トランスジェニックマウスに組み込まれた DNA (トランスジーン) の構造解析

二宮 隆*

トランスジェニックマウスは今や一つの実験素材として、様々な研究分野で利用されている。また、ウシ、ブタ、ヒツジなどの大型トランスジェニック動物も作り出されつつある。一方、核内に注入された外来 DNA がどのようにして宿主染色体に組み込まれるのかについてはまだまだ不明な点が多い。しかし、トランスジェニック動物に組み込まれた DNA の構造を解析する方法も、近年の PCR の出現で大幅に省力化されてきており、組み込みメカニズムが解明されるのもそう遠いことではないであろう。

細胞培養技術の進歩に伴い、単離してきた遺伝子やその組換え体を培養細胞に導入することで、細胞分化に対応した遺伝子発現の調節機構や遺伝子産物の細胞に与える影響を厳密に調べることが可能になった。しかし、培養細胞ではその遺伝子が正常な個体発生の過程でどのように機能するのかを調べることはできない。そこで、潜在的にすべての細胞に分化する能力をもっている生殖細胞に外来遺伝子を導入し、個体にまで発生させる技術の開発が期待されていた。

1980 年、Gordon ら⁽¹⁾はマウス受精卵の雄性前核に SV 40 および HSV の遺伝子をガラスピペットで直接注入し、短期間培養した後、卵を再び雌マウスの子宮に戻して発生させるという方法で、個体のすべての細胞に外来遺伝子を有するマウス、すなわちトランスジェニックマウス (Tg マウス) を初めて作り出すことに成功した。このマイクロインジェクション法は簡便で成功率も高いことから、今日に至るまでこの方法を用いて多種多様の Tg マウスが作り出されている⁽²⁾。

通常、マウス受精卵の核内に注入された DNA は染色体に組み込まれ、マウス本来の遺伝子と同様に染色体の分裂に伴って増殖し、やがてその個体すべての細胞に分布する。そして、生殖細胞を通して子孫へと伝達され、外来遺伝子を安定に組み込んだ Tg マウスは系統として維持される。し

かし、注入された DNA がマウス染色体に組み込まれるメカニズムについてはほとんど解明されていない。その解明のためには、まずトランスジーン⁽³⁾の構造、すなわち注入された DNA がどのような形で染色体に組み込まれているのかについての基礎的知見の蓄積が必要である。そこで、本稿ではトランスジーン⁽³⁾の構造を解析する方法について筆者らの例を用いて解説し、現在までの知見に基づいた組み込みメカニズムのモデルおよび今後の展望について述べてみたい。

サザン法による解析

トランスジーン⁽³⁾の解析方法として最も一般的なのが、注入した DNA をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションであり、Tg マウスの選別にも用いられている。筆者らのグループでは、ヒトアデノウイルス 12 型 (Ad 12) の E1A 遺伝子を含む 3 種の DNA (図 1) をマウス受精卵に注入し、計 14 系統の Tg マウスを得た⁽³⁾。E1A 遺伝子のみを注入して得られたマウスを gE1A、EcoRI で直鎖状にしたプラスミド pSV 2-gpt-gE1A を注入して得られたマウスを pE1A、このプラスミド 2 分子をファージベクターに連結した Charon 10-gE1A-2 を注入して得られたマウスを λ E1A とし、それぞれのマウスの尻尾から抽出した DNA を図 1 に示した A~E の断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションで解析した。その結果、このうちの 4 系統には注入した DNA が 1 分子だけ組み込まれていた。残りの

Structural Analysis of Transgenes: DNAs Integrated in Transgenic Mice

* Takashi NINOMIYA, 雪印乳業(株)生物科学研究所

図 1 ■ 注入に用いた DNA の構造

B : Bam HI, E : Eco RI

図 2 ■ サザン法によるトランスジーン構造解析⁽³⁾

Tg マウス pE1A/1 および pE1A/3a のゲノム DNA を電気泳動で分画後ナイロン膜に固定し、³²P で標識したプローブ C または D でハイブリダイゼーションを行なった。

10 系統には複数コピーが導入されていた。

そこでまず、これら 10 系統では注入した DNA どうしがどのような形で導入されているのかを調べた。その解析の一例を図 2 に示した pSV2-gpt-gE1A には BamHI サイトが 1 箇所あるので、2 分子が head-to-tail (H-T) に連結している場合、BamHI 消化によりその連結部からはプローブ C と D の両方にハイブリダイズする 6.2 kb の断片が得られる。逆向きに連結していれば、head-to-head (H-H) の連結部分からはプローブ D とのみハイブリダイズする 3.2 kb の断片が、また tail-to-tail (T-T) の連結部分からは

プローブ C とのみハイブリダイズする 9.2 kb の断片が得られる。pE1A/3a では、H-T の連結を示すプローブ C、D の両方とハイブリダイズする 6.2 kb のメインバンドの他に、プローブ D とのみハイブリダイズする 3.2 kb のバンドおよびプローブ C とのみハイブリダイズする 9.2 kb のバンドも認められた。一方、pE1A/1 では H-T の 6.2 kb のバンドは認められたが、H-H、T-T のバンドは検出されなかった。したがって pE1A/1 では注入した DNA が H-T につながった形で導入されており、pE1A/3a は H-T の主要構造の他に逆向きに連結した構造をも含んでいるこ

とが明らかになった。

このように、注入した DNA は順向きまたは逆向きに連結して導入されていたが、次にこの連結部の構造を調べた。pSV2-gpt-gE1A は *Eco* RI で直鎖状にして注入したが、pE1A/1, pE1A/3a の *Eco* RI 消化物には、プローブ C と D の両方にハイブリダイズする 6.2kb のバンドが認められた (図 2)。これは、注入した DNA は両端の *Eco* RI サイトが保持されたまま連結しており、タンデム構造が形成される際に各分子の両端からは 1 塩基も欠落していないことを示すものである。

サザン法で得られた結果を総合することにより、図 3 に示した 9 系統についてトランスジーンの構造が明らかになり、トランスジーンのマウス染色体 DNA と連結している部分では欠失が生じていることが判明した。モデル構築に至らなかったその他の系統においても、連結部での欠失や再編成を示唆する結果が得られた⁽³⁾。

また、pE1A/3a および pE1A/3b には前述のように注入した pSV2-gpt-gE1A が一部逆向きに連結した形で組み込まれていたが、これら 2 系統の子孫のトランスジーンをサザン法で調べたところ、H-T の連結部由来の断片はすべての Tg マウスで認められたが、H-H および T-T の連結部由来の断片については、両方を有するものと、両方とも欠いたものとが得られた。両系統とも、マウス染色体との連結部由来の断片には変動が認められなかったことから、H-H, T-T 断片を欠いたマウスではトランスジーンから逆向き構造が欠落してしまっていると考えられ、逆向き構造が

図 3 ■ トランスジーンの構造モデル

親から子へ伝わる際に不安定であることが判明した⁽⁴⁾。

以上、サザン法で得られた結果をまとめると以下の通りであった。

① 注入した DNA が複数コピー導入されていた 10 系統のうち 9 系統では、それらが head-to-tail にタンデムに連結した形が主要構造となっていた。

② pSV2-gpt-gE1A を注入して得られた 6 系統のうち 4 系統では、注入した DNA が一部逆

向きに連結した構造をとっており、この逆向き構造は子孫への伝達の際に不安定であった。

③ pSV 2-gpt-gE1A が複数コピー導入されている系統では、タンデム構造の連結部で注入 DNA の両端の *Eco*RI 切断端のほとんどが再構築されていた。

④ トランスジーンのマウス染色体と連結している部分では欠失や再編成が生じていた。

注入した DNA の挙動

Tg マウスを得る際に前核に注入される DNA は、直鎖状のほうが環状のものより組み込まれる頻度が高いことが知られている⁽⁵⁾。それらは同一の切断端をもっている、異なる切断端をもっている、トランスジーン中ではしばしば head-to-tail でタンデムに連結していることが示されている⁽²⁾。培養細胞に

においても、CaPO₄ 沈殿法⁽⁶⁾やマイクロインジェクション法⁽⁷⁾で導入した外来 DNA は head-to-tail のタンデム構造をとっているという報告がある。一方、Lo⁽⁸⁾ は、DNA 溶液を含んだ針を核に突き刺した後、圧力ではなく電流を用いて DNA を核内に注入するという iontophoretic 法を用いて培養細胞やマウス受精卵に外来 DNA を導入した。その結果、注入した DNA が複数コピー導入されている場合でもタンデム構造は認められず、1 分子の組込みが複数個所で生じていることを示した。この方法では、通常のマイクロインジェクション法と異なり、注入した DNA は電流によりすばやく核内に拡散してしまう。したがって、タンデム構造の形成には DNA 分子が局所的に高濃度で存在している必要があると考えられる。

Head-to-tail のタンデム構造が形成されるメカニズムについては解明されていないが、染色体

図 4 ■ 注入した DNA どうしの組換え⁽⁹⁾

a : 注入した DNA の存在形態, b : 注入した直鎖状分子どうしの組換え, c : 注入した直鎖状分子と環状分子との組換え, d : 環状分子がランダムに切断された直鎖状分子どうし (1) または環状分子 (2), 注入した直鎖状分子 (3) との組換え。それぞれ直線は DNA 2 本鎖を示している。

に組み込まれる前または後の相同的組換えが関与していると考えられている。Bishop と Smith⁽⁹⁾ は培養細胞に導入された外来 DNA の構造に関する多くの実験結果をもとに、外来 DNA が染色体に組み込まれるメカニズムについて考察しているが、その中で彼らはタンデム構造の形成について以下のように説明している (図 4)。直鎖状の DNA を注入した場合、注入 DNA の存在形態としては、a-1) 注入したままの直鎖の状態、a-2) 末端部分のリゲーションで環状化した状態、a-3) 環状化した分子がヌクレアーゼによりランダムに切断されて遺伝子の順列が変わった直鎖の状態、が考えられる。注入した DNA どうしがそのままの形で相同的組換えをするだけでは、まったく同一の分子が再生されるだけでタンデム構造は形成されない (b)。しかし、一方または両方の分子が環状化していればタンデム構造の形成は可能とな

る(c). さらに、環状化した分子が切断されて遺伝子の順列が変わった直鎖状 DNA (a-3) が相同的組換えに参画してもタンデム構造は形成される(d). 実際に受精卵の核内でどのような現象が起きているかはまだ想像の域を出ないが、恐らく上記の3形態の DNA が互いに相同的組換えを繰り返すことで head-to-tail に連結するのであろう. タンデム構造内の連結部で、注入した DNA の両端の構造がほとんどの場合保持されていることは、注入した鎖状分子がいったん環状化するということを強く支持している.

外来 DNA が組み込まれる染色体上の位置はランダムである⁽²⁾. 染色体上では自然発生的に切断が起こってはそれを自己修復するという現象が頻繁に生じている⁽¹⁰⁾が、そういった切断部分に染色体外で形成された重合体が末端部どうしのリゲーションまたは非相同的組換え反応により組み込まれるのであろう. そして染色体上で生じる切断の数が限られているため、外来 DNA の組込みは通常1~2個所でしか起こらないと考えられる. また、染色体 DNA の複製中に外来 DNA が組み込まれたことを示唆する例も報告されており⁽¹¹⁾, 外来 DNA が組み込まれやすい染色体上の位置や状態も実際にはあるのかもしれない. いずれにしても、解析例がまだまだ少なく一般化するには至っていないのが現状である.

一方、head-to-head や tail-to-tail 構造の形成については相同的組換えではなく、組込み前のリゲーションによるものと考えられる. 今回解析したマウスのうち pE1A/2 は2分子が逆向きに連結しているだけのものであったが、他の3例、pE1A/3a, pE1A/3b および pE1A/4 では、長いタンデム構造の中に逆向き構造が存在していた. このような構造は、逆向きに連結した分子が相同的組換えでタンデム構造に取り込まれた結果生じたものと考えられる. また、逆向き構造は pSV 2-gpt-gE1A を導入して得られた6系統のうち4系統という高い頻度で認められたが、他の2種の DNA (Charon 10-gE1A-2 および Ad 12 E1A) を導入して得られた8系統では認められなかった. したがって、逆向き構造の形成は注

入に用いる DNA の性質に依存しており、pSV 2-gpt-gE1A が逆向き構造を形成しやすい DNA であるという可能性も考えられる. もし、同一端をもつ直鎖状 DNA が注入され染色体に組み込まれる際、分子間でランダムな end-to-end のリゲーションが生じているなら、head-to-head や tail-to-tail の連結も、head-to-tail の連結と同程度の頻度で生じるはずである. しかし実際には、ほとんどのトランスジーンでは head-to-tail にタンデムに連なった主要構造をとっている. そのため、分子間リゲーションは稀にしか起こらないとされている. しかし、筆者らが示した逆向きの不安定は以下のような可能性も示唆している. すなわち、end-to-end のリゲーションも頻繁に起こってはいるが、生じた逆向き構造は染色体に組み込まれたとしても不安定で、マウス初期発生の段階で選択的に除去されてしまい、その結果、主として head-to-tail のタンデム構造しか残らないのかもしれない. このような、組み込まれた外来 DNA を不安定化する要因が解明され、それが排除できれば、今後、外来 DNA の導入効率の上昇につながるものと期待される.

また、染色体 DNA との連結部には欠失が認められ、14系統中5系統では両端のみならず、トランスジーンの内でも複雑な再編成 (rearrangement) が生じていた. この欠失や再編成が染色体に組み込まれる前に生じたものなのか、組み込まれた後に生じたものなのかは不明であるが、Covarrubias ら⁽¹²⁾は染色体 DNA を巻き込んだ形で複雑に再編成したトランスジーンをもつ Tg マウスについて報告している. そして、外来 DNA が染色体に組み込まれた時点ではそれはまだ不安定な構造をしており、何回か再編成を繰り返すうちに安定した構造をとるようになり、マウス本来の遺伝子と同様に子孫に伝達されるのではないかと推測している. 筆者らの結果も、外来 DNA が染色体に組み込まれ安定化するまでの間に、特に染色体とトランスジーンの連結部において欠失や再編成が頻繁に生じていることを示しているのかもしれない.

トランスジーン周辺部のクローニングおよび塩基配列の決定：PCR 法の応用

注入された DNA が染色体に組み込まれるメカニズムを解明するためには、トランスジーンの構造をさらに詳しく解析する必要がある、そのためにはトランスジーンをクローン化し、塩基配列を決定していかなければならない。しかしそれは、煩雑でかつ長時間を要する実験の積み重ねを必要とする。そのため、現在までのところトランスジーンとその周辺部をクローン化した例は少なく、その塩基配列が一部でも決定されたのは

Wilkie と Palmiter⁽¹¹⁾ の報告があるだけであった。

近年開発された Polymerase Chain Reaction (PCR) 法⁽¹³⁾は、耐熱性の DNA ポリメラーゼを用いて一組のプライマー間の DNA 断片を 10 万～100 万倍まで増幅する、迅速かつ簡便な方法である。そこで筆者らは、PCR 法およびその変法である inverted PCR 法 (IPCR)^(14,15), asymmetric PCR 法 (APCR)⁽¹⁶⁾ を用いてトランスジーンおよびその周辺部のマウス DNA の塩基配列を迅速に決定する方法を開発した^(17,18)。そのモデル系として、注入した Ad 12 E1A 1 分子が一

図 5 PCR によるトランスジーン構造解析⁽¹⁷⁾
A：使用したプライマーの位置と方向。■：トランスジーンが含まれることが確認できた領域。
B：アガロースゲル電気泳動による PCR 産物の検定。ノーマルマウス（レーン 1, 2), Tg マウス gE1A/1 (レーン 3, 4), gE1A/2 (レーン 3, 4), λE1A/4 (レーン 7, 8) のゲノム DNA を鋳型とし、a～f のプライマーの組合せで PCR を行ない、反応液の 15μl を用いて電気泳動を行なった。

部欠けた形で導入されていることが判明している gE1A/1 および gE1A/2 のトランスジーンを解析した例について以下に紹介する。

まず、これらの Tg マウスのゲノム DNA を鋳型とし、種々のプライマーの組合せで PCR を行ない、目的とする断片が増幅されるか否かを調べることに より、トランスジーンに含まれる Ad12 E1A の領域を限定した (図 5)。その結果、gE1A/1 にはプライマー E1A 206 と E1A 306 に挟まれた領域が、Eg1A/2 にはプライマー E1A 201 と E1A 307 に挟まれた領域が少なくとも導入されていることが明らかになった。

次いで、IPCR 法によりトランスジーンおよびそれに隣接するマウス DNA 領域を増幅した。図 6 に gE1A/1 のゲノム DNA を用いた IPCR の概略図を示した。サザンハイブリダイゼーションにより、gE1A/1 では 0.9 kb の *Pst*I 断片内にトランスジーンが含まれていることが明らかにされていたので⁽⁸⁾、

まず gE1A/1 のゲノム DNA を *Pst*I で消化した後、分子内リゲーションにより環状化した。この時点で、通常は互いに反対方向を向いているプライマー (図中の E1A 208 と E1A 305) が塩基配列未知のマウス染色体領域を挟んで向き合うようになる。次いで、加熱により DNA にニックを入れ、PCR を行なってトランスジーンおよびその周辺部を増幅した。その結果、スメア状の多種多様な産物の中に目的の断片 (0.85 kb) が認められた (図 6、レーン 1, 2)。このようにして増幅された塩基配列未知領域の DNA を含む反応終了液から、ポリエチレングリコール沈殿で反応産物

図 6 ■IPCR および APCR によるトランスジーンの構造解析

■: トランスジーン, ~: マウス染色体 DNA, >: プライマーの位置と方向 (5'→3'), □: -21M13 ユニバーサルプライマー
上段の写真は 100ng (レーン 1) または 20ng (レーン 2) からスタートした IPCR の結果を示している。下段の写真は IPCR の産物を鋳型とした PCR (レーン 3, 5) および APCR (レーン 4, 6) の結果を示している。使用したプライマーは、レーン 3, 4: E1A323 (100 pモル)/E1A224MP (100 pモルまたは 2 pモル), レーン 5, 6: E1A224 (100 pモル)/E1A323MP (100 pモルまたは 2 pモル) である。Mには ϕ X 174 DNA の *Hae* III 消化物を泳動した。図の一番下の矢印は シークエンス反応の方向を示している。

を回収した。得られた DNA を直接鋳型として用い、プライマーの量比を変えた APCR で 1 本鎖 DNA を量産した (図 6、レーン 4, 6)。APCR では最初の数サイクルでは通常の PCR と同様に目的の領域の DNA 断片が 2 本鎖として増幅されるが、サイクルが進むにつれて少ないほうのプライマーが不足するようになり、多いほうのプライマーからのみ DNA が合成されて 1 本鎖 DNA が蓄積する。そして、少ないほうのプライマーの 5' 端に -21 M 13 ユニバーサルプライマーの塩基配列を付加しておく、APCR で得られた 1 本鎖 DNA の 3' 端にはこのユニバーサルプライマーに

相補的な塩基配列が付加される。こうして調製された1本鎖 DNA を $-21\text{ M } 13$ ユニバーサルプライマーを用いたジデオキシ法に直接適応し、DNA 自動シーケンサー (ABI 370 A) によりその塩基配列を解析した。

その結果、gE1A/1 では 424 bp の Ad 12 領域 (トランスジーン) とその両側に隣接する 368 bp および 126 bp のマウス染色体 DNA の塩基配列が、gE1A/2 では 681 bp のトランスジーンとその両側に隣接する 527 bp および 400 bp のマウス染色体 DNA 領域の塩基配列がそれぞれ決定された⁽¹⁸⁾。トランスジーンに隣接するマウス DNA 領域は AT に富み、トランスポゾンやレトロウイルスの組込み部位にみられるような DNA の重複は認められなかった。また、gE1A/1 の 368 bp の隣接領域はマウスの immunoglobulin kappa germline V region : V 16 の 5' 非翻訳領域と 82.8% と高いホモロジーを示したが、もう一方の隣接領域はこの遺伝子の残りの部分とはまったく塩基配列が異なっており、組込みに際して染色体部分でも欠失が生じていることが示唆された。さらに、IPCR で増幅した gE1A/1 のトランスジーン周辺部をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションにより、この染色体部分の欠失が約 700 bp であることが判明した。一方、gE1A/2 の隣接領域と高いホモロジーを示すような既知の遺伝子は見当らなかった。

通常のクローニング法では、トランスジーンとそれに隣接するマウス DNA 領域を得るためには以下に示すようなステップを踏まなければならない。まず、サザンハイブリダイゼーションの結果を参考にしてゲノム DNA の制限酵素消化産物を電気泳動で分離し、目的とする断片を含む部分のゲルを切り出し、そこから DNA を抽出する。抽出した DNA 混合物を適当なプラスミドまたはファージベクターに組み込み、部分的なゲノムライブラリーを構築する。そして、注入に用いた DNA をプローブとするサザンハイブリダイゼーションでスクリーニングを行ない、目的とする断片を含むクローンを単離してくる。この一連の作業で目的のクローンを得るためには最低でも

2～3週間を要する。しかし、今回示したように IPCR 法を用いることにより、1本のチューブ内でゲノム DNA からトランスジーンとその周辺部を増幅し、APCR および DNA 自動シーケンサーによる解析で、きわめて短期間 (3～4日) でその塩基配列を決定することが可能となった。さらに最近では、APCR で1本鎖 DNA を調製しなくとも、2本鎖の PCR 産物をそのままシーケンス反応の鋳型として用いる方法や、蛍光プライマーではなく蛍光ジデオキシを用いて1本のチューブ内で A, G, C, T それぞれに対する反応を同時にとり行なう方法なども改善されており⁽¹⁹⁾、さらに省力化が進んでいる。

一方、この方法では IPCR で増幅できる DNA の長さに限界があるため (～3 kb)、増幅可能な大きさの断片が得られるような制限酵素を選ぶ必要がある。そのためには、種々の制限酵素で予めゲノム DNA を切断した後環状化した“ライブラリー”を構築しておき、機械的に PCR とそれに続くシーケンシングを行なうことで“スクリーニング”していくという方法が有効であろうと考えられる。

今後の展望

前述したように、トランスジーンとその周辺部の構造を解析した例は少ない。しかしその中で、外来 DNA の染色体への挿入によって奇形や生殖異常などの突然変異が引き起こされた Tg マウスについては、どの遺伝子が変異を被ったのかを調べるためにトランスジーン周辺部の構造が詳しく解析されている^(11,12,20)。Tg マウスでは自然の突然変異率よりもはるかに高い頻度で変異が得られることから、こうした挿入突然変異を利用した未知の遺伝子、特に発生分化に直接関与する遺伝子の探索は今後も精力的に続けられるであろう。

一般に Tg マウスにおいては、同じ DNA を導入しても発現するものもあればしないものもあり、発現する場合でもその程度はまちまちである。このことは恐らく、導入された外来 DNA がどのような形で染色体のどこに組み込まれているのかということに依存しているのであろうと考え

られる。しかし、トランスジーンの構造を詳しく解析してそれを実証してゆくには多大な労力を要する。そこで Tg マウスでは外来 DNA がどのようにして染色体に組み込まれるのかという部分については、とりあえずブラックボックスに入れたままにしておき、遺伝子を導入して得られたマウスの中から自分の目的に合ったものを選別して実験に用いるという方法がとられてきた。しかし最近では、品種改良や物質生産を目指してウシやヒツジなどの大動物で Tg アニマルが作出されている（これについては総説・成書⁽²¹⁾がいくつかある。1989 年コーネル大学で開催されたシンポジウム “Genetic Engineering of Animals” の抄録もまとめられているので、興味ある方は参考にされたい⁽²²⁾）。

大型動物の場合、取り扱える受精卵や仮親の数が制限されていること、妊娠期間が長いことや実験コストから考えて、もっと効率良く目的の Tg アニマルが得られるような方法の改善が求められている。そのための方法の一つとして、仮親に移植する前の卵の段階でトランスジェニックか否かを判定し、トランスジーンを有する卵だけを移植することで仮親の数を節約するという方法がある⁽²³⁾。またその一方で、外来 DNA が組み込まれる率を高め、導入された遺伝子は必ず適切に発現する、といったように今までブラックボックスに入れられていた部分を人為的にコントロールするためのアプローチも必要となってきた。近年盛んに行なわれている遺伝子ターゲティングでは、細胞内での組換え効率を上昇させ、かつ染色体へのランダムな組込みを抑制することを目指して様々な研究が行なわれ、相同組換えに関与する酵素群の解析も進んでいる⁽²⁴⁾。Tg マウスにおいても、イントロンが転写効率を高めること^(25,26)や position effect を抑え染色体上の組込み位置に関係なく遺伝子を発現させる因子 (Dominant Control Region : DCR) の発見⁽²⁷⁾など、いくつかの重要な知見が集まりつつある。外来遺伝子の組込みや発現メカニズムの解明に向けて、トランスジーンの構造解析の重要度も今後ますます増してくるであろう。

文献

- 1) J. W. Gordon, G. A. Scangos, D. J. Plotkin, J. A. Barbosa & F. H. Ruddle : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 7380 (1980).
- 2) R. D. Palmiter & R. L. Brinster : *Ann. Rev. Genet.*, **20**, 465 (1986).
- 3) T. Ninomiya, M. Hoshi & A. Yuki : *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 2537 (1988).
- 4) T. Ninomiya, M. Hoshi & A. Yuki : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 369 (1989).
- 5) R. L. Brinster, H. Y. Chen, M. E. Trumbauer, M. K. Yagle & R. D. Palmiter : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 4438 (1985).
- 6) D. M. Robins, S. Ripley, A. S. Henderson & R. Axel : *Cell*, **23**, 29 (1981).
- 7) K. R. Folger, E. A. Wong, G. Wahl & M. R. Capecchi : *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1372 (1982).
- 8) C. W. Lo : *Mol. Cell. Biol.*, **3**, 1803 (1983).
- 9) J. O. Bishop & P. Smith : *Mol. Biol. Med.*, **6**, 283 (1989).
- 10) E. C. Friedberg : “DNA Repair”, W. H. Freeman and Company, New York, 1984.
- 11) T. M. Wilkie & R. D. Palmiter : *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 1646 (1987).
- 12) L. Covarrubias, Y. Nishida & B. Mintz : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6020 (1986).
- 13) R. K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich & N. Arnheim : *Science*, **230**, 1350 (1985).
- 14) T. Triglia, M. G. Peterson & D. J. Kemp : *Nucleic Acids Res.*, **16**, 8186 (1988).
- 15) H. Ochman, A. S. Gerber & D. L. Hartle : *Genetics*, **120**, 621 (1988).
- 16) U. B. Gyllenstein & H. A. Erlich : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 7652 (1988).
- 17) T. Ninomiya & A. Yuki : *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 6 (1989).
- 18) T. Ninomiya, T. Iwabuchi, Y. Soga & A. Yuki : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 1869 (1990).
- 19) Promega Co. & Applied Biosystems Inc.: “Technical Manual : Model 373A DyeDeoxy™ Terminator Taq Sequencing Kit”, 1990.
- 20) R. P. Woychik, T. A. Stewart, L. G. Davis, P. D'Eustachio & P. Leder : *Nature*, **318**, 36 (1985).
- 21) 結城 惇 : “トランスジェニック動物の開発と利用”, シーエムシー出版, 1990.
- 22) W. Hansel & B. J. Weir (ed.) : ‘Genetic Engineering of Animals’, *J. Reprod. Fert.* (suppl.), **41** (1990).
- 23) T. Ninomiya, M. Hoshi, A. Mizuno, M. Nagao & A. Yuki : *Mol. Reprod. Dev.*, **1**, 242 (1989).
- 24) M. R. Capecchi : *Trends Genet.*, **5**, 70 (1989).
- 25) R. L. Brinster, J. M. Allen, R. R. Behringer, R. E. Gelinas & R. D. Palmiter : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 836 (1988).
- 26) R. D. Palmiter, E. P. Sandgren, M. R. Avarbock, D. D. Allen & R. L. Brinster : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 478 (1991).
- 27) A. Stief, D. M. Winter, W. H. Stätling & A. E. Sippel : *Nature*, **341**, 343 (1989).