター、グルココルチコイドにより誘導される遺伝子プロモーター等が検討されたが、いずれも発現が漏れること、誘導因子の副作用があることから余り有効ではなかった。現在は、インターフェロンにより誘導される Mx 1 遺伝子プロモーターが、合成した 2 本鎖 RNA により誘導されることから期待されている⁹⁾。結合ドメインに変異を導入することにより、正常なステロイドホルモンとは結合しないが、合成ホルモンに対して結合するものも得ら

れている。

(2) リガンド結合により活性化されるシステム (図4)

エストロゲンリセプターに変異を導入し、エストロゲンとは結合できないが tamixifen と

図3 リガンド結合により活性化されるシステム
リガンドの結合により細胞質から核へ移行するものを利用するシステムで、リガンド投与により遺伝子発現を誘導できる。

いう薬剤に結合するように改変しておく。tamixifen を投与したときに、エストロゲンリセプターと結合し、その結果細胞質から核内に移行し、遺伝子発現を誘導するシステムである。これと Cre-loxP を組み合わせることにより、遺伝子発現を誘導する方法も開発されている。あらかじめホルモンリセプター (リガンド) 結合ドメイン (LBD) と Cre との融合蛋白を発現させておく。この状態では、Cre は細胞質にとどまるので、組換え反応を起こせない (図4-1)。ホルモン (リガンド) を投与すると細胞質に入り、結合ドメインと結合する (図4-2)。その結果、細胞質へ移行し Cre が働ける状態となる (図4-3)。Cre により組換えが生じ遺伝子がプロモーター直下に位置することになり、遺伝子が発現する (図4-4)⁷⁾。

(3) 大腸菌の誘導システムを利用したシステム (図5, 6)

ラクトースオペロンが最初試みられたが、反応が遅く、効率が悪いことから余り用いられなくなった。現在ではテトラサイクリンオペロン

図4 Cre-loxP システムとリガンド結合とを併用した遺伝子発現調節法

- 1) ホルモンリセプター (リガンド) 結合ドメイン (LBD) と Cre との融合蛋白をあらかじめ発現させておく。この状態では、Cre は細胞質にとどまるので、組換え反応を起こせない。
- 2) ホルモン (リガンド) を投与すると細胞質に入り、結合ドメインと結合する。
- 3) その結果、細胞質へ移行し Cre が働ける状態となる。
- 4) Cre により組換えが生じ遺伝子がプロモーター直下に位置することになり、遺伝子が発現する。

図 5 テトラサイクリンオペロンの利用による遺伝子発現誘導システム

- 1) 大腸菌内では、リプレッサー (tet R) がオペレーター (tet O) に結合しており、遺伝子発現はしない。そこに、テトラサイクリン (tet) を投与すると、リプレッサーと結合し、オペレーターは開放され、遺伝子発現が誘導される。
- 2) 真核細胞では、トランスアクチベーター (tet TA でこれは HSV VP 16) により活性化されるミニマルプロモーター (CMV minimal promoter) の系を、テトラプレッサーとトランスアクチベーターはそれぞれオペレーターとミニマルプロモーターに結合し、遺伝子発現は ON になる。ここに、テトラサイクリンを投与すると、tet R-tet TA 複合体と結合し、ミニマルプロモーターは不活性状態となり遺伝子発現は OFF となる。

図 6 逆リプレッサーを利用した遺伝子発現誘導システム

- 1) 逆リプレッサー (rtet R) はそのままではオペレーター (tet O) に結合できないので、この状態では遺伝子は ON である。テトラサイクリン (tet) を投与すると、tet は rtet R と結合し、tet O に結合し、遺伝子発現は OFF になる。
- 2) 真核細胞では、この逆で、tet 存在時に、rtet R は tet O に結合できるようになり、tet TA によりミニマルプロモーターが活性化され、遺伝子は ON になる。

がもっぱら利用されている。このオペロンは、通常はリプレッサーがオペレーターに結合しており遺伝子は発現しない。そこへ、テトラサイクリンが入ってくると、テトラサイクリンがリプレッサーと結合し、オペレーターが開放されて遺伝子発現が始まるシステムである (図5-1)。これをもとにして、真核細胞で利用するために、次のような系が開発された⁸⁾。まず、オペロンとサイトメガロウイルスのミニマルプロモーターを認識して結合するリプレッサー—トランスアクチベーター (単純ヘルペスウイルスの VP 16) の融合産物が開発された。この状態で、リプレッサーとオペロンは結合するが、トランスアクチベーターとプロモーターも結合するので、遺伝子は活性化され発現する (図5-2)。ここに、テトラサイクリンを投与すると、テトラサイクリンがリプレッサー—トランスアクチベーターに結合し、オペレーター—ミニマルプロモーターから引き離す。その結果、遺伝子発現が停止するという系である。この系は、テトラサイクリン投与で、遺伝子発現が OFF になる。ON にするときは、テトラサイクリンの投与を中止するのであるが、中止しても体内にあるテトラサイクリンが直ちに消失するわけではない。したがって、どうしてもタイムラグが生じることになり、速やかに遺伝子発現を誘導できない欠点がある。この欠点を補うために逆リプレッサーが開発された⁹⁾。これは、テトラサイクリンと結合したときにオペレーターと結合するようになったものである。つまりテトラサイクリン投与で遺伝子発現を OFF から ON にできるシステムである (図6-1)。これをそのまま、トランスアクチベーターとミニマルプロモーターの系に利用した (図6-2)。逆リプレッサー—トランスアクチベーターはこのままでは、オペレーター—ミニマルプロモーターに結合できない。ここにテトラサイクリンを投与すると、テトラサイクリンと逆リプレッサー—トランスアクチベーターが結合し、これがさらにオペレーター—ミニマルプロモーターに結合し、遺伝子発

現を誘導する。

5. 遺伝子タギング法を用いた解析

遺伝子タギングはマウス内在性遺伝子座位へのトランスジーンのランダムな組み込みと定義される。従って、通常のトランスジェニックマウスの作製過程においても起こりえ、この結果、いわゆる挿入突然変異 (insertional mutation) を引き起こす。しかし、この方法では偶然を利用するに過ぎず、マイクロインジェクション法の場合で7%、レトロウイルス法で3%前後にしか生じず頻度は低い。これに対し、1987年にショウジョウバエの系でエンハンサートラップ法が開発された¹⁰⁾。この方法では、ある組織特異性を示すエンハンサーの下流に組み込まれた時に、レポーター遺伝子 (例えば lacZ) が発現することを期待するもので、従って弱いプロモーターを接続している。しかし、哺乳類細胞では、エンハンサーがしばしば遺伝子のコード領域より遠くに離れて存在すること (時に 10 kb も離れている)、トランスジーンの組み込まれる位置により発現レベルが影響をうけること等の理由によりあまり用いられていない。その改良法として遺伝子トラップ法 (gene trap) が開発された。この方法では、マウス内在性遺伝子の下流に組み込まれた時にのみレポーター遺伝子である lacZ が発現できるように、プロモーターのかわりにスプライスアクセプターの配列のみをつけてある。この方法により未知遺伝子への効率良い標的組換えが可能となった。

(1) 遺伝子トラップ法 (図7)

最初の報告は1988年に Allen ら¹¹⁾によってなされたが、ヘルペスウイルスの弱いプロモーターを接続した lacZ 遺伝子をマウス受精卵に注入し、その発現パターンが一つ一つ違うこと、したがって近傍のエンハンサー等によって影響を受けた発現の行なわれることを示した。Kothary ら¹²⁾も同様の実験を熱ショック蛋白遺伝子である hsp 68 のプロモーターを接続し

図7 遺伝子トラップ法の概要

遺伝子トラップベクターは薬剤耐性マーカーとレポーター遺伝子の両方の機能を持つ β -geo を含むが、プロモーターのかわりにプライスアクセプターの配列のみが上流にある。従って、マウス内在性遺伝子の下流に組み込まれたときのみ β -geo は発現する。逆にいえば β -geo が発現すればその上流には遺伝子があることを意味している。トラップベクター内に loxP を組み込んでおくと、余分な配列は Cre を発現させることで除去できる。

た lacZ を用いて行ない、偶然以前に自然突然変異によりえられた筋ジストロフィー (dystonia musculorum: dt) の遺伝子座に組み込まれその変異マウスと同じ表現型を呈することを報告した。これらはエンハンサートラップであるが、トランスジェニックマウスでも有効であることが示された。しかし、トランスジェニックマウスの系では効率が悪いことから 1989 年に Gossler ら¹³⁾ は ES 細胞の系の利用を考えた。彼らはエンハンサートラップによる単なる lacZ の発現ではトラップした遺伝子の機能の推定しかできないと考え、遺伝子を破壊した際の表現系の解析と破壊した遺伝子の単離・解析から機能を同定することを目的として遺伝子トラップ法を開発した。筆者らは、既に述べたように変異型 loxP を用いることにより、遺伝子挿入ができることを明らかにしたが、この変異型 loxP

を遺伝子トラップベクターに組み込み、トラップ後にいかなる遺伝子をも挿入できる可変型遺伝子トラップ法を開発した。この方法は、以下に述べるように、ランダムミュータジェネシスを行なう方法として現在注目されている。

6. 大規模ランダムミュータジェネシス

マウスにおける大規模突然変異体作製は、他の動物に比し比較にならないぐらいの経費と労力を要し、その必要性についてはこれまで懐疑的でした。しかし、ゲノムプロジェクトの進展で、遺伝子の構造解析に目処がたった現在、機能解析をどう行なうかについての戦略構想が練り直され、マウスにおける大規模突然変異体作製をランダムな方法によりどうしてもやらねばならぬことであると認識されるに至った。その理由の一つは、大規模な遺伝子破壊マウスの作製を ES 細胞を利用した相同遺伝子組換えで行なおうとすると、余りに時間、経費、労力がかさむからである。現在、1つの遺伝子の破壊マウスを作製するのに、人件費と減価償却費を除いても、約 200 万円がかかるが、10 万個と考えられる遺伝子すべてについて破壊すると合計 2,000 億円必要で、これは文部省科学研究費補助金の約 2 年分である。また、遺伝子破壊マウス作製の律速段階は相同組換えを行なった ES 細胞クローンの単離であるが、組換え用のベクターの作製も含めて考えると 1 遺伝子につき約 3 カ月が最低必要で、したがって年間 4 クローンとるのが精いっぱいである。つまり、10 万個の遺伝子破壊マウス作製には、25,000 年×人かかることになる。1,000 人が従事したとしても、25 年かかることになる。これでは、構造解析のスピードに比し、余りに遅く現実的ではないとすることでランダム突然変異が見直されるに至った。3 つ方法、すなわち遺伝子トラップ法、エチルニトロソウレア (ethylnitrosourea: ENU) 法、クロラムブシル (chlorambusil) 法等が考えられているが、遺伝子トラップ法については既

図8 ENU変異体作製

ENUを雄マウスに投与すると、精子にランダムに突然変異が入る。その雄と雌を交配しF1マウスを得る。F1は原則ヘテロであるので、交配により系統として樹立する。

に述べたので、ここではENU法とクロラムブシル法について述べる。

(1) ENU法 (図8)

ENUは変異源物質で、点突然変異を誘発する。この投与により、高率に変異マウスを作製できることが、Russelらにより明らかにされた¹⁴⁾。8~10週令のC3H系統マウス雄にENU (100 mg/Kg 体重) を1週間隔で3度腹腔内投与する。7週間経過後、処理マウスを同系のC3H系統雌に交配してF1マウスを作製する。このF1マウスのゲノム上には、50~100遺伝子座で突然変異が生じていると推定されるが、1遺伝子座に注目すれば1/1,000の確率で、その変異マウスを得ることができる計算である。したがって、もし年間1,000頭のF1マウスを作製すれば、マウスゲノム上の全遺伝子を平均して一度スクリーニングすることに匹敵することになる。このように極めて簡単に、特殊な技術が必要とせず変異マウスを多数得ることができるが、欠点としては変異した遺伝子のマッピングには、マウス亜種間交配とPooled PCR法を行わねばならず、またその遺伝子の単離は、ポジショナルクローニングに頼らざるを得ない。

(2) クロラムブシル法 (図8参照)

クロラムブシル投与により、染色体の部分欠失マウスを作製できる¹⁵⁾。方法は、原則ENU法と同じである。すなわち、雄マウスにクロラムブシルを1回腹腔内に投与するだけで、精子において染色体の欠失等を惹起できる。精子ごとに欠失の部位は異なるが、肉眼的に観察できる劣性の表現型が出現する確率は約25%ときわめて高率で、特定の遺伝子座位においてもおよそ1,000分の1と見積もられている。1,000匹子供をとれば1匹は特定の遺伝子座での欠失をもつマウスが得られる計算であり、非常に効率の良い方法である。欠失する大きさは、3 Mb から15 Mb と見積もられている。多型DNAマーカーが充実してきたので、100 kb程度の精度で染色体のどの部分に欠失があるのかが簡単に同定できるようになった。

(3) 遺伝子トラップ法

方法については記述したので、特徴のみを述べておきたい。この方法は、組換えDNA技術や発生工学技術を必要とし、変異マウス作製には多くの労力が必要である。しかし、トラップした遺伝子の単離や、発現パターンの解析は容易であるとの利点がある。つまり、ENU法やクロラムブシル法とは、相互に補完的な方法であり、併用して変異マウス作製を行なう必要があらう。

おわりに

突然変異マウス作製は、個々の研究者の興味により作製するという戦術的な意味から、大規模に先手を打って変異マウスを作製しようという戦略的なものに移った。その理由は、変異マウスを用いて薬剤開発を行うことの付加価値が高いからであり、莫大な利益を生む可能性があるからである。欧米では、すでに大規模変異マウス作製プロジェクトが進行しつつあり、わが国でも早急に始めねば、今後の生命科学領域の基礎研究に後れを取るばかりでなく、応用面で

も後手に回することは必至であろう。

文 献

- 1) Capecchi MR: The new mouse Genetics: Altering the genome by gene targeting. Trends in Genetics **5**: 70-76, 1989.
- 2) Rossant J and Joyner AL: Towards a molecular-genetic analysis of mammalian development. Trends Genet. **5**: 277-283, 1989.
- 3) Sternberg N and Hamilton D: Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. recombination between loxP sites. J. Mol. Biol. **150**: 467-486, 1981.
- 4) auer B Henderson N: Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **85**: 5166-5170, 1988.
- 5) Araki K, Araki M, Yamamura K: Targeted integration of DNA using mutant lox sites in embryonic stem cells. Nucleic Acids Res. **25**: 868-872, 1997.
- 6) Kuhn R, Schwenk F, Aguet M, Rajewsky, K: Inducible gene targeting in mice. Science **269**: 1427-1429, 1995.
- 7) Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, Metzger D, Chambon P: Ligand-activated site-specific recombination in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **93**: 10887-10890, 1996.
- 8) Gossen M, Bujard H: Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **89**: 5547-5551, 1992.
- 9) Gossen M, Freundlieb S, Bender G, Muller G, Hillen W, Bujard H: Tetracycline-controlled transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. Science **268**: 1766-1769, 1995.
- 10) O'Kane C J, Gehring WJ: Detection *in situ* of genomic regulatory elements in *Drosophila*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **84**: 9123-9127, 1987.
- 11) Allen ND, Cran DG, Barton SC, Hettle S, Reik W, Surani MA: Transgenes as probes for active chromosomal domains in mouse development. Nature **333**: 852-855, 1988.
- 12) Kothary R, Clapoff S, Brown A, Campbell R, Peterson, A, Rossant J: A transgene containing *lacZ* inserted into the *dystonia* locus is expressed in neural tube. Nature **335**: 435-437, 1988.
- 13) Gossler A, Joyner A, Rossant J, Skarnes WC: Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. Science **244**: 463-465, 1989.
- 14) Russel WL, Kelly EM, Hunsicker PR, Bangham JW, Maddux SC, Phipps EL: Specific-locus test show ethylnitrosourea to be the most potent mutagen in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**: 5818-5819, 1979.
- 15) Russel, LB, Hunsicker PR, Cacheiro NLA, Bangham JW, Russel WL, Shelby, MD: Chlorambusil effectively induces deletions in mouse germ cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **86**: 3704-3708, 1989.