

遺伝子改変手技と組織化学

森 徹自、山田 久夫

関西医科大学 解剖学第一講座

キーワード

トランスジェニックマウス (transgenic mouse)

ノックアウトマウス (knock-out mouse)

ノックインマウス (knock-in mouse)

Cre-LoxP システム (Cre-LoxP system)

CreER^{T2} システム (CreER^{T2} system)

はじめに

ヒトを含め、さまざまな生物種でゲノムの塩基配列が解明され、医学・生物学研究はポストゲノム時代を迎えている。特定の遺伝子機能を *in vivo* で研究するためには、遺伝子改変動物、つまりトランスジェニック (TG: transgenic) マウスや、ノックアウト (KO: knock-out) マウス、あるいは KO マウスの応用・延長線上にあるノックイン (KI: knock-in) マウスを用いることは、非常に強力な武器であることは言うまでもない。同時に、遺伝子改変マウスは、純形態学・組織化学的研究にとっても、非常に有用である場合が多い。本稿では、遺伝子改変マウスの有用性について、個々の遺伝子機能解析という「本来の」目的ではなく、あくまでも形態学・組織化学的解析に応用されるものに焦点を絞って概説する。特に、発生過程における前駆細胞の子孫細胞の追跡実験 (fate mapping 実験) の実例を挙げて、「古典的」手法が抱える問題点を解決し、遺伝子改変手技の応用がもたらした結果について、その原理から概説する。

組織化学的解析における遺伝子改変技術の利点

組織化学的解析における最終到達点は、ある物質 (mRNA やタンパク質) の臓器・組織内、あるいは単一細胞内での局在を可視化することである。その際に、ある遺伝子 A のプロモーター制御下に GFP (green fluorescent protein) などのレポーター遺伝子 (本来生体中に存在しない遺伝子/タンパク質で GFP や LacZ などに代表される可視化可能な物質) を発現する TG マウスが存在したとする。この TG マウスを用いることは、個々の細胞、あるいは細胞集団の機能に関する形態学的研究において、次のような点で有用であると考えられる。

- ① 従来、遺伝子産物の発現パターンは、mRNA の存在を *in situ hybridization* 法によって、またはタンパク質の存在を免疫組織化学法によって染色することで、「発現」の解析が

行われてきた。TGマウスを使用することで、GFPを指標にして、遺伝子Aの生体での発現を解析することができる。

この際、GFPを指標にすることは、大きな利点となり得る。もし、タンパク質Aが細胞膜上で点状に局在するような場合、様々な細胞種が混在する組織切片中で、タンパク質Aの発現細胞を明確に同定することは困難である場合が多い。特定細胞種のマーカータンパク質Xが核タンパク質である場合、通常、抗A抗体と抗X抗体を用いた二重免疫染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察する方法が考えられるが、このような方法では単一細胞での共存を明確に示すことは難しい(図1)。そのような時、(タンパク質Aをコードする)遺伝子Aのプロモーター制御下にGFPを発現するTGマウス(Promoter A-GFPマウス)がいるならば、抗A抗体の代わりにGFP(通常は細胞質全体に分布する)を指標に用いた方が、抗原Xとの単一細胞での共存関係が明確になる(図1)。さらにGFPに核移行シグナル(nuclear localizing signal: NLS)がついている場合には、GFPは核に局在するので、核タンパク質との共存関係がさらに明瞭になる。

② GFPをはじめ、通常用いられるレポータータンパク質は、細胞質内において特定の細胞内小器官に局在しないために、細胞の突起先端部分や微細な突起まで可視化することができるが、細胞全体の可視化は、通常の免疫組織化学法では不可能な場合が多い。従来は個々の細胞に色素などを注入する方法がとられてきた。この点では特に、細胞体から遠く離れた部位へ、長い軸索を用いて情報を伝えるニューロンの形態を可視化する場合に非常に有効であり、神経回路形成の解析や、神経核群の投射先の同定などに威力を発揮する。同時に色素注入による脳へのダメージや、色素注入の失敗などの手技的問題を考慮することが不要になる。

③ GFPは細胞内において非常に安定なタンパク質であり、内在性の他のタンパク質と比較して半減期が長い。マーカータンパク質Aを発現する細胞(A細胞)から、マーカータンパク質Bを発現する別の細胞(B細胞)に分化する場合、その分化過程を組織学的に追跡するには、経時的に両タンパク質の発現を比較して、単一細胞において両者が共発現すること、つまりA細胞とB細胞の中間型細胞の存在を示す必要がある(図2A)。B細胞ではタンパク質Aの発現レベルは減弱すると考えられるため、安定なGFPタンパク質を指標に用いると、A細胞からB細胞への中間型細胞の検出が容易になり、細胞分化の様子をより明確に示すことが可能になると考えられる(図2B)。

④ さらに、A細胞からB細胞を経てC細胞に分化し、細胞が長い時間をかけて生体内を広範囲に移動してゆく場合も想定される。このような場面は発生学的研究において多く見られるが、特定の細胞集団のfate mapping実験で遺伝子改変マウスは有用であろうか？

Promoter A-GFPのTGマウスを用いれば、前述の通り、A細胞と分化が進んだA細胞(AとBの中間型細胞)がGFPで標識することができるが、C細胞はGFP陰性である場合が多いために、単純なTGマウス、あるいはKIマウスでは、この問題を解決することはできない(図2)。現在では様々な技術改良によってこの問題は解決され、非常に精度の高い

解析が可能になり、多くの知見が得られている。この点については、「遺伝子改変技術の改良」の項で後述する。

以上のように、遺伝子改変マウスを利用して、レポータータンパク質を指標に組織化学的解析を行う際には、TGマウスを使用する場合、あるいはKIマウスを使用する場合、注意すべき点が大きく異なる。さらには、両者の特徴を十分理解した上で使用しなければ、染色結果の解釈に重大な誤りを招くことにもなりかねない。また、単純なTGやKIマウスでは解決できない問題も存在する（前述 図2 B）。

そこで最初に、TGマウスとKO/KIマウスの違いと、それぞれの長所・短所について簡単に概説する。なお、遺伝子改変マウス作成の詳細なプロトコールは成書にゆだね^{1,2)}、概略は図3、4とその説明を参照されたい。

TGマウスとKO/KIマウスの違い

基本的な違いとして、TGマウスは特定の遺伝子を生体内で強制的・異所的に発現させる **gain of function** 実験系であり、KOマウスはその逆で、特定の遺伝子を破壊する **loss of function** 実験系である。KOマウスの応用が、ノックインである。つまりある遺伝子座に別の遺伝子を挿入し、内在性のプロモーターを使用して外来遺伝子を強制発現させる実験系である。

①TGマウス

特徴

TGマウスは特定のプロモーター下流に、任意の遺伝子を連結したトランスジーンを作成し、受精卵に注入することにより作成する遺伝子改変マウスである（図3）。組織学的解析に有用なTGマウスは、前述のようにGFPなどのレポーター遺伝子を発現するマウスである。組織特異的な活性を持つプロモーターを使用すれば、特定の細胞集団をGFPで標識することができる。

長所

トランスジーンが比較的小さいためにベクターの構築が容易である。また、受精卵にトランスジーン（DNA溶液）を注入するために、胚操作が比較的容易である。トランスジーンは通常、複数コピー（数十～100コピー程度）がゲノムに組み込まれる。組織特異的プロモーターは、**ubiquitous** プロモーター（全ての細胞で活性があるプロモーター）に比べて弱い場合が多いが、多コピーの導入によって結果的に、非常に強いトランスジーンが発現が得られやすい。

短所

使用するプロモーターは、あらかじめ詳細に同定されていなくてはならない。さらに、ト

ランスジーンがゲノムのどの位置に組み込まれるかが予測できない。ランスジーンが組み込まれた位置によっては、周囲のプロモーターあるいはサイレンサーの影響を大きく受け、目的とする組織以外でのランスジーンが発現が検出されたり（異所的発現）、ランスジーンが発現が弱い、あるいは発現が検出されない場合がある(**positional effect**)。この点は、特に組織特異的プロモーターを用いてTGマウスを作成する際には大きな問題になる。そのため、複数ラインのTGマウスを作成し、最良のラインを選んで解析に用いるのが普通である。

このような **positional effect** を最小限に抑えるために、**BAC (bacterial artificial chromosome)** クローンを用いて、目的遺伝子座を含む、数十 Kbp の巨大なゲノムDNAを使用してベクターを作成する方法がある。この巨大なDNA配列の中には、内在性遺伝子の発現を正確に反映するようなプロモーターやエンハンサーが全て含まれると期待できる。反面、大きなランスジーンのために、ベクター構築が煩雑になる欠点もある。この場合でも、ランスジーンを組み込みにより、他の遺伝子を破壊する危険性は常に付きまとう。

②KO/KIマウス

特徴

KOマウスは、全分化能をもったES細胞(**embryonic stem cell**)を使用して、標的遺伝子を特異的に破壊することで、その遺伝子機能を解析する実験系である。KOマウスは基本的に、**loss of function** 実験系であるが、ある遺伝子座に **GFP** など別の遺伝子を組み込む（ノックイン）ことで、内在性のプロモーターを正確に反映した、異所的遺伝子発現の実験系を組むことができる（図4）。これが **KI** マウスである。この場合、**GFP** をある遺伝子座に組み込んだ **KI** マウスが、組織学的研究に有用である。

長所

Targeting vector と標的遺伝子座との間で、ある一定の確率で起こる相同組換えによって遺伝子改変を行うために、他の遺伝子座に影響を及ぼす心配（標的遺伝子以外の破壊）が全く無い。TGマウスの場合（**BAC** のTGマウスは別として）、すでに同定されたプロモーター領域の情報が必須である。しかし、**KI** マウスで **GFP** 発現を行う場合には、そのような情報は必要ない。さらに、**KI** マウスの場合、TGマウスの場合に問題となる **positional effect** を考慮する必要がなく、内在性の遺伝子発現を正確に反映した異所的な遺伝子発現が可能である。

短所

KO/KIマウス作成までの手順が煩雑であり、TGマウス作成と比較すると、多大な労力と時間を必要とする（図3と図4を比較）。

KIマウスで、内在性プロモーターを用いて GFP を発現させる場合、ubiquitous プロモーターに比べてプロモーター活性が弱い（GFP タンパク質発現レベルが低い）場合がある。TGマウスはトランスジーンが複数コピー組み込まれるのに対して、KIマウスの場合には標的遺伝子座に1コピーしか導入されないため、例えばKIマウスで GFP を発現させる場合には、免疫染色で ABC 法によってシグナルを増幅したり、細胞を分取する場合には FACS を使用するなど、高感度の検出系が必要になる場合がある。

遺伝子改変技術の改良

以上のように、TGマウス、KIマウスそれぞれに長所、短所があり、よく理解した上で、自分の実験系に合わせた選択が必要になってくる。

冒頭でも述べたが、例えば前駆細胞の分化（とその子孫細胞）を追跡する fate mapping 実験の場合、2点の重要なポイントがある。1点目は、特定の部位に存在する前駆細胞を、永久に標識する必要がある。つまり、空間（臓器・組織・細胞集団）特異的な標識の必要性である。2点目は、発生過程における前駆細胞は、経時的に性質が変化し、結果として発現されるマーカー分子や、産生される子孫細胞が異なってくる場合があるために、任意の発生・分化段階で前駆細胞を標識する必要性がある。つまり、時間特異的な標識の必要性である。

fate mapping 実験において、「古典的」組織化学的手法を用いた実験が従来から行われてきた。つまり、①細胞分化の様々な段階で特異的に発現されるマーカー分子を経時的に追跡することで、未分化細胞から成熟細胞まで追跡する方法³⁾、未分化細胞の共通した特徴である細胞増殖という点から、②H³標識チミジン、あるいは BrdU 投与により、増殖細胞を特異的に標識し、分裂・増殖した細胞を H³標識チミジンや BrdU を指標に追跡する方法⁴⁾、③GFP などを発現するレトロウイルスで増殖細胞を標識する方法⁵⁾、④ウズラから採取した前駆細胞をニワトリ胚の相同部位に移植した後、ウズラ由来の細胞を組織学的に追跡する方法⁶⁾などである。

これらの追跡方法にはそれぞれ大きな問題点が存在する。①では、適当なマーカー分子が存在することが大前提である。②では、取り込まれた標識物質が、分裂を繰り返すうちに希釈されてしまうために、成熟細胞では標識物質が検出されない場合がある。③のウイルス標識では、GFP 発現ユニットが宿主ゲノムに組み込まれるが、通常はプロモーターの silencing によって GFP 発現が遮断されるために、長期間の追跡実験が困難である。また、標識効率が低く、標的とする全ての細胞を効率よく標識できないことも問題である。③と④では、胎生初期での解析などで、注入や移植手術が困難・不可能な場合がある。また、ウイルス注入や移植操作は、生体にとって傷や負荷を伴うために、「正常」状態とは環境・条件が異なる場合がある。

これまでも、「古典的」TGマウスやKIマウスを用いた fate mapping 実験が行われてきた。つまり、標的組織・細胞特異的に発現するマーカー分子Aがあった場合、その遺伝

子Aのプロモーター制御下に GFP などのレポーター遺伝子を発現させる TG マウスを作成する方法である (図 2B)。前述の通り、GFP は非常に安定なタンパク質であるので、内在性のタンパク質Aの発現レベルが低下しても GFP は検出できる場合が多い。しかし、この方法にしてもまた一過性の標識であり、上記の「古典的」追跡方法と大差ない (図 2)。現在では、さまざまな技術の開発により、この問題を解決して、より精度の高い解析を行う実験系が主流になっている。解決方法の一つが、CreERT²-LoxP システムを用いた空間特異的・時間特異的 (コンディショナル) な遺伝子改変技術である 7)。

これは、バクテリオファージ P1 由来 Cre recombinase (Cre) とその認識 DNA 配列である LoxP 配列 (LoxP) の組み合わせによる Cre-LoxP システムを基礎としている 8)。Cre-LoxP システムとは、Cre が、同一方向に配置された 2 つの LoxP 配列で挟まれた DNA 領域を欠損させるシステムである (図 5)。例えば、生体内で A 細胞を GFP で特異的に標識したい場合がある。そのとき、プロモーターA制御下に Cre を発現する TG マウス、あるいは、A 遺伝子座へ Cre をノックインした KI マウスと、レポーターマウスを交配する。レポーターマウスとは、Cre による組換え反応後でのみ、ubiquitous プロモーター制御下に GFP を発現する遺伝子改変マウス (ubiquitous promoter – LoxP – stop codon – LoxP – GFP) である。組換えが起きなければ、LoxP 配列ではさまれた stop codon によって、下流の GFP 遺伝子の発現は遮断される。組換えが起こった (stop codon の削除) 後は、ubiquitous promoter の働きにより、恒常的に GFP が発現するので、A 細胞が分裂・分化・移動しても、その細胞と子孫細胞が「永久に」GFP で標識される (図 5)。これで空間特異的遺伝子改変が実現可能になり、図 2 B で解決できない問題、つまり A 細胞から C 細胞への分化を証明することができる。

もう一つの問題、つまり時間特異的遺伝子改変のためには、それぞれの研究目的に合致した、組織特異的でしかも発生段階特異的なプロモーターが存在するならば、そのプロモーター下流に Cre を発現させる TG マウスを作成する方法が挙げられる 9)。しかし、都合の良いプロモーターは常に存在するとは限らず、任意の時期に Cre 活性を誘導する仕組みが必要な場合がある。活性誘導型 Cre として、現在広く用いられているのが、CreERT² システムである 7)。

エストロゲンレセプター (estrogen receptor : ER) は、通常は細胞質内に存在し、リガンドが細胞膜を通過して ER と結合すると、ER は核へ移行して転写調節因子として機能する。この性質を利用したのが CreERT² システムである (図 6)。まず、転写調節因子としての機能ドメインを欠く変異型 ER と Cre の融合蛋白 (CreER) を任意のプロモーター制御下で発現させる。次に、エストロゲンの類似化合物であるタモキシフェンを経口あるいは腹腔内投与することで CreER タンパク質を核移行させて Cre 活性を誘導する。その際、内在性のエストロゲンに反応しないように ER に変異を入れた ER^{T2} が通常用いられている 10, 11)。タモキシフェンを任意のタイミング (発生段階) で投与することで、自由に Cre 活性を誘導することができる (図 6)。任意の組織特異的プロモーター制御下に CreERT² を発現さ

せるTGあるいはKIマウスを作成すると、場所(臓器・組織)と時間特異的に遺伝子改変を行うことが可能になる(図6)7)。

CreERT²-LoxP システムを用いることで、古典的標識方法をはるかに凌ぐ精度で、fate mapping 実験を行うことができる。これにより、前述の古典的組織化学法が抱える問題、つまりマーカー分子の必要性、標識物質の希釈や検出限界、標識効率、標識物質(ウイルスベクターや細胞)の注入といった様々な問題を解決することができる。しかしながら、CreERT² システムもまた完璧ではない点も留意するべきであろう。最大の問題点は、Cre 活性誘導効率が100%ではないことである。Cre 活性誘導効率は、CreERT²タンパク質を発現させるプロモーターの強さや、標的とする臓器・細胞など、個々の状況で異なる。脳は脳-血液関門に守られているために、Cre 活性誘導効率が低い組織のひとつである。

遺伝子改変マウスを利用した fate mapping の実例

最後に、CreERT²-LoxP システムを用いた fate mapping の実例を挙げて解説する。

実例 1

神経系の発生過程において、神経上皮細胞から分化する放射状グリア(radial glia)は、胎生中期にニューロンを産生し、胎生後期から生後にかけてグリア(アストロサイト、オリゴデンドロサイト)を産生する神経幹細胞として機能する¹²⁾。遺伝子改変マウスを使用して放射状グリアの fate mapping を行う際には、放射状グリアのマーカーのひとつである GLAST(L-glutamate/L-aspartate transporter)のプロモーター下流に Cre を発現させる TGマウスまたはKIマウス(GLAST-Cre)と、レポーターマウスを交配すれば良い印象を与える(図7A)。実際、放射状グリアで誘導された組換えは、レポーター遺伝子である GFP の発現として可視化され、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトで GFP 陽性になる(図7Aで緑色の細胞)。これにより、少なくとも GLAST プロモーター活性を持たないニューロンとオリゴデンドロサイトにおける GFP の発現は、親細胞である放射状グリアにおいて誘導された結果であることが証明できる。しかしながら、放射状グリアは胎生期におけるアストロサイトの一種と考えられており、成獣期のアストロサイトとマーカー遺伝子を共有する¹²⁾。GLAST も放射状グリアだけでなく、成獣期アストロサイトでも発現(GLAST プロモーター活性あり:図7Aで青線の細胞)している。よって、単なる GLAST-Cre のTGマウスでは、成獣期アストロサイトで発現する GFP が、親細胞の放射状グリアで起きた組換えの結果であるか、それとも成獣期になって起きた組換えの結果であるかの判別をすることができない(図7A)。

成獣期アストロサイトが放射状グリアの子孫細胞であることを明確に証明するためには、胎生期の放射状グリアで特異的に Cre 活性を誘導することが必要になる。つまり、GLAST-CreERT²マウスを使用し、タモキシフェンを胎生期に投与することが必須である(図7B)¹³⁾。成獣期アストロサイトでのみ組換え反応(GFP の発現)を誘導したい場合には、タモ

キシフェンを成獣期に投与すればよい (図 7 C) ¹³⁾。

実例 2

成獣の脳室下帯(subependymal zone: SEZ)には嗅球の介在ニューロンを産生する神経幹細胞/前駆細胞が存在し、嗅球は恒常的に脳室下帯から新たなニューロンの供給を受けている。この神経幹細胞もまた、成獣期アストロサイトや放射状グリアと同様に GLAST を発現する ¹²⁾。この実例の場合では、レポーターマウスとして、組換えの指標に LacZ をレポーター遺伝子として発現するマウスを使用した。GLAST⁻ CreERT² マウスとレポーターマウスを交配し、成獣期でタモキシフェンを投与すると、Cre による組換え反応 (β -gal : β -galactosidase タンパク質の発現) が神経幹細胞において誘発される (図 8 A)。幹細胞での組換え (β -gal タンパク質の発現) は子孫細胞である神経前駆細胞や嗅球の介在ニューロンにも受け継がれる。このシステムを用いることで、成獣期における嗅球ニューロン更新の様子を詳細に解析することが可能になった(図 8 B)¹³⁾。タモキシフェン投与後 10 日目と 4 ヶ月目では、更新された嗅球ニューロンの数が有意に増加していることが明確に示された (図 8 B)¹³⁾。同様に、海馬にも神経幹細胞が存在し、GLAST が発現しているため、嗅球同様、海馬でのニューロン更新の様子が解析できる ¹⁴⁾。脳室下帯や海馬の神経幹細胞もやはり放射状グリアの子孫細胞であるために、図 7 A で例としてあげた、単なる GLAST⁻ Cre マウスでは、このような解析は不可能であることに再度注意を喚起したい。

CreERT² システムを用いた fate mapping 実験の手順

前述の GLAST⁻ CreERT² の実例を元に、実際の実験を行う際の手順と注意点を述べる。K I マウス作成の概略は、図 4 を参照されたい。

- ① 常法に従い、CreERT² カセットを GLAST 遺伝子座にノックインした K I マウスを作成する。
- ② K I マウスは、通常ヘテロ接合体で維持する。なぜなら、CreERT² カセットをノックインした遺伝子のノックアウトになってしまい、正常に維持できない場合があるためである。しかし、GLAST の KO マウスは顕著な異常が報告されていないので、ホモ接合体で維持することが可能であった。ホモ接合体で維持することができれば、遺伝子型判定の手間を省くことができる。ただし、解析に用いるマウスは、ヘテロ接合体を使用すべきである。用いる遺伝子座によっては、ヘテロ接合体でも異常が現れる場合があるので、解析を始める前に確認しておく。
- ③ レポーターマウスの入手。他の研究者からの供与、あるいは Jackson Lab などの大手ブリーダーからの購入が可能である。レポーターマウスの場合も、ホモ接合体で維持が可能ならば、非常に都合が良い。
- ④ GLAST⁻ CreERT² マウスとレポーターマウスの交配。両者共にホモ接合体であるならば、仔マウスは全て両者のヘテロ接合体であるために、遺伝子型判定が不要であり、すぐに

解析を開始することができて非常に都合がよい。

- ⑤ ④で作成した二重TGマウスに、任意の時期にタモキシフェンを投与する。タモキシフェンは corn oil に溶解し、1ヶ月以内に使い切る。投与方法は、腹腔内投与と経口投与が一般的である。標的臓器によって、タモキシフェンによる Cre 活性誘導効率に違いが現れる（前述）。Cre 活性誘導効率を最高にするためには、投与方法と、投与回数を至適化する必要がある。タモキシフェンを大量に投与するとマウスが死亡するので、注意が必要である。残念ながら投与方法の golden standard は存在せず、それぞれの場合によって経験的に決定されるべきである。
- ⑥ 常法に従ってマウスを灌流固定し、組織化学的解析に供する。GFP などのレポータータンパク質と、さまざまな細胞種に対するマーカータンパク質の蛍光二重免疫染色を行う。マーカー遺伝子が LacZ の場合は、抗 β -gal 抗体を用いて免疫組織化学を行うことも可能だが、より直接的な X-gal 酵素組織化学法で、明視野観察を行うことも可能である。

おわりに

古典TG・KO/KIマウスから始まり、技術改良が重ねられ、現在までに多くの系統のマウスが作成されてきた。目的に応じてそれらのマウスを交配し、二重、三重の遺伝子改変動物を作成することができる。遺伝子改変動物は、その組み合わせによって無限の可能性を持った研究資源であるといえる。

遺伝子改変マウスを利用することで、組織化学的解析の精度が向上し、新たな発見に結びつく可能性が高い。今後、さらに多くのマウスが作成されることで、医学・生物学の研究が飛躍的に進歩することは確実である。

引用文献

- 1) 小池克郎, 関谷剛男, 近藤寿人: 分子生物学プロトコール. 南江堂 453-479, 1999.
- 2) 村松正実, 山本雅: 新 遺伝子工学ハンドブック. 羊土社 248-277, 2003.
- 3) Takamori Y, Tamura Y, Kataoka Y, Cui Y, et al.: Differential expression of nuclear lamin, the major component of nuclear lamina, during neurogenesis in two germinal regions of adult rat brain. *Eur J Neurosci* **25**: 1653-1662, 2007.
- 4) Tamura Y, Kataoka Y, Cui Y, Yamada H: Cellular proliferation in the cerebral cortex following neural excitation in rats. *Neurosci Res* **50**: 129-133, 2004.
- 5) Szele FG, Cepko CL: The dispersion of clonally related cells in the developing chick telencephalon. *Dev Biol* **195**: 100-113, 1998.
- 6) Le Douarin N, Dieterlen-Lievre F, Creuzet S, Teillet MA: Quail-chick transplantations. *Methods Cell Biol* **87**: 19-58, 2008.
- 7) 森徹自, 若林毅俊, 高森康晴, 山田久夫: Cre-LoxP 遺伝子改変システムの改良. *脳* **21** **9**: 479-484, 2006.
- 8) 小林憲太, 小林和人: Cre-LoxP システム : コンディショナルな遺伝子改変技術. *脳* **21** **7**: 312-315, 2004.
- 9) Kobayashi K, Takahashi M, Matsushita N, Miyazaki J, et al.: Survival of developing motor neurons mediated by Rho GTPase signaling pathway through Rho-kinase. *J Neurosci* **24**: 3480-3488, 2004.
- 10) Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P: Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* **237**: 752-757, 1997.
- 11) Feil R, Brocard J, Mascrez B, LeMeur M, et al.: Ligand-activated site-specific recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 10887-10890, 1996.
- 12) Mori T, Buffo A, Gotz M: The novel roles of glial cells revisited: the contribution of radial glia and astrocytes to neurogenesis. *Curr Top Dev Biol* **69**: 67-99, 2005.
- 13) Mori T, Tanaka K, Buffo A, Wurst W, et al.: Inducible gene deletion in astroglia and radial glia--a valuable tool for functional and lineage analysis. *Glia* **54**: 21-34, 2006.
- 14) Ninkovic J, Mori T, Gotz M: Distinct modes of neuron addition in adult mouse neurogenesis. *J Neurosci* **27**: 10906-10911, 2007.

付図説明

図1 遺伝子改変マウスを用いて、単一細胞における二種類の抗原の共存を証明する例
細胞膜上に点状に局在するタンパク質A（緑）と、核タンパク質であるX(赤)の二者が、組織切片中の単一細胞内で共存することを証明する場合、明確に示すことは難しい。(タンパク質Aをコードする) 遺伝子Aのプロモーター制御下に GFP を発現する遺伝子改変マウス (Promoter A - GFP マウス)がいるならば、抗原Aの代わりに GFP を指標に用いることで、AとXの共存を明確に示すことが可能である。GFP に核移行シグナル (nuclear localizing signal : NLS)が付加されている場合には、GFP は核に局在するので、単一細胞レベルでの共存関係がより明確になる。赤と緑のシグナルが重なると黄色に見える。

図2 遺伝子改変マウスを用いた、細胞分化の解析例

前駆細胞Aが経時的に細胞B、Cへと分化し、それぞれの細胞に対する異なるマーカー分子が存在する。(A) 通常の免疫染色法によって、これらの細胞の経時変化を追跡する際には、それぞれのマーカー分子の発現パターンを解析すればよい。しかし、A細胞のマーカー分子Aは、B細胞に分化する際に発現レベルが低下するために、追跡が困難な場合がある。(B) Promoter A - GFP のTGマウスがあれば、安定な GFP タンパク質を指標に用いることで、A細胞の分化を明確に証明することができる。しかし、GFP を指標としても、C細胞への分化までは証明できない。

図3 Transgenic mouse 作成の概略

①トランスジーン (ベクター) の作成

②トランスジーンを受精卵へ注入

雄性前核、雌性前核どちらでもよいが、雄性前核の方が大きいので注入しやすい
偽妊娠マウスへトランスジーン注入済み受精卵を移植
(DNA注入後、あるいは2細胞期)

③出産

場合によっては帝王切開にて出産 (帝王切開で出産の場合は、里親を準備しておく)

④4週齢で離乳

尻尾の先端数ミリを切断, DNA採取

PCR あるいはサザンブロットィングでトランスジーン組み込みを確認

各ラインを野生型マウスと交配、個体数を増やす

各ラインで、目的遺伝子が期待通りの組織・細胞に発現していることを確認

(組織学的解析、FACS など)

目的遺伝子産物の発現レベル、異所的発現の有無などを確認

最良のラインを選んで解析に供する

予期せぬ表現型が出る場合があるので、複数ラインを同時に解析する

図4 Knock-in mouse 作成の概略

① Targeting vector の作成

GFP と neomycin 耐性遺伝子 (Neo) の発現カセットを組み込む

② E S 細胞培養 (一般的には 129SV 由来の E S 細胞を使用)

Targeting vector をエレクトロポレーションで E S 細胞へ導入

③ 薬剤(neomycin)耐性クローンを選別

サザンブロッティングで正しく相同組換えが起きているクローンを選別

WT: 野生型染色体、GFP: 組換え染色体

④ 数クローンを選んで、相同組換え体 E S 細胞を胚盤胞に注入

⑤ 偽妊娠マウスに移植

⑥ キメラマウスの誕生

場合によっては帝王切開で出産 (帝王切開の場合は里親を準備しておく)

毛色から、注入 E S 細胞のキメラマウスに対する contribution を判断

129SV、C57Black/6 の体毛色は、それぞれ agouti (野ネズミ色)、黒である

キメラマウスにおける 129SV 由来 E S 細胞の構成比率は、体毛色比率で判別する

⑦ 最も良い数ラインを選んで、野生型 C57Black/6 と交配する

⑧ 生まれた仔マウスの毛色から、注入 E S 細胞が生殖細胞に分化している (germ line transmission) を確認する

ヘテロ接合体を選別 (PCR、またはサザンブロッティングによる)

図5 空間 (臓器・組織・細胞) 特異的遺伝子組み換え

プロモーターA制御下に Cre を発現させる TG マウスと、レポーターマウスを交配して、二重 TG マウスを作成する。二重 TG マウスの生体内において、プロモーターAが活性を示す A 細胞 (青線の細胞) でのみ Cre が発現するので、この細胞集団においてのみ遺伝子組換えが誘導される (緑色の細胞)。レポーターマウス由来の GFP は、ubiquitous プロモーター制御下で恒常的に発現するので、A 細胞の子孫細胞でも GFP が発現する (図2の Promoter A - GFP TG マウスの例と比較)。プロモーターAの活性が無い他の細胞集団では Cre が発現しないので、遺伝子組換え (GFP の発現) が起こらない。(文献7より一部改変)

図6 時間特異的遺伝子組換えシステム

Cre と変異型エストロゲン受容体 (DNA 結合部位を欠く) の融合タンパク質である CreERT² は、通常は細胞質中に存在する。タモキシフェンと CreERT² が結合すると、CreERT² は核へ移行し、その結果 Cre 活性 (遺伝子組換え) が誘導される。任意の時期にタモキシフェン

ンを投与することで、自由に Cre 活性を誘導することができる。(文献 7 より一部改変)

図 7 空間・時間特異的遺伝子組換えの例

胎生期の中枢神経系に存在する放射状グリアの fate mapping 実験。(A) アストロサイト特異的グルタミン酸トランスポーターである GLAST のプロモーター制御下に Cre を発現する TG マウスと、レポーターマウスを交配し、二重 TG を作成する。GLAST プロモーターは放射状グリアでも活性を示す(青線の細胞)ので、まず放射状グリアで組換え(GFP 発現: 緑色)が起こる。放射状グリアとその子孫細胞、つまりニューロン、オリゴデンドロサイトで GFP 発現が受け継がれる。しかしながら、GLAST プロモーターは成獣期のアストロサイトでも活性を示すので、この実験系ではアストロサイトが放射状グリアの子孫細胞であることを明確に証明できない。(B) GLAST-CreER^{T2} マウスを使用し、タモキシフェンを胎生後期に投与することで、胎生後期の放射状グリアとその子孫細胞(アストロサイトとオリゴデンドロサイト)が GFP で標識される。この場合、成獣期アストロサイトにおける GFP 発現は、タモキシフェンを投与した時点での組換え誘導の結果ですることに注意。(C) GLAST-CreER^{T2} マウスで、成獣期にタモキシフェンを投与すると、アストロサイトでのみ組換え(GFP 発現)が誘導される。(文献 7 より一部改変)

図 8 GLAST-CreER^{T2}-LoxP システムを用いた fate mapping の例

成獣の脳室下帯(SEZ: subependymal zone)に存在する神経幹細胞は、特殊なアストロサイトとして知られ、やはり GLAST を発現する。(A) GLAST-CreER^{T2} と、レポーターマウス(この場合、LacZ をレポーター遺伝子とするマウス)を交配し、成獣期にタモキシフェンを投与する。神経幹細胞から分化した全ての細胞が LacZ 遺伝子産物であるβ-gal タンパク質を発現する。(B-a)脳室下帯の神経幹細胞と、その子孫細胞で、嗅球に移動中の doublecortin (DCX)陽性(緑)の神経前駆細胞において、β-gal(赤)の発現が検出される(merge により黄色になる)。(B-b, b', b'')タモキシフェン投与後 10 日目では、嗅球内でβ-gal 陽性の NeuN 陽性成熟ニューロン(矢印)はごく少数である。(B-c, c', c'')SEZ から嗅球へ、継続的にニューロンが供給されるので、タモキシフェン投与後 4 ヶ月目の嗅球では、β-gal 陽性の NeuN 陽性成熟ニューロン(矢印)が多数を占める。矢頭は、β-gal 陰性の NeuN 陽性ニューロンを示す。SEZ: 脳室下帯、LV: 側脳室、CC: 脳梁(文献 13 より一部改変)

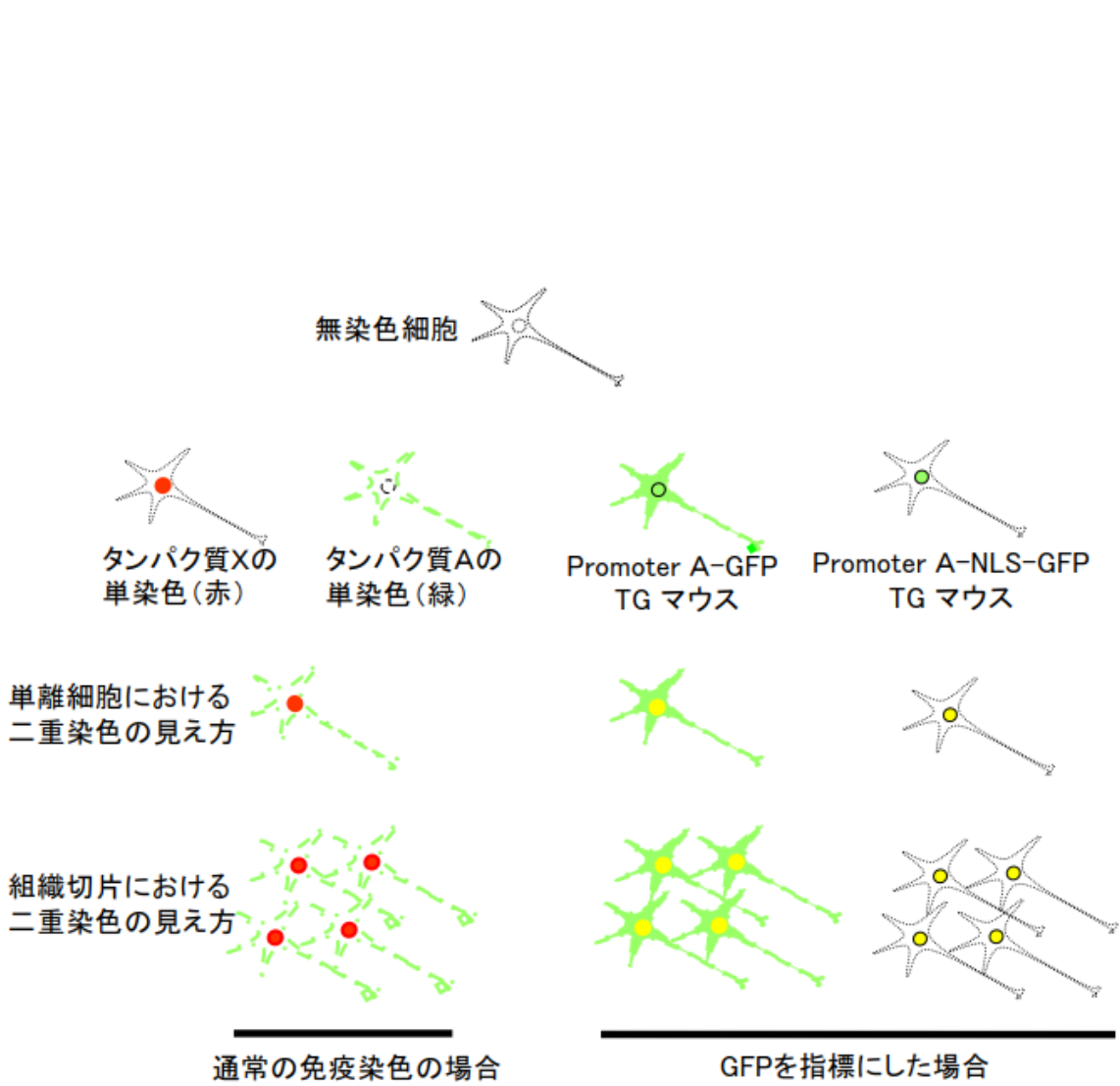


図 1

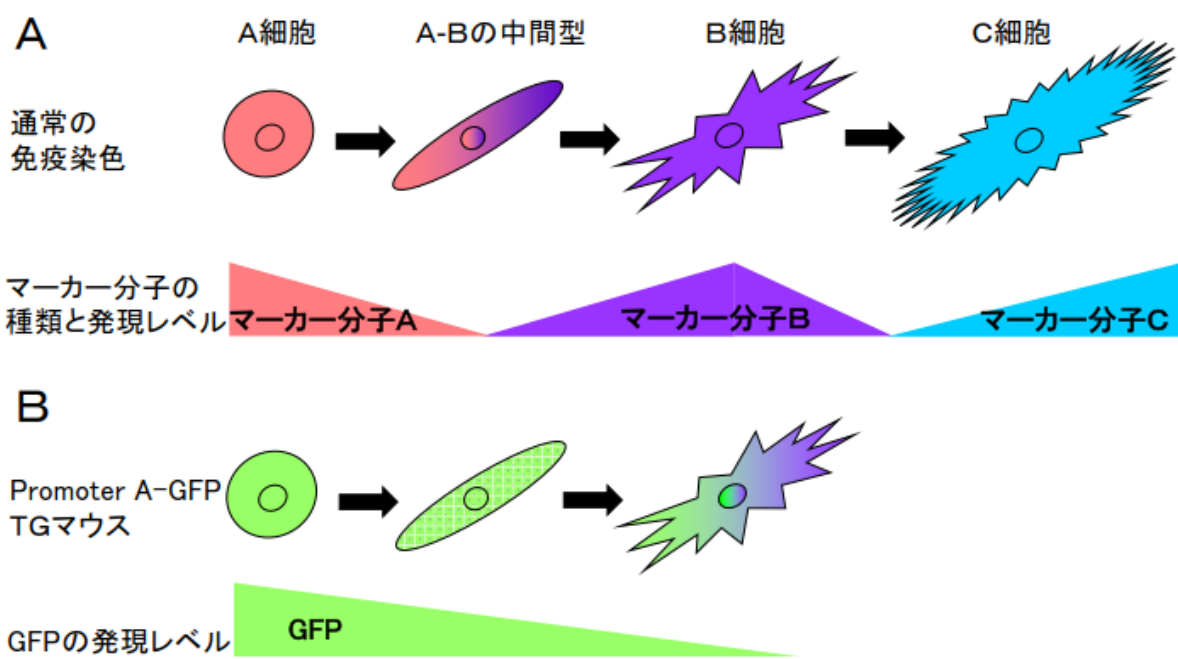
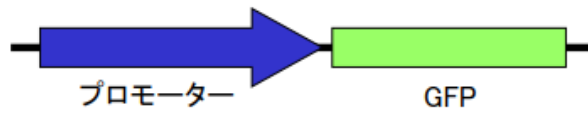
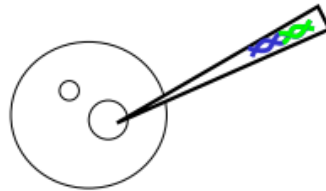


図 2

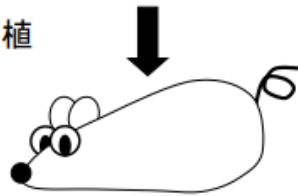
①トランスジーン作成



②受精卵へ注入



③偽妊娠マウスへの移植



④出産

最良ラインの選別

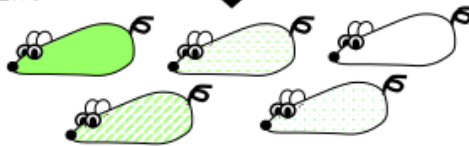
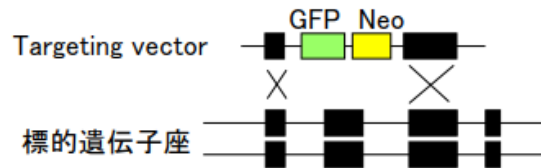
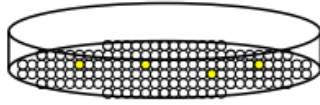


図 3

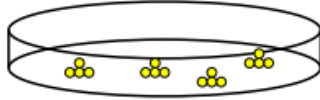
① Targeting vector作成



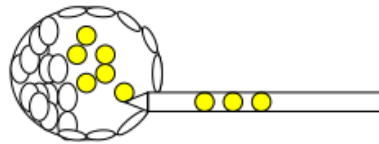
② ES細胞へtargeting vectorの導入



③ 薬剤(neomycin)耐性クローンの選別
サザンブロットィングで相同組換え体選別



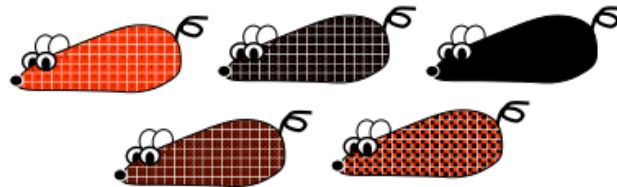
④ 相同組換えES細胞を胚盤胞へ注入



⑤ 偽妊娠マウスに移植



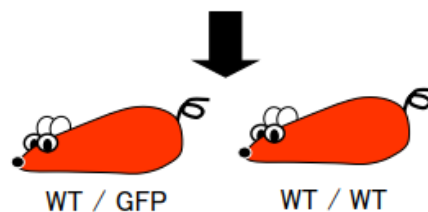
⑥ キメラマウス誕生



⑦ 野生型マウスと交配



⑧ Germline transmission確認
遺伝子型確認
ヘテロ接合体を選別



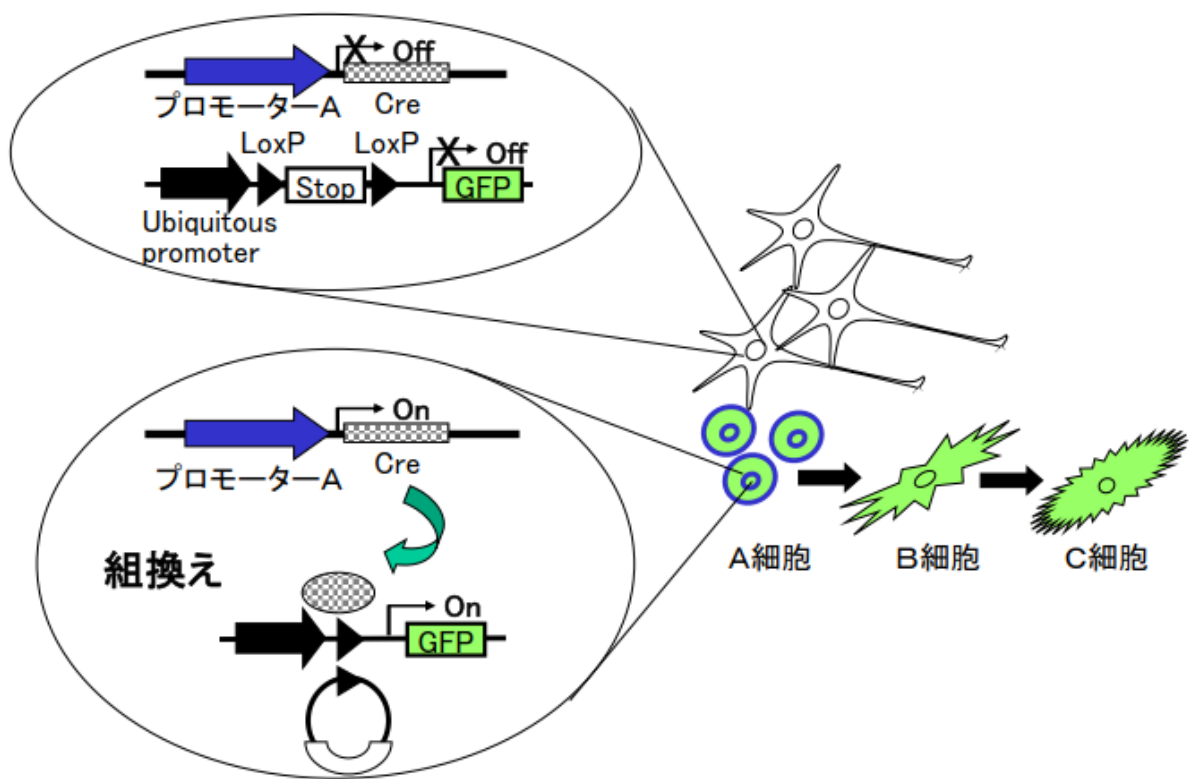


図 5

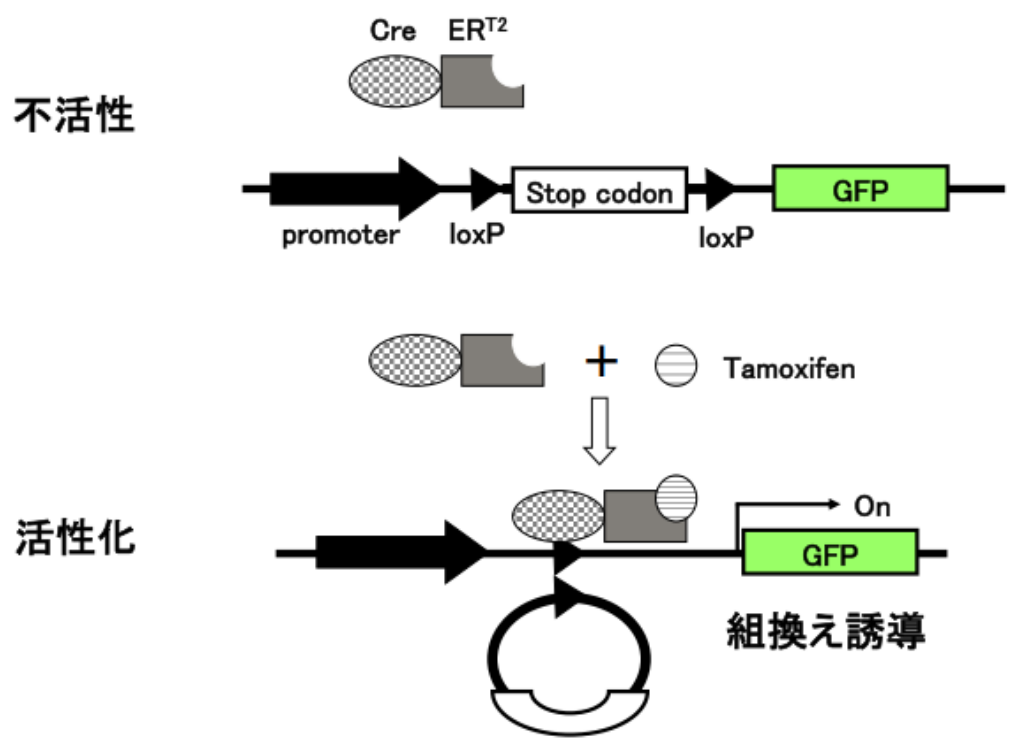


図 6

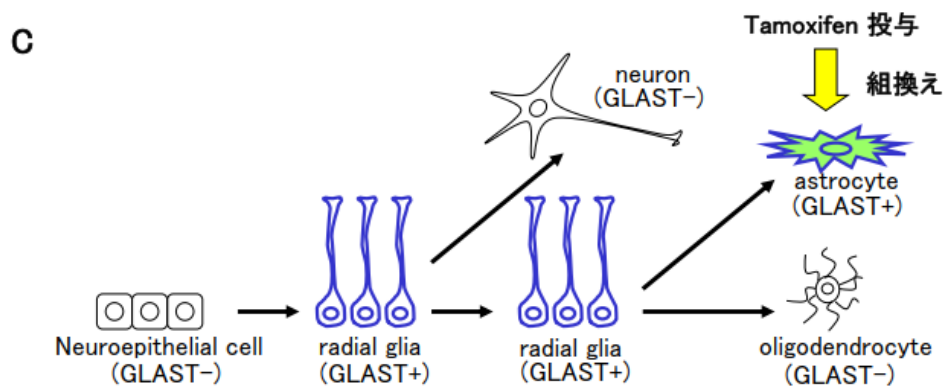
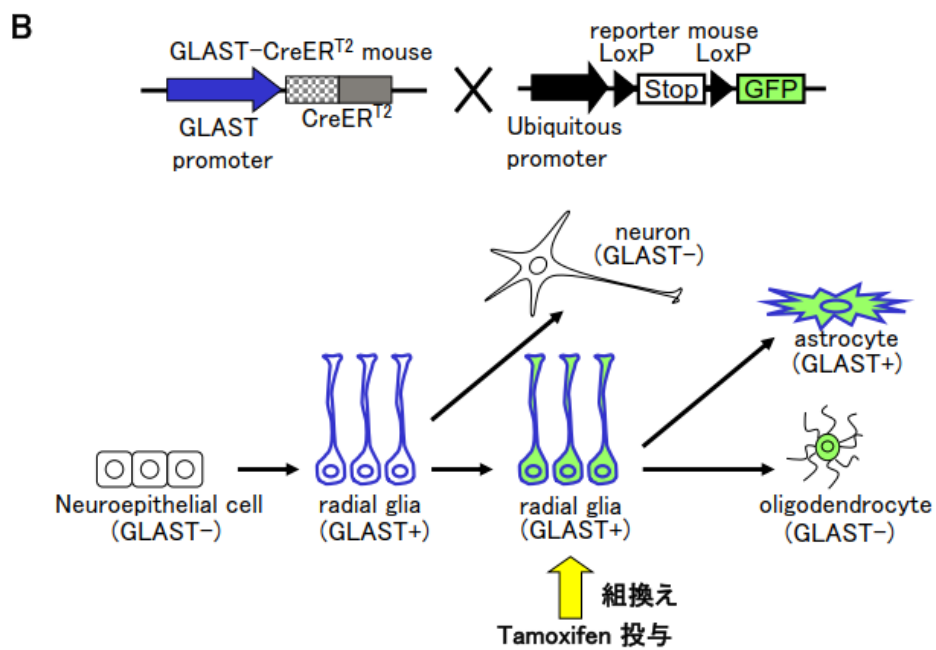
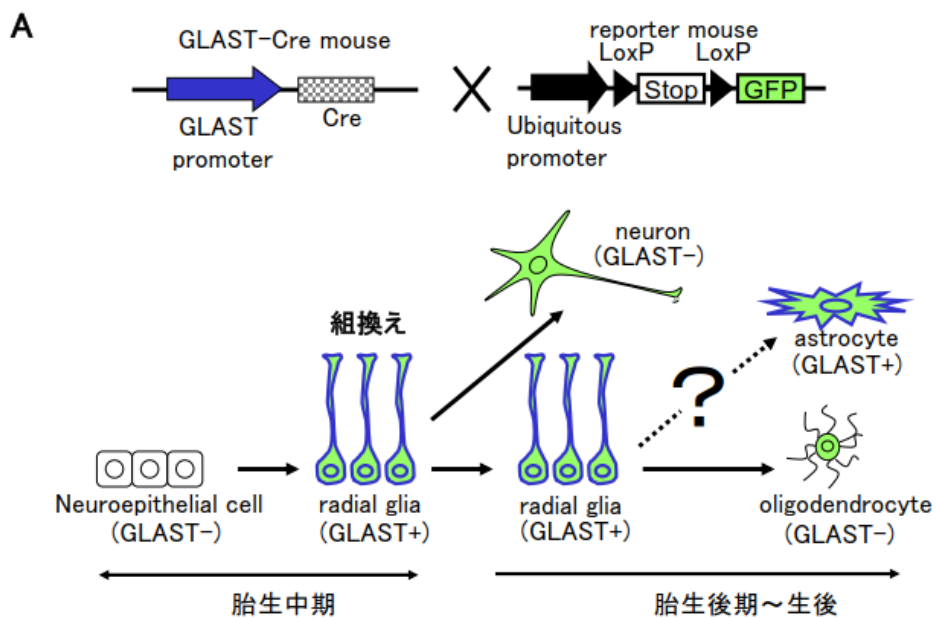


図 7

