

遺伝子改変マウス作成について

ウイルス・再生医科学研究所附属感染症モデル研究センター 宮地 均

0. はじめに

現代の医学や生命科学の研究において、遺伝子改変マウスを使った実験は必要不可欠となっている。この遺伝子改変マウスを効率的に作製し確実に増やす事は、実験の基盤を支える技術として大変重要である。遺伝子改変マウスには、導入した遺伝子を過剰発現させるトランスジェニックマウス (Tg) や、特定の遺伝子を破壊したノックアウトマウス (KO) などがあり、多種多様なマウスが存在する。これらの遺伝子改変マウスの作製方法を紹介するとともに、解析が終了した系統を凍結保存する方法や、新規の遺伝子改変技術であるゲノム編集についても紹介したい。

1. 動物実験と実験動物

動物を利用して情報を得る実験が動物実験である。例えば毒性試験 (安全性試験) や薬理試験が動物実験であり、動物に何らかの処置を加え、その反応を統計学的に比較検討する。これらの動物実験に利用するために合目的に繁殖した動物が実験動物と呼ばれる¹⁾。実験動物は遺伝的、環境的にコントロールされている。代表的な実験動物はマウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル、ゼブラフィッシュ、メダカ、カエル、線虫およびショウジョウバエなどである。なかでもマウスは生産者団体の集計によると、平成 28 年度に 320 万匹が生産されており、多くの動物実験に使われている²⁾。しかしながら、大学や研究機関において使われているマウスの多くは、実験動物生産者 (企業) から購入したマウスではなく、研究者が自ら開発した遺伝子改変マウスである。つまり、研究者が必要とする遺伝子改変マウスを、いかに効率よく作製するかが研究を進める上で非常に重要なポイントになっている。

2. 遺伝子改変マウス

遺伝子を改変した生物を利用した研究は、医学や生命科学にとって今や必須となっている。なかでも哺乳動物の遺伝子を改変した遺伝子改変マウスは、生命現象の解明や病気の原因、治療法を研究するために特に重要である。

Tg マウスは外部から導入した遺伝子を過剰に発現させる事によって、遺伝子機能の解析に用いられる。近年、蛍光色素を発色するタンパク質が数多く利用されており、特定部位や特定時期に発現するプロモーターと組み合わせる事で、組織特異的や時期特異的に狙った色を発現、蓄積させて、遺伝子機能の解析に利用されている。特に有名なマウスは GFP マウスで、このマウスはオワンクラゲの緑色蛍光タンパク質を全身で発現するため、グリーンマウスとも呼ばれている (図 1)。GFP マウス由来の臓器や血液は緑色に光るので、他のマウスに移植する

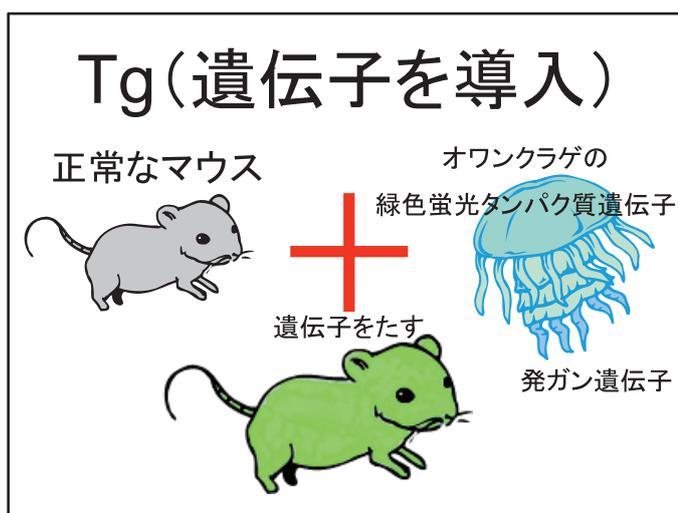


図 1 Tg マウスの作製方法

事により、臓器の生着や血液の分化、移動、消失を観察する事ができる。特定の部位で GFP を発現する Tg マウスを作製すれば、その遺伝子やタンパク機能の解析が可能となる。

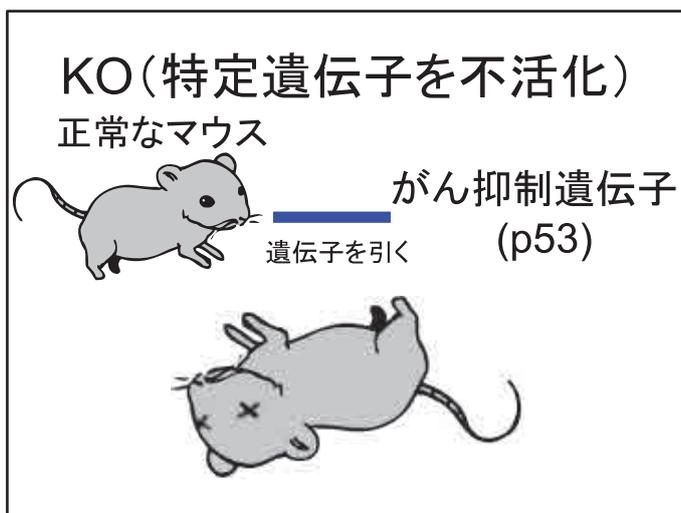


図2 KOマウスの作製方法

3. マウス受精卵の凍結保存

さて、この様に研究者が必要とするマウスの作製を続けると、最終的には遺伝子の数だけマウスの系統が確立されるであろう。遺伝子の数はいくつかの説があるが、マウスで約10万と推定されている。つまり10万系統のマウスが作られた上に、複数のKOマウスを組み合わせる事で、複数の遺伝子が破壊されたマウスが作られる事になる。これらのマウスを、全て生体で維持する事はスペースの問題から不可能である。また、マウスは生物であるため、世代交代を経ることによる遺伝子変異の発生が避けられない³⁾。これらを回避するため受精卵を凍結保存し、必要時に融解して個体に戻す技術の開発が行われ、完全に実用化されている。

マウス受精卵の凍結保存にはいくつかの方法があるが、我々のところで行なっている方法は凍結保護剤にDAP213を用いた簡易ガラス化法である。操作が簡単で凍結・融解成績が安定しており、初心者でも比較的簡単に凍結・融解できる方法である。我々のところでは、昨年度171系統で37,763個の凍結保存を行なった。

DAP213を用いた簡易ガラス化法の具体的な方法は以下の通りである⁴⁾。

- 1) 室温で1M DMSOのドロップをシャーレのフタ等に用意する。
- 2) 1M DMSOのドロップに凍結する受精卵を入れる。
- 3) ピペットマンを5 μ lにセットし1M DMSOと共に受精卵を吸い上げる(図3)。
- 4) 5 μ lの1M DMSOと受精卵を凍結チューブに入れる。
- 5) 0 $^{\circ}$ Cでチューブを5分間保持後、0 $^{\circ}$ CのDAP213を95 μ l添加する。
- 6) 更に5分間0 $^{\circ}$ Cで保持した後、液体窒素に入れ凍結させる(図4)。
- 7) 融解は、先ずチューブのフタを開けて中に入った液体窒素を捨てる。
- 8) 約1分30秒後に37 $^{\circ}$ Cに温めた0.25M Sucroseを900 μ l添加する。
- 9) シャーレのフタ等に融解した溶液を移して受精卵を回収し、KSOM等で洗浄し、移植する。



図3 実体顕微鏡とピペットマン



図4 凍結保存タンク

4. ゲノム編集について

近年、遺伝子改変技術の1つとしてゲノム編集技術が実用化されている。なかでも CRISPR/Cas9 システムはマウス受精卵でゲノム上の標的遺伝子の破壊やレポータ遺伝子のノックインを行う技術として、すでに多くの報告がなされている。原理は PAM 配列と呼ばれる NGG の配列を認識して Cas9 タンパクが上流で DNA を切断し、切断された二本鎖を修復する際に塩基に欠損や挿入が起こり DNA が編集される⁵⁾。この方法を利用することにより ES 細胞によるキメラマウス作製を経ずに KO マウスの作製が可能となった。さらなる発展が予想される技術であり、この技術の新規導入と我々の実績を紹介したい。

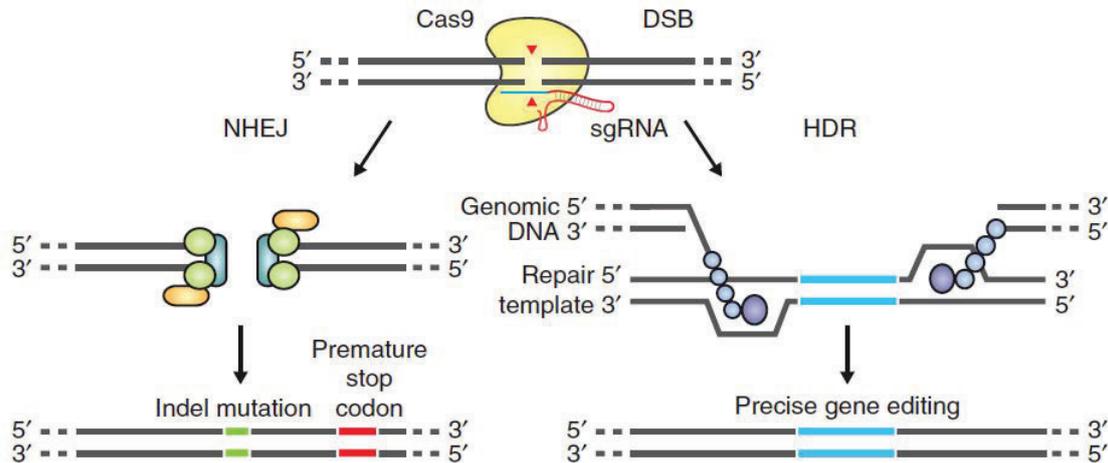


図5 CRISPR/Cas9 システム⁶⁾

NATURE PROTOCOLS | VOL.8 NO.11 | 2013 | 2283

5. おわりに

実験に動物を使う正当性について多くの議論がなされているが、動物の尊い犠牲を通じて行われる動物実験は、生命現象の理解に大きな役割を果たし、医学・医療に応用され、人類の健康と福祉にはかり知れない貢献をしているのは確かである⁷⁾。動物を扱う技術者として、常に研究へ貢献できる様に研鑽を重ね、より良い技術を高い精度で提供し続けて行くことが重要である。

参考文献

- 1) 公益社団法人日本実験動物協会編、実験動物の技術と応用実践編、P2、株式会社アドスリー、平成 16 年
- 2) 実験動物の年間総販売数調査(平成 28 年 4 月～29 年 3 月)公益社団法人日本実験動物協会平成 29 年 9 月
- 3) 遺伝子操作動物の保存と供給及び開発について(報告) (学術審議会学術情報資料分科会学術資料部会)
http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/old_gijyutu/gakujyutu_index/toushin/1314909.htm
2018 年 9 月 10 日アクセス
- 4) Production of chimeric mice from cryopreserved blastocysts. Nakao, K, Nakagata, N, and Katsuki, M. *Exp. Anim.*, 1998, 47, 3, 167-171,
- 5) Martin Jinek, Krzysztof Chylinski, Ines Fonfara, Michael Hauer, Jennifer A. Doudnal and Emmanuelle Charpentier, A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science* 17 Aug 2012: Vol. 337, Issue 6096, pp. 816-821 DOI: 10.1126/science.1225829
- 6) F Ann Ran, Patrick D Hsu, Jason Wright, Vineeta Agarwala, David A Scott and Feng Zhang. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols* volume 8, pages 2281-2308 (2013)
- 7) 動物実験について 日本生理学会 投稿: 2009-06-20 <http://physiology.jp/guidance/4804/>
2018 年 9 月 10 日アクセス

(miyachi.hitoshi.3z@kyoto-u.ac.jp)