

## 経精巣遺伝子導入法により得られたトランス ジェニックマウスの解析

松本和也、細井美彦、豊川弘治、中上佳世子  
宮本裕史、佐伯和弘、入谷明

### 要 約

微小ガラス針を使って受精卵前核に遺伝子溶液を注入する顕微注入法に代わる簡便なトランスジェニックマウスの作製方法を検討するために、外来遺伝子を雄マウスの精巣に直接注入して雌マウスと交配させることによって、トランスジェニックマウスを作製することを検討した。DNA/リボソーム複合体を4匹の雄マウスの精巣に直接注入したのち静置させ、1週間後に雌マウスと交配させたところ、計38匹の産子を獲得した。離乳後各マウスの尾部組織より抽出したゲノムDNAを使ったサザンブロット解析の結果、5匹のマウスに導入遺伝子の組込みが認められた。そのうち、次世代へ導入遺伝子の伝達が認められたトランスジェニックマウスは、2匹であった。また、トランスジェニックマウスのゲノムDNAから導入遺伝子と考えられる遺伝子断片の一部を増幅し、ダイレクトシーケンスでその塩基配列を決定したところ、導入遺伝子がマウス染色体へ組込まれていることが確認された。以上の結果より、経精巣遺伝子導入法によるトランスジェニックマウスの作製の可能性が示唆された。しかし、精巣に導入されたDNAと精子の結合様式、また卵子と受精後の染色体への組込み機序については未だ不明な点が多く、今後さらに検討が必要と考えられた。

### 緒 論

生殖生理学的な基礎的知見の蓄積に伴って、体外受精、受精卵の体外培養、胚の顕微操作などの生殖工学や発生工学的技術がマウスにおいてほぼ確立され、遺伝子導入マウス（トランスジェニックマウス）と遺伝子破壊マウス（ノックアウトマウス）が作製されるようになった。特に、過剰発現によって遺伝子の生体機能を解析するトランスジェニックマウスを使った実験系が確立されたことにより、広範囲に遺伝子機能、更に細胞や組織の機能を検討がなされ多くの知見が得られるようになった。現在まで、トランスジェニックマウスの作製方法は、微小ガラス針を使って受精卵前核に遺伝子溶液を注入するマイクロインジェクション法が一貫して採用されている。1989年、Lavitranoらが精子を介したトランスジェニックマウスを作製する簡便な方法を報告した<sup>(1)</sup>。この方法は、精子懸濁液にDNAを添加して15~30分間処理後体外受精に供試させ、得られた受精卵を移植して産子を得るものであった。しかし、多くの研究機関・研究者によって追試が行われたものの再現性が明確に示されることはなかった<sup>(2)</sup>。一方で、この報告以来、マイクロインジェクション法による作製効率に限界があるとの理由から、精子を介してトランスジェニック動物を作製する研究が進められた。これまで、精子には外来性DNAを結合する能力があることが示唆されており<sup>(3)</sup>、精子側のDNA結合分子の探索もされている<sup>(4,5)</sup>。さらに、精子にDNAの取り込み率を向上させるため、エレクトロポレーション<sup>(6)</sup>あるいはリボソーム<sup>(7)</sup>を利用する方法も試みられた。最近では、精巣へDNAを直接注入して個体へ遺伝子導入をする方法<sup>(8,9)</sup>あるいは精細管にDNAを直接注入する方法も<sup>(10)</sup>試みられている。あるいは、このDNA/リボソーム複合体をマウス精巣に注入して精子にDNAを取り込ませる方法は、より簡便なトランスジェニックマウス作製の方法として期待されてる。本実験では、DNA/リボソーム複合体をマウス雄個体の精巣に直接注入したのち、雌マウスと交配することによって産子を獲得し、個体への遺伝子導入を試みた。

## 材料及び方法

### 1. 導入用遺伝子断片の調製

導入用遺伝子には、塩化セシウム密度勾配法により精製した pBluescript II KS+ を制限酵素 EcoRI で完全消化により直鎖化した遺伝子断片を用いた。得られた遺伝子断片については、まず TE 溶液で濃度  $300 \mu\text{g/ml}$  になるように希釈し、さらに Lipofect Amine 試薬 (GIBOCO BRL) と等量混合することで最終濃度  $150 \mu\text{g/ml}$  に調製した。室温で30分間静置し、DNA/リボソーム複合体を形成させてから遺伝子導入に供した。

### 2. 経精巣遺伝子導入によるトランスジェニックマウスの作製

#### (1) 精巣への遺伝子導入と交配による産子の獲得

動物には、C57BL/6N系あるいはICR系マウスを使用した。成熟雄マウスを麻酔下で開腹し、導入遺伝子を含むDNA/リボソーム複合体を両側の精巣に  $20 \mu\text{l}$  ずつ注入した。処置後1週間目に、凌駕回復した雄マウスを発情前期の雌マウスと同居・交配させた。膣栓によって交配を確認した雌マウスについては、順次分娩させた。

#### (2) サザンブロット解析

生後3週間目のマウスから、尾部の先端部分約1cmを麻酔下で切断・採取した。尾部の細胞よりゲノムDNAを抽出・精製した後、以下に示すようにサザンブロット解析を行った。まず、制限酵素 PvuII によって完全消化させた  $10 \mu\text{g}$  ゲノムDNAを1%アガロースゲル電気泳動により分離した後、常法に従ってゲルを変性・中和しナイロンフィルター (Hybond-N<sup>+</sup>、アマシャム) にDNAを転写した。次に、pBluescript II KS+ を PvuII 消化した遺伝子断片 (0.46kbp) をプローブとして、ECL detection system (アマシャム) によってフィルター・ハイブリダーゼーションを行った。また、染色体に導入遺伝子の組込みが認められた個体については、順次交配を次世代への導入遺伝子の伝達を確認した。

### 3. 染色体に組込まれた遺伝子の部分塩基配列の決定

サザンブロット解析によって、トランスジェニックマウスと認められた個体において、導入遺伝子の組込みを更に確認するために、その部分塩基配列を決定した。まず、各トランスジェニックマウスの尾部組織から抽出したゲノムDNA  $1 \mu\text{g}$  を鋳型に pBluescript II KS+ のマルチクローニングサイトを含む遺伝子断片 (244bps) を M13/RV primer (5'-GGAAACAGCTATGACCATG-3') 及び M13/M4 primer (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') を使って PCR (熱変性:  $94^{\circ}\text{C}$ 、最初5分間で以降1分間、アニーリング:  $55^{\circ}\text{C}$ 、1分間、合成反応:  $72^{\circ}\text{C}$ 、1分間を35サイクル繰り返す) によって増幅させた。次に、得られた増幅産物から余分な primer を除去し、その  $2 \mu\text{l}$  を鋳型として BigDye Primer Cycle Sequencing Kit (アプライドバイオシステム) および ABI PRISM™ 377 及び 310 (アプライドバイオシステム) を使ってダイレクトシーケンスを行った。

## 結 果

経精巣遺伝子導入法により得られたトランスジェニックマウスの作製効率の結果を、表1に示す。DNA/リボソーム複合体を4匹の雄マウスの精巣に直接注入したのち静置させ、1週間後に雌マウスと交配させたところ、4匹の雌マウスより計38匹の胎子が得られた。分娩3週目の離乳期まで全てのマウスが発育し、その尾部組織より抽出したゲノムDNAを使ったサザンブロット解析をしたところ、5匹 (13%) のマウスに導入遺伝子が染色体上に組込まれていることが確認された (表1)。

Table 1. Production of transgenic mice produced by direct injection of foreign DNA/liposome complex into mouse testes.

Exp. No.	No. of offspring	No. (%) of transgenic mice
1	11	0 (0)
2	7	2 (29) [2-2, 2-7 lines]
3	13	1 (8) [3-10 line]
4	7	2 (29) [4-3, 4-4 lines]

得られた5匹のトランスジェニックマウスにおいて、順次子孫を産出させてサザンブロット解析によって次世代へ導入遺伝子の伝達を調べた(表2)。5匹のトランスジェニックマウスのうち、子孫(F1)への導入遺伝子の伝達が認められたのは2匹(3-10系統、4-4系統)であった(図1)。3-10系統においてF1のトランスジェニックマウスをつかって、そのゲノムDNAから導入遺伝子と考えられる pBluescript II KS+のマルチクローニングサイトを含有する遺伝子断片(244bps)の一部を増幅し、ダイレクトシーケンスでその塩基配列を決定したところ、導入遺伝子であることが確認された(data not shown)。また、その結果から制限酵素 EcoRI が認められ、導入遺伝子は head-tail でタンデムに結合していることが明らかになった。

Table 2. Transmission of transgene to F1 generation in transgenic mice produced by direct injection of foreign DNA/liposome complex into mouse testes.

Transgenic mouse line	No. of F1 offspring	No. (%) of transgenic mice
2-2	12	0 (0)
2-7	11	0 (0)
3-10	13	3 (25)
4-3	10	0 (0)
4-4	7	1 (16)

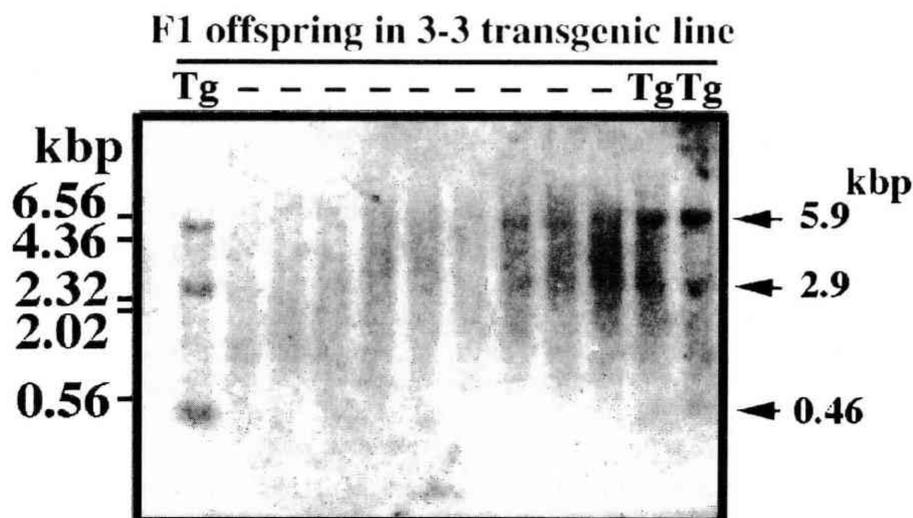


Fig. 1. Southern blot analysis of F1 offspring of transgenic founder (3-3 line). The bands (arrow) denote integration of the transgene. Tg and - indicate transgenic and nontransgenic mice, respectively.

## 考 察

マウスにおいて、トランスジェニック動物を得るためにはマウス受精卵の前核へDNAを顕微注入する方法が最も広く利用されている。しかし、この方法では遺伝子注入した受精卵あたりの遺伝子導入動物産生効率が2%前後と低く<sup>10)</sup>、その技術の習得にも時間を要することが知られている。最近、レポーター遺伝子である大腸菌由来の $\beta$ -ガラクトシダーゼ遺伝子を含む外来性DNAをリポソーム複合体としてマウス精巣に注入し、その雄マウスを雌と交配した結果、体内受精した卵子の80%にガラクトシダーゼ活性が認められたことが示された<sup>11)</sup>。これは、精巣へ直接DNAを注入することによって個体へ遺伝子を導入する実験系の可能性を示唆するものであった。本実験において、ほぼ同様な経精巣遺伝子導入法によって、得られた産子の13%がトランスジェニックマウスであることが示された。この結果より、経精巣遺伝子導入法によるトランスジェニックマウスを作製できる可能性が示唆された。しかし、導入遺伝子の子孫への伝達率が40% (2/5) であり、顕微注入法におけるそれがほぼ100%であることから(K. Matsumoto et al., unpublished data)、この値は低いことが明らかになった。このことは、60% (3/5) のトランスジェニックマウスでは、導入遺伝子はモザイク状にホストゲノムに組み込まれたことを示している。これらの結果から、経精巣遺伝子導入法ではホストゲノムへの遺伝子の組み込みが必ずしも受精後すぐに行われず、胚の発生段階がある程度進んだ時期においても起こることを示唆された。

今後、fluorescence in situ hybridization (FISH) を使ったトランスジェニックマウスの染色体における導入遺伝子の局在の確認、レポーター遺伝子を経精巣遺伝子導入をすることによる発現解析、さらに、精巣に注入されたDNAがリポソームを介してどのように精子表面の結合するのかの検討、また卵子と受精後の染色体への組み込み機序については未だ不明な点が多く、経精巣遺伝子導入法によるトランスジェニック動物の作製方法はさらに検討が必要と考えられた。

## 文 献

1. Lavitrano, M., Camaioni, A., Fazio, V. M., Dolci, S., Farace, M. G., and Spadafora, C. (1989) Sperm cells as vectors for introducing foreign DNA into eggs: Genetic transformation of mice. *Cell* 57, 717-723.
2. Brinster, R. N., Sangren, E. P., Behringer, R. R., and Plamiter, R. D. (1989) No simple solution for making transgenic mice. *Cell* 59, 239-240.
3. Horan, R., Powell, R., McQuaid, S., Gannon, F., and Hoghton, J. A. (1991) Association of foreign DNA with porcine spermatozoa. *Arch. Androl.* 26, 83-92.
4. Wu, G. M., Nose, K., Mori, E., Mori, T. (1990) Binding of foreign DNA to mouse sperm mediated by its MHC class II structure. *Am. J. Reprod. Immunol.* 24, 120-126.
5. Zani, M., Lavitrano, M., French, D., Lulli, V., Maione, B., Sperandio, S., and Spadafora, C. (1995) The mechanism of binding of exogenous DNA to sperm cells: factors controlling the DNA uptake. *Exp. Cell. Res.* 217, 57-64.
6. Gagne, M. B., Pothier, F., and Sirard, M. A. (1991) Electroporation of bovine spermatozoa to carry foreign DNA in oocytes. *Mol. Reprod. Dev.* 29, 6-15.
7. Bachiller, D., Schellander, K., Peli, J., and Ruther, U. (1991) Liposome-mediated DNA uptake by sperm cells. *Mol. Reprod. Dev.* 30, 194-200.
8. Ogawa, S., Hayashi, K., Tada, N., Sato, M., Kurihara, T., and Iwaya, M. (1995) Gene expression of blastocysts following direct injection of DNA into testis. *J. Reprod. Dev.* 41, 379-382.
9. Sato, M., Iwase, T., Kasai, K., and Tada, N. (1994) Direct injection of foreign DNA into mouse testis as a possible alternative of sperm-mediated gene transfer. *Animal Biochem.* 5, 19-31.
10. Huguet, E and Esponda, P (1998) Foreign DNA introduced into the vas deferens is gained by mammalian spermatozoa. *Mol. Reprod. Dev.* 51, 42-52.
11. Wall, R. J. (1996) Transgenic livestock: Progress and prospects for the future. *Theriogenology* 45, 57-68.

## 英文要旨

## Analysis of transgenic mice produced by testis-mediated gene transfer

K. Matsumoto, Y. Hosoi, K. Toyokawa, K. Nakagami,

H. Miyamoto, K. Saeki, and A. Iritani

## Abstract

DNA transfer mediated by sperm has the potential to simplify the production of transgenic animals, but the possibility in mice has been controversial. On the other hand, the ability of animal spermatozoa to capture foreign DNA has been suggested. In this study, we investigated the feasibility to produce transgenic mice by direct injection of foreign DNA in mouse testis. DNA/liposome complex was injected through a needle into testes bilateral testis of four mature mice. After all males were mated with female mice, 38 pups were delivered. In Southern blot analysis and direct sequencing, the foreign DNA was shown to be integrated in host genome of five mice (13%). However, only two transgenic mice exhibited the transmission of transgene to next generation. Thus, direct introduction of exogenous DNA/liposome complex into the testis will provide a simple method in generation of transgenic mice, and further investigations are also necessary to determine molecular mechanisms based on the uptake of foreign DNA by sperm.