

実験動物としてのマウスにおける遺伝子解析

新海雄介

はじめに

動物実験とは実験動物を用いて、倫理的かつ科学的に行われる実験のことである。動物実験の利点としては、単純かつ再現性のある実験系を組みやすいといった科学的な点、また、生命の危険や苦痛を伴う人体実験を避けるという人道上、倫理上の点が存在する。多くの実験動物が使われているのは病気や怪我の新しい治療法を開発し、病気を予防する方法を発見することを目的とした実験である。次に多くの実験動物が使われているのは、基礎的な生理学研究と医学研究である。そのほかに、家庭用品、農薬および工業製品などの非医療用製品の安全性試験、新しい診断法の研究開発などにも実験動物が使われている。

動物実験においては、様々な手段を用いて健康な動物を病的状態に作り上げて実験に用いる方法とともに、自然に現れた病気を有する動物を用いる方法がある。自然発症のモデル動物の例として、先天性に胸腺を欠いているヌードマウスが挙げられる。ヌードマウスでは、B細胞機能こそ正常だが、T細胞による免疫機能は欠如し、マクロファージ、NK細胞は機能亢進している。これらは人の疾患のモデルとして研究され、先天性胸腺欠損症、T細胞機能不全症のモデル動物として利用される他、免疫学・腫瘍学・内分泌学の研究に利用されてきた。また、高血圧自然発症ラットは、ウイスターラットから見つめられた高血圧のラットから選抜育種することによって作製され、脳卒中や脳出血・脳梗塞を高頻度で発症し、心筋梗塞、繊維症、小細動脈の肥厚・壊死、交感神経系・神経分泌系の機能亢進が多く見られる。このラットには、複数の遺伝子が関与しているものと推察されているが、ヒトの高血圧や血管系疾患のすぐれたモデルとして利用されている。以上のような疾患モデル動物を研究することは、人の疾患の原因、発病機構、治療、予防の究明にとって非常に重要である。

マウスはラットとともに動物実験に使われているすべての動物の96%を占めており、動物実験のためだけに繁殖されている。サル類、イヌ、ネコは0.25%以下で、残りはウサギ、モルモット、ヒツジ、ブタ、魚および昆虫などである。とくにマウスは1世代時間が約9週と哺乳類のなかでも短いこと、遺伝子改変が可能なことから哺乳類を代表するモデル生物として遺伝子機能解析に使われてきた。また、同じ哺乳類であるヒトの病態モデル動物としても、ラットとならび利用されてきた。さらに現在、マウスではヒトとともに全ゲノム配列の解読が終了しているため、今後は配列情報を利用して、迅速に未知遺伝子の機能解析を行い、生命現象の解明や疾病治療へ応用することが大きく期待されている。

現在の遺伝子解析

1980年代より開始されたヒトの全ゲノム解読計画により、ヒトゲノムには少なくとも3万2千の遺伝子が存在することが示され¹⁾、遺伝病や遺伝性疾患の原因となる遺伝子の異常が明らかとなってきた。現在その遺伝子の変異により疾患が発生することが証明された遺伝子は、単一遺伝子疾患の原因遺伝子を主として、いまだ1250程度であるが、これらのデータは診断や治療、遺伝子研究のために必須のものとなっている。

突然変異により表れた表現型から、古典的メンデル遺伝学に基づいた解析により遺伝子を同定することは遺伝学の基本的手法である。これをForward geneticsと呼んでいる。特定の形質とその原因遺伝子の間の連鎖をもとに、原因遺伝子の染色体上の位置を特定する連鎖解析、そして染色体上の位置情報をもとに、

目的の領域をクローニングして遺伝子の解析を行うポジショナルクローニングなどがこれにあたる。一方、遺伝子工学や細胞工学の進歩に伴い、遺伝子を直接操作することができるようになり、遺伝子の働きや発現を変化させて表現型への影響を見ようとするいわゆる Reverse Genetics と呼ばれる手法が盛んに用いられるようになった。ジーンターゲットングやアンチセンス DNA 法などがこれに当たる。

遺伝子構造解析

連鎖解析は古典的な Forward genetics の手法であり、特定形質とその原因遺伝子との間の連鎖を元に、原因遺伝子の染色体上の位置を特定する。そのため、より詳細な結果を得るためには、より多数の遺伝子マーカー、あるいはより多数の個体が必要であった。近年では、マイクロサテライトマーカーなどの DNA 多型マーカーが多数マッピング（マウスで約 8000 のマーカーがマッピングされている）され、詳細な連鎖解析が可能となっている。さらに、系統間多型等のデータベースの充実により、亜種間交配を利用することで、多くのマーカーを使用することが可能となり、連鎖解析がより利用しやすくなっている。

Forward Genetics を使ったもう一つのアプローチは、既存の系統を使った QTL (Quantitative trait locus) 解析である。QTL 解析は、量的形質に関連する複数の遺伝子座をマッピングする方法として新しく登場した。一般に、行動などの形質は複数の遺伝子が関与する量的形質としてとらえられるが、従来は、このような複数の遺伝子が関与する形質を遺伝子レベルで解析することが困難であった。しかし、最近の分子遺伝学的技術の向上に伴い、高密度な遺伝子地図が作出されたことやデータ処理における統計方法の改良などにより、マウスで QTL 解析を行うことが可能となった。

最終的に特定形質の原因遺伝子が判明すれば、その遺伝子の塩基配列を確認し、詳細な遺伝子構造解析を行う。そのために、遺伝子の位置情報からクローニングを行うポジショナルクローニングという方法がとられた。現在マウスにおいては、多くの遺伝子が染色体上にマッピングされているため、原因遺伝子の領域を狭め、原因遺伝子を決定することが容易になりつつある。さらに、より研究の進んでいるヒトゲノムとの比較により、遺伝子の存在を推測することが可能である。また、ゲノム中のほとんどの塩基配列が判明しているため、塩基配列に何らかの構造異常が存在すれば比較することが可能となっている^{2, 3)}。

遺伝子発現解析

このような方法により、特定形質の原因遺伝子が判明すると、その遺伝子の発現解析を行うこととなる。発現を確認するだけならば RT-PCR 法や、ノーザンブロット解析が可能であるが、発現量の変化、比較には向かない。そこでリアルタイム PCR、マイクロアレイ解析 (DNA チップ) などが用いられることとなる。

リアルタイム PCR は、サーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した装置を用いて、PCR 法による増幅産物の生成過程をリアルタイムでモニタリングし、解析を行う⁴⁾。この方法では電気泳動が不要となり、増幅が指数関数的に起こる領域で PCR 産物を正確に定量できるという利点がある。これを total RNA や mRNA を逆転写し cDNA を合成した後、PCR で目的の cDNA 領域を増幅する QRT (Quantitative Reverse Transcription)-PCR が、RNA 発現解析の主な手法となっている。

これに対し、マイクロアレイ解析は、細胞あるいは組織における全遺伝子の発現パターンを網羅的に把握する手法として考えられた。遺伝子の発現パターンは、細胞や組織の種類によって異なるだけでなく、細胞の置かれた環境条件である周囲の刺激や時間の経過によっても大きく変動する。個々の遺伝子の発現データの蓄積により、生命現象の多くは様々な遺伝子が複雑に関係して起こっていることが明らかとなっている。そのため、ノーザンブロット法やリアルタイム PCR 法だけでは包括的な遺伝子発現解析が困難であった。マイクロアレイ解析では、スライドガラス上に数千から数万の DNA プローブがスポットされており、そこに RNA をハイブリダイズさせることで細胞や組織における遺伝子発現量の変化を解析する⁵⁾。

遺伝子機能解析

以上の解析より得られる情報は、遺伝子の機能を推測する重要な証拠ではあるが、その機能を本当に確定するにはやはりその遺伝子の導入・破壊されたマウスを作製し解析することが重要となる。マウスにおける遺伝子組換え技術の始まりは、外来遺伝子の導入および発現によるトランスジェニックマウス作製（図1）である。マウスの形質転換は、受精卵の雄性前核へDNA断片をマイクロインジェクションすることで行われる。導入するDNA断片には、発現プロモーター、cDNA、ポリ(A)付加シグナルが含まれ、これにより、数コピーから数十コピー、の導入遺伝子が直列に並んだトランスジェニックマウスが作製される。トランスジェニックマウスでは通常、内在遺伝子よりも、過剰に発現した導入遺伝子の影響を解析できる。また、発現プロモーターを選択することにより、導入遺伝子の発現部位、発現時期を任意に調節

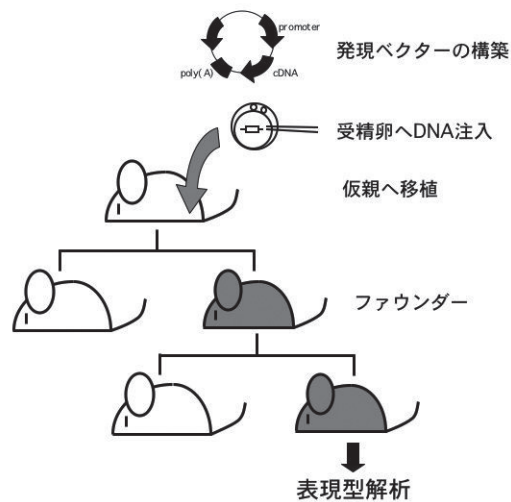


図1 トランスジェニックマウス作製

トランスジェニックマウス作製では、発現させたい場所・時期特異的な活性を有するプロモーターを目的遺伝子とつないだ発現ベクターを作製する。作製したDNAを受精卵に注入し、第一世代のファウンダーを得る。ファウンダーを野生型マウスと交配させ、次世代より発現パターンや表現型を解析する。

することが可能である。

一方、Reverse Geneticsの手法による遺伝子解析として、特定の遺伝子を欠損したマウスがどのような表現型を示すか解析を行う。これまで様々な手法により遺伝子破壊マウスが作製されてきた。代表的な手法として、胚性幹細胞（ES細胞；embryonic stem cell）を用いた相同組換えによる遺伝子ノックアウト法（図2）があげられる。ES細胞は全能性を有しており、生殖細胞を含むあらゆる細胞へ分化することが可能である。まず、ES細胞に遺伝子組換え用プラスミドを導入することで、標的遺伝子を組換えたES細胞を得るジーンターゲティングを行う。遺伝子組換えを起こしたES細胞を胚盤胞へ戻すことで、正常細胞とES細胞由来変異細胞との混合したキメラマウスが作製される。ES細胞由来の生殖細胞を持つキメラマウスを野生型マウスと交配することで、変異遺伝子をヘテロに持つマウスが得られる。次にこのヘテロマウスどうしを交配させることにより、変異遺伝子をホモに持つマウスが得られ、標的遺伝子の欠損による影響を解析できる。

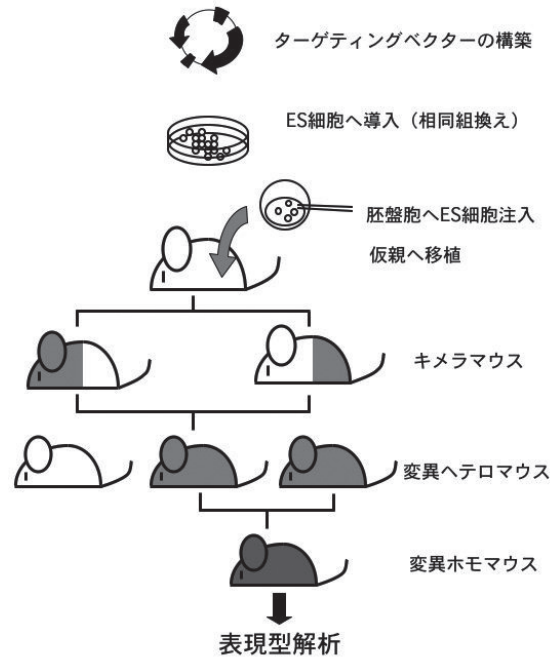


図2 ノックアウトマウス作製

ノックアウトマウス作製では、目的遺伝子を改変するターゲティングベクターを作製する。ターゲティングベクターをES細胞へエレクトロポレーションにより導入し、相同組換えを起こしたES細胞を得る。得られたES細胞を胚盤胞へ移植し、最終的にES細胞と正常細胞のキメラマウスを得る。キメラマウスの内、生殖細胞にES細胞が寄与しているものを選抜し（変異ヘテロマウス）、兄妹交配により変異ホモマウスを得る。その後表現型の解析に移る。

このようなジーンターゲティングによる遺伝子組換えでは、通常、蛋白質の開始コドンや機能的に重要なドメインを欠損させることで、遺伝子の機能を完全に欠損させる。しかし、発生に必須の遺伝子を破壊した場合、マウスは生まれることなく、成体における遺伝子機能解析が不可能となる。このような問題を解決する方法として、Cre-*loxP* システム（図3）が用いられている。Cre 酵素は *loxP* と呼ばれる 34bp の配列を認識し、2つの *loxP* に挟まれた領域を切り出す反応を触媒する。これを利用し、標的遺伝子のエクソン、あるいは重要なドメインを *loxP* 配列で挟む形でジーンターゲティングを行い、組織特異的 Cre 発現マウスと交配することで、胎生致死を回避し、成体の特定組織や細胞でのみ標的遺伝子を欠損したマウスを作製し、その表現型の解析が可能となる。

しかしながら、このようなノックアウトマウスの作製法には、膨大なコスト、時間、労力が必要となる。ゲノム中に存在する約 30'000 もの遺伝子を個々にノックアウトすることは現実的ではない。そこで、ランダムかつ大規模な突然変異マウス作製系を構築し、ゲノム全体の機能解明やヒト疾患モデルマウス作製を網羅的に行う計画が立ち上がっている。この変異体作製のため、アルキル化剤である ENU (N-ethyl-N-nitrosourea) が用いられた。ENU を雄マウス腹腔内に投与し、変異を有する精子を産生させる。このマウスを正常雌と交配することで、変異をヘテロで有するマウスを作製する。この時点で表現型に異常が現れる優性変異の起こったマウスのスクリーニングを行う。次にヘテロマウス同士の交配により変異をホモで有する個体を作製し、同様に劣性変異のスクリーニングを行う。ENU を用いた変異誘発法は、変異導入率が高く、1 遺伝子あたり 1/1000 の頻度で変異が入る。変異マウスを得た後は、詳細な表現型の解析と原因遺伝子の同定を行わなくてはならない。これには前述した連鎖解析などが必要であり、大きな労力を必

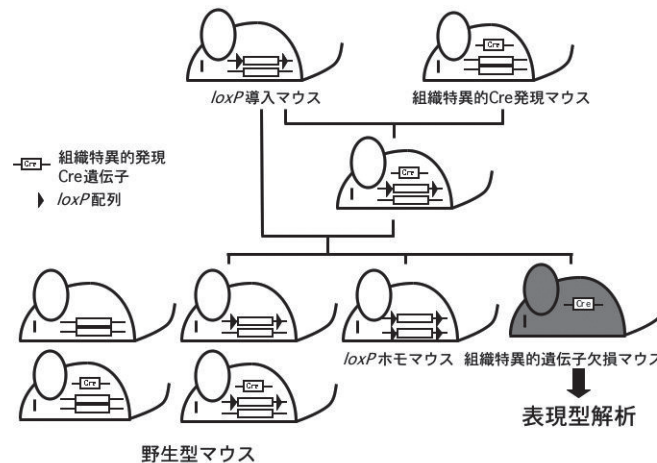


図3 Cre-*loxP* システムを用いたコンディショナルターゲティング

組織特異的 Cre 発現マウスはトランスジェニックマウス作製により、標的遺伝子を *loxP* で挟んだマウスは ES 細胞を用いたジーンターゲティングによりそれぞれ作製しておく。両者を交配させることで Cre を発現し、*loxP* ヘテロの遺伝子型のマウスを得る。次の交配で様々な遺伝子型のマウスを得ることができ、1/8 の確率で Cre 発現組織特異的に標的遺伝子を欠損したマウスが得られる。これを野生型マウス、*loxP* ホモマウスをコントロールとして表現型の解析を行う。

要とすることとなる。だがしかし、ENU は塩基置換による点突然変異を誘発するため、変異が多様であり、遺伝子の機能欠損から、機能減弱、あるいは機能亢進まで様々な変異体を得られる⁶⁾。これらのマウスは、同様に塩基置換による機能低下が原因と考えられるヒト遺伝性疾患に対する重要なモデルとなりうる。

これに対し、ある決まった配列をゲノム中にランダムに挿入することで不特定遺伝子を不活性化し、変異体を作製する方法がある。この手法では、挿入ベクターとして、プラスミド、レトロウイルス、トランスポゾンなどが用いられる。このとき、内在性遺伝子に挿入ベクターが組み込まれるとベクター内レポーター遺伝子が発現するようにすることで、変異クローンの同定が容易となる。この方法では、点突然変異のような小さな変異には向かないが、変異遺伝子の特定は容易となる。

さらに近年においては、RNAi (RNA interference) による遺伝子組換えマウスの作製が行われている。RNAi とは、導入した 2 本鎖 RNA と同一配列を有する mRNA が特異的に分解され、遺伝子発現が抑制される現象であり、当初線虫において確認された⁷⁾。後に、約 20bp の小さな 2 本鎖 RNA (siRNA ; small interfering RNA) によって哺乳類細胞でも RNAi が可能であることが判明している^{8, 9)}。この siRNA はプラスミドベクターからの発現が可能であり、ノックアウトマウス作製よりさらに簡単にかつ迅速に個体レベルの遺伝子機能解析が可能となりつつある。現時点では、標的配列の決定に試行錯誤する段階ではあるが、今後の発展により、遺伝子機能解析に非常に有用となると考えられている。

マウスを用いた遺伝子解析の意義

自然発症の突然変異を持つ動物は相当数存在するが、そのなかで自然発症ヒト疾患モデル動物として確定しているものはそう多くはない。ヒトの疾患の大多数を占めるのは、単一遺伝子によるものではなく多因子遺伝子疾患である糖尿病、高血圧、喘息、癌等である。一方、単一遺伝子性疾患では患者の数は少ないものの、ヒト単一遺伝子性疾患の種類そのものは 3,000 種を越えると言われている。またそれらの多くはまだ原因遺伝子が不明である。その意味において突然変異動物の病態と遺伝的要因を解明するため、疾患モデル動物として確立することで、これらの動物の果たす役割は大きいといえる。また、遺伝子組換え

を行うことで、様々な遺伝子の機能を解析し、生命現象の解明に大いに貢献するであろうことは疑いようがない。

その上、マウスは高等動物のうち、遺伝学的研究が最も進んでいる。マウスにはさまざまな遺伝特性を持つ近交系やミュータント系が多数存在し、長年の遺伝学的データの蓄積に加え、取り扱い易さや比較的世代交代が早いことなどから、遺伝解析に最も適した哺乳動物として利用されている。特に最近では、マイクロサテライトなど DNA 多型マーカーが充実するなど連鎖解析技術の進歩に加え、YAC ライブラリーなどの開発による物理的地図作成技術の進歩、さらに、長年に渡る膨大な遺伝学データが蓄積し、インターネットを介して瞬時にデータ検索できる情報科学の進歩などにより、ますますマウスの重要性が増してきている。現在では、ヒト、マウスをはじめ多くの生物の全ゲノム配列が次々と解読されているため¹⁰⁾、今後は配列情報を利用することで、未知の遺伝子の機能解析が迅速に行われ、疾患研究や生命活動研究へと応用されていくであろう。

参考文献

1. International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001 Feb 15;409 (6822) :860-921.
2. Gregory SG, Sekhon M, Schein J, Zhao S, Osoegawa K, Scott CE, Evans RS, BurrIDGE PW, Cox TV, Fox CA, Hutton RD, Mullenger IR, Phillips KJ, Smith J, Stalker J, Threadgold GJ, Birney E, Wylie K, Chinwalla A, Wallis J, Hillier L, Carter J, Gaige T, Jaeger S, Kremitzki C, Layman D, Maas J, McGrane R, Mead K, Walker R, Jones S, Smith M, Asano J, Bosdet I, Chan S, Chittaranjan S, Chiu R, Fjell C, Fuhrmann D, Girn N, Gray C, Guin R, Hsiao L, Krzywinski M, Kutsche R, Lee SS, Mathewson C, McLeavy C, Messervier S, Ness S, Pandoh P, Prabhu AL, Saeedi P, Smailus D, Spence L, Stott J, Taylor S, Terpstra W, Tsai M, Vardy J, Wye N, Yang G, Shatsman S, Ayodeji B, Geer K, Tsegaye G, Shvartsbeyn A, Gebregeorgis E, Krol M, Russell D, Overton L, Malek JA, Holmes M, Heaney M, Shetty J, Feldblyum T, Nierman WC, Catanese JJ, Hubbard T, Waterston RH, Rogers J, de Jong PJ, Fraser CM, Marra M, McPherson JD, Bentley DR. A physical map of the mouse genome. *Nature*. 2002 Aug 15;418 (6899) :743-50. Epub 2002 Aug 04.
3. FANTOM Consortium; RIKEN Genome Exploration Research Group Phase I & II Team. Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature*. 2002 Dec 5;420 (6915) :563-73.
4. Freeman WM, Walker SJ, Vrana KE. Quantitative RT-PCR: pitfalls and potential. *Biotechniques*. 1999 Jan;26 (1) :112-22, 124-5.
5. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995 Oct 20;270 (5235) :467-70.
6. Justice MJ, Noveroske JK, Weber JS, Zheng B, Bradley A. Mouse ENU mutagenesis. *Hum Mol Genet*. 1999;8 (10) :1955-63.
7. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391 (6669) :806-11.
8. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001 May 24;411 (6836) :494-8.

-
9. Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, Okabe M. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett.* 2002 Dec 4;532 (1-2) :227-30.
 10. Mouse Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature.* 2002 Dec 5;420 (6915) :520-62.

英文要旨

Genetic analysis in a mouse as an laboratory animal.

Yusuke Shinkai

The mouse is the most useful and widely used experimental animal in biomedical research, teaching, and testing. The remarkable genetic similarity of mice to humans, combined with great convenience, perhaps accounts for mice so often being the experimental model of choice in research. About a research of mice, there is accumulation of enormous data such as gene marker, genome sequence and EST. Gene targeting has enabled researchers to generate mouse strains with defined mutations in their genome allowing the analysis of gene function in vivo. This review presents the essential tools and methodologies used for genetic analysis that have been developed over the past decade.

Department of Genetic engineering, Kinki University, Uchita, Wakayama, 649-6493, Japan.
Institute of Advanced Technology, Kinki University, Kainan, Wakayama, 642-0017, Japan.