

学位論文の内容の要旨

Attempts of gene targeting *in vivo* with mutation-reporter transgenic mice

(突然変異高感度検出用トランスジェニック・マウスを利用した個体での遺伝子ターゲティングの試み)

平成 16 年 12 月博士 (理学) 申請

東京大学大学院理学系研究科
生物化学専攻
井野 麻美

相同組換えによるゲノム情報の書き換え、すなわち遺伝子ターゲティングは、強力な手法として、微生物からほ乳類にいたる遺伝的な解析のために使用されている。特にマウスでは、遺伝子に改変を導入した胚幹細胞を使用して、生殖組織にいたるまで遺伝子改変された成体へと成長させることが可能となっている。もし、*in vivo* における個体の体細胞内での遺伝子ターゲティングが可能となった場合、様々な遺伝子機能の解析だけではなく、遺伝病およびほかの疾病への遺伝子治療のひとつの手段となるだろう。

しかし *in vivo* における遺伝子ターゲティングをおこなうには、二つの大きな障壁がたちはだかる。一つは、遺伝子ターゲティングの頻度が低いことによる、産物の検出と解析の困難さである。このような低頻度の事象を検出するには、高感度かつ、精度の高い実験システムの構築が不可欠となる。*in vivo* における遺伝子改変の検出には、PCR 法が用いられることが多いが、この検出法は不正確で、人為的な産物が生産されやすい。

二つめの問題として、遺伝子ターゲティングによるゲノム情報の改変の不正確さが挙げられる。原核生物や下等な真核生物においては、遺伝子ターゲティングによるゲノムの改変は正確におこなわれる。これとは対照的に、ほ乳類培養細胞では、遺伝子ターゲティングはかなり頻度が低く、正確さに欠ける。それは、ほ乳類の細胞においては、非相同組換えが、相同組換えをはるかに凌ぐ頻度でおこるためである。*in vivo* における遺伝子ターゲティングにおける不正確な遺伝子改変は、遺伝子機能の解析および治療的な目的、両方にとって有害である。

マウス体細胞内における遺伝子改変を、高感度に検出、および解析するために、また、上記のような、PCR 法による検出の潜在的な欠点を排除するために、突然変異体検出用に開発されたレポーター・トランスジェニック・マウス Mutamouse の利用を試みた。この実験システムは、突然変異体頻度の、高感度かつ定量的な検出が可能であることが報告されている。様々な突然変異原、例えば DNA に直接作用する *N*-methyl-*N*-nitrosourea などの暴露による、肝臓を含む様々な器官での、突然変異体頻度の上昇が数多く報告されている。このマウスの染色体上には、野生型 *lacZ* 遺伝子をもつバクテリオファージゲノムが約 40 コピー、タンデムに挿入されている。マウスゲノム DNA の *in vitro* パッケージングによってバクテリオファージ粒子が形成される。*galE* に変異を持つ大腸菌株に phenyl-beta-D-galactoside (p-gal) を含む培地で感染させると、*lacZ* 遺伝子に変異をもつファージが、選択的に増殖しプラークを形成する。これは、p-gal が *lacZ* のコードするペーテラクトシダーゼによって有毒な中間体に変換され、その中間体が *GalE* を欠く菌内で蓄積することによって、細胞死を引き起こすことを利用した選択法である。

正確な遺伝子ターゲティングのためのドナーに関しては、2 種類の方法を使用した。

一つは、特殊なオリゴヌクレオチドである、RNA/DNA オリゴヌクレオチドキメラを使用した。このキメラオリゴを使用して、齧歯類培養細胞、マウスおよびラット個体、さらには植物細胞において、高頻度な遺伝子ターゲティングをおこなったと報告されている。キメラオリゴとポリエチレンイミンの複合体をラットへ尾静脈注射した場合、肝臓における遺伝子ターゲティングの頻度は約 10% と Kren らにより報告されている。しかし、これらの実験系の再現性、及び定量性が問題となっている。*lacZ* の活性中心に点変異を導入するように設計したキメラオリゴを、

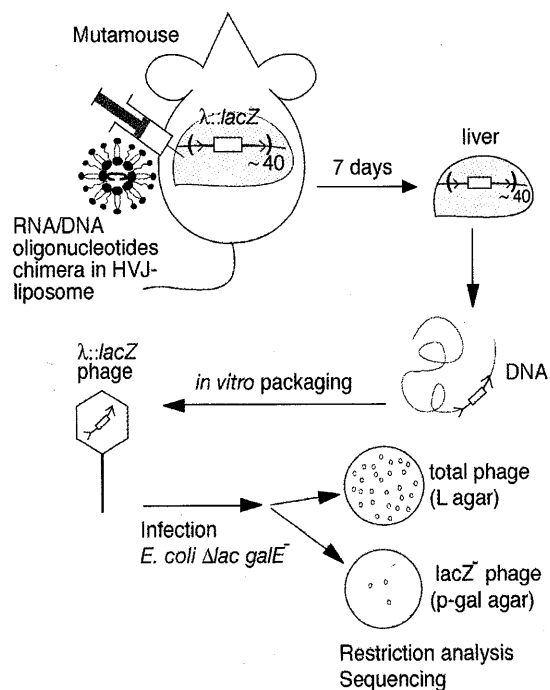


図1. RNA/DNAオリゴヌクレオチドキメラを使用した *in vivo*における遺伝子ターゲティングのための実験手順
RNA/DNAオリゴヌクレオチドキメラを使用した *in vivo*における遺伝子ターゲティングの実験手順と突然変異体レポーターマウスを使用した遺伝子改変の検出法

hemagglutinating virus of Japan (HVJ) のタンパクを含むリポソーム、HVJ-リポソームに封入し肝臓へ直接注入した (図 1)。HVJ-リポソームを利用したトランスフェクションは、高頻度かつ信頼度の高い方法である。

2 つめの方法として、ドナー配列及びその導入方法として、複製能欠損型アデノウイルスベクターを使用した。培養細胞における正確な遺伝子改変は、複製能欠損型アデノウイルスベクターを使用することによって、当研究室の Fujita らによって達成された。In vivo の遺伝子ターゲティングをおこなう上で、もっとも重要なのは、アデノウイルスゲノムが、宿主の染色体へほとんど挿入されないことである。また、培養細胞をもちいた、遺伝子ターゲティングの実験でも非相同組換え頻度は低く抑えられていた。導入遺伝子の発現という、マウスへのアデノウイルスを使用した遺伝子治療の研究は数多くなされている。マウス尾静脈へのアデノウイルスベクターの注入は、約半数の肝細胞がベクター由来の遺伝子を発現することが報告され、すでに確立した方法となっている。そこで、*lacZ* 上に点変異をもつ相同領域約 8.1kb を、アデノウイルスゲノムの EI 欠損部位に挿入し、ドナー配列とした。

以上二種類のドナーによって、導入されると考えられる変異をもつラムダファージを作成し、p-gal 選択をおこなった。野生型 *lacZ* をもつラムダファージは、p-gal 存在下でプラーク形成効率が約 10^{-5} に減少した。一方、*lacZ* に期待される変異をもつラムダファージは、p-gal 存在下においてもプラーク形成効率は約 90% となり、効率よく選択されることを確認した。

しかし、ドナーとしてどちらの方法を用いた場合も、突然変異体頻度は、非投与マウスと同程度の 1/10000 であった。オリゴヌクレオチドを投与したマウスより得られた、変異体ファージの、PCR-restriction fragment length polymorphism (RFLP)法、シーケンシングによる解析によって、1/20000 程度以下であるとの結論を得た。また、組換えアデノウイルスを投与したマウス由来のラムダファージについても同様の解析をおこなったが、予想される組換え体は検出されなかった。以上の結果より、Mutamouse を利用した *in vivo* における遺伝子ターゲティングの頻度は 1/20000 以下であることが推察された。

二つの方法を使用した *in vivo* における遺伝子ターゲティングによる組換え体を検出することはできなかった。しかし、以上の結果は、個体での遺伝子ターゲティングの解析に有効かつ信頼性が高く高感度な検出系の発展に寄与し、この分野における研究を刺激すると期待される。