

ノックアウトマウス作製技術の進歩と 網羅的作製プロジェクト

角田 茂^{1*}・岩倉洋一郎²

遺伝子改変マウス，その中でも特にES細胞を用いて作製されるノックアウト (KO) マウスは，近年，基礎医学研究をはじめとするさまざまな生物学の研究にもはや当然のごとく使われる「ツール」となっている。かつて90年代は，KOマウスは限られた一部の研究者が使う特別な研究材料であり，新たに遺伝子KOマウスを樹立・解析を行ったという報告が当然のようにトップジャーナルに掲載されていたことを考えると，わずか20年で様相がまったく変わってしまった。生命科学の進歩のスピードを痛感する。さらにはマウスの全遺伝子を網羅的にノックアウトするプロジェクトも進行中である。本稿では，ES細胞を使った遺伝子改変技術の進歩と，近年猛烈な勢いで国際的に進められている網羅的なKOマウス作製プロジェクトについて概説したい。

未分化性維持のための 化学化合物の登場とそのインパクト

ES細胞培養の鍵は，いかにその未分化性を維持することができるかにかかっている。当初，マウスES細胞においてはサイトカインであるLIF (leukemia inhibitory factor) が広く用いられてきた。しかし，LIFの未分化性維持効果は不完全であり，一般的には繊維芽細胞をフィーダー細胞として用いた共培養系が用いられてきた。さらに，マウスであっても，129系由来のES細胞はLIF添加培養により安定的な未分化維持が期待できても，実際に解析に多用されているC57BL/6 (B6) を始めとする他の多くの近交系由来ES細胞の培養はきわめて難しかった。そのため，近交系由来ES細胞を用いてコアイソジェニックなKOマウス作製はほとんど行われず，解析の目的に応じた系統に戻し交配することにより作製された，いわゆるコンジェニックKOマウスを使用することが一般的であった。ところが，2008年，Austin Smithらにより開発されたWntシグナルの下流分子GSK (glycogen synthase kinase) 3特異的阻害剤CHIR99021と，FGF4シグナルを伝えるチロシンキナーゼおよび下流のERK活性化に繋がるMAPKの阻害剤SU5402およびPD184352を添加することにより，未分化性の維持が飛躍的に改善できるようになった¹⁾。このことにより，一部の研究室に限られていた近交系由来ES細胞を用いたKOマウス作製が一般化することになった。現在，CHIR99021とMAPK阻害剤としてMEK1特異的阻害剤PD325901の2剤 (いわゆる“2i”) の添加

培養が主に用いられている。なお，通常のES培地を用いて相同組換えクローンの単離・同定を行った後，キメラ作製用にESクローンを展開・培養する時点から2i添加培養を行っても効果がある。このことはコスト削減に大きな効果があり，筆者らの研究室ではこのプロトコルでB6N系ES細胞からのKOマウス作製を進めている。

余談であるが，この阻害剤の開発によりそれまで不可能であったラットのES細胞の培養も可能となった^{2,3)}。そしてマウスと同様にES細胞を用いたKOラットの作製も報告されている⁴⁾。ただしラットの場合，ZFNs (zinc-finger nucleases) を用いたまったく異なる方法論による標的遺伝子破壊法が実用化されているのに加え^{5,6)}，さらに改良されたTALEN標的遺伝子破壊法も開発されている⁷⁾。そのため，このES細胞ベースのKOラット作製はマウスほど普及しない可能性もある。

野生系B6N由来ES細胞の登場

マウスを用いた生命科学・基礎医学分野のゴールドスタンダードと言えばB6系マウスである。そのため，KOマウス作製に用いる近交系ES細胞の中では，B6系ES細胞の重要度がきわめて高い。B6系マウスは黒色の毛色であることから (表1)，毛色によるES寄与率を判定できるようにキメラマウス作製にはアルビノ (白色) の系統のマウスを使うことになる (図1)。しかしながらES細胞と受容胚の系統の組み合わせには相性があり，B6系ES細胞の場合はB6系マウス胚を用いた方が生殖系列キメラとなる成績がよいことが報告されている⁸⁾。そのため，C57BL/6J-Tyr^{c-2J}などのアルビノB6マウスの胚を用いてキメラマウス作製を行うことが推奨されている。しかし，アルビノB6マウスは日本のブリーダーでは通常販売系統として取り扱っていないことから，採卵用マウスを自家繁殖する必要がある。そのため，筆者らの研究室の場合，生殖系列キメラの成績があまりよくなく，かつ毛色での判定が不完全であることを覚悟の上でICR胚を用いるか，あるいは，採卵効率が悪い上にキメラマウスの生存率が著しく低いBALB/c胚 (ただし，生殖系列キメラとなる効率はきわめてよい) を用いてキメラ作製を行っていた。

そのような中，毛色の異なるB6系ES細胞の作製が試みられた。最初，C57BL/6J-Tyr^{c-2J}マウス由来のアルビノB6 ES細胞株がMillipore社で樹立され，現在でも販売されている。しかし，アルビノ形質は劣性遺伝で

*著者紹介 ¹信州大学ヒト環境科学研究支援センター生命科学分野動物実験部門 (助教) E-mail: kakuta@shinshu-u.ac.jp

²東京理科大学生命医科学研究所実験動物学研究部門 (教授)

表1. マウスの毛色決定遺伝子

系統	A 遺伝子座	C 遺伝子座	毛色
C57BL/6	a a	C C	黒色
BALB/c	A A	c c	アルビノ
ICR	A A / A a / a a*	c c	アルビノ
C57BL/6J-Tyr<c-2J>	a a	c c	アルビノ
JM8A3 (C57BL/6N-A<tm1Brd>)	A a	C C	野生色

A (Agouti) 遺伝子座：Eumelanin (黒色) を Phaeomelanin (茶色) に変換する酵素 (agouti signal protein) をコードする。優性遺伝形質を示す。

C (Colored) 遺伝子座：チロシナーゼ遺伝子 (Tyr) をコードする。劣勢遺伝形質を示すが、c c となった場合、全ての毛色形質に優先してアルビノとなる。

*：ICRのA遺伝子座は固定されておらず、Aとaの両アレルが混在している。

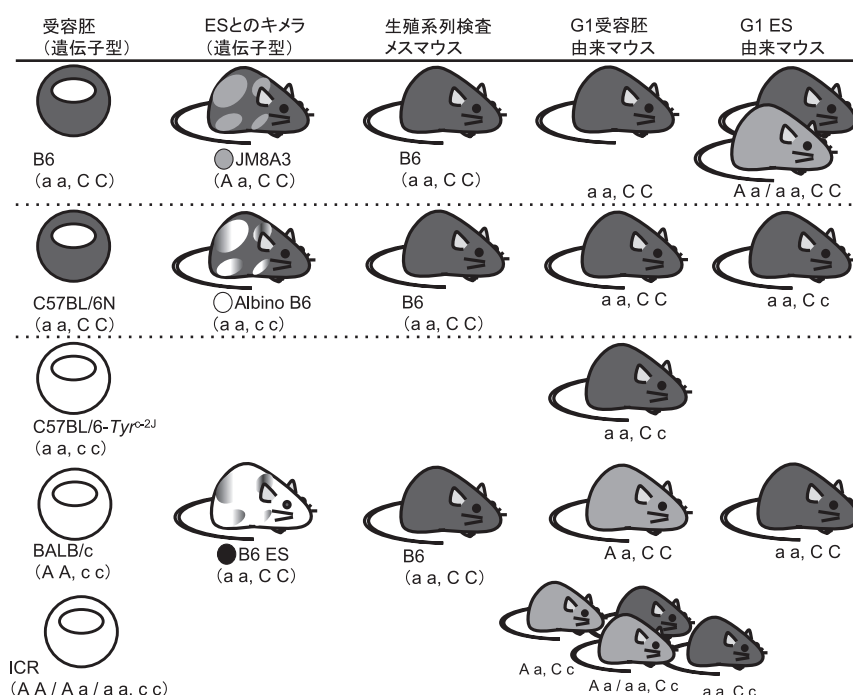


図1. JM8A3と他のB6系ES細胞を用いた時のキメラマウス作製と毛色の関係

あることから、生殖系列検査を行う際、通常のB6マウスを用いると仔マウスがES由来かどうかの判定を毛色で行うことができず、遺伝子判定をすべての仔マウスに対して行うか、あるいはテスト用のマウス（アルビノのメスマウス）を交配して確認する必要があった。この欠点を克服するために、Sanger研究所のグループにより野生色ES細胞株JM8A3が開発された⁹⁾。そして現在、後述する国際KOマウスコンソーシアムで用いられているだけでなく、多くの研究室で高評価を得ている。JM8A3株は、B6N由来JM8株に対して、毛色決定遺伝子a (nonagouti) に存在するトランスポゾン遺伝子ターゲティングすることにより樹立された細胞株である。すなわち、B6のa遺伝子はイントロンへのトラン

スポゾンの挿入により正常な転写ができず機能喪失していたものを、相同組換えによりトランスポゾンを取り除き正常型に変換させた。結果として、A^{tm1Brd}/aの野生色を示す遺伝子型を持つB6N系ES細胞が樹立された。JM8A3株は、受容胚に通常のB6胚を使用することができ、かつ生殖系列検査も毛色判定することが可能である上、生殖系列キメラ成功率も高いことから、きわめて便利なKOマウス作製用ES細胞株と言える(図1)。最近、フィーダー非依存性のサブラインJM8A1.N3も十分実用化に耐えるだけの生殖系列キメラ成功率であることがわかってきており、さらに使い勝手のよいES細胞株と言ってよいと思われる。

なお、筆者らの研究グループでは、キメラマウス作製

についてはアグリゲーションキメラ法を採用している¹⁰⁾。これはブラストインジェクション法に比べて、ピエゾマイクロマニピレーターなどの高価な機材を必要とせず、しかも比較的簡単に行える点で優れている。一般的にJM8系ES細胞はブラストインジェクション法を用いてキメラマウスが作製されているが、筆者らはアグリゲーションキメラ法においてもJM8A3は良好なキメラマウスが作製可能であることを確認している。前述の2i添加培養、野生色・フィーダー非依存JM8A1.N3、そしてアグリゲーションキメラ法を用いれば、小さな研究室でも効率よくKOマウス作製が可能であると考えられ、今後のさらなる普及に役立つものと考えている。

網羅的ノックアウトマウス作製プロジェクトの展開

KOマウス作製技術が完全に確立したこと、そしてなによりポスト・ゲノム解析として遺伝子の機能の解析のステージに入ったことが追い風となり、ヨーロッパ (EUCOMM, European Conditional Mouse Mutagenesis Program) とアメリカ (CSDとRegeneron, TIGM)、カナダ (NorCOMM, North American Conditional Mouse Mutagenesis Project) が参加する国際コンソーシアム (IKMC, International Knockout Mouse Consortium) が結成され、網羅的KOマウス (ES細胞クローン) 作製を行う国際プロジェクトが2006年にスタートした。このプロジェクトにより、本稿執筆時点 (2012年7月) ですでに176,870遺伝子の変異ESクローンが作製され、HPに公開、研究者への提供が行われている¹¹⁾。これらにより、すでに予測されている遺伝子の大部分の変異ES細胞ができたことになる。じつのところ、全遺伝子のKOマウスを作製するとなると、莫大な費用と巨大な飼育施設が必要となるなど、とても現実的ではない。しかしながら、遺伝子変異ES細胞作製と保管であれば十分可能である。実際、現在のところ個体化まで終了した系統は1678遺伝子 (公開分) に留まっている。ちなみに、プロジェクトで作製した遺伝子変異ESクローンは格安でリクエストのあった研究者に提供されているが、MTA上、KOマウス樹立後は、KOマウスをIKMCに寄託することになっている。すなわち、個体化部分を「受益者負担」とすることにより、プロジェクトとして個体化を促進させるようになっている。

このような中、我が国においても熊本大学を中心として東京大学医科学研究所および大阪大学微生物病研究所の3大学連携で2009年に計画が小規模ながらスタートした。さらに2011年、東京大学、熊本大学、大阪大学、九州大学、筑波大学、京都大学、理化学研究所の7つの組織が共同で、「先進的医学研究のための遺伝子改変動物研究コンソーシアムの設立」計画を提案、実現化を目指している。この中では、研究者コミュニティの要望を取り入れながら疾患に関連した2000遺伝子を選別し、遺伝子変異マウス (ラット) を作製、新たな治療法開発

への手がかりを得ることを目的としている。医学研究に特化し、かつ個体化を行い解析とセットで進める点で海外と差別化を図っている。

なお、世界の流れは網羅的に「作る」から網羅的に「解析する」のステージに突入しており、2011年より国際マウス表現型解析コンソーシアム (International Mouse Phenotyping Consortium, IMPC) がスタートした¹²⁾。この中で、IKMCで開発したKOマウスについて、マウス表現型解析パイプラインによって共通基準による網羅的な表現型解析を行い、その結果をデータベース化し、世界中の研究者に情報とKOマウスを提供する計画となっている。なお、日本では理化学研究所バイオリソースセンターが参画している。2016年までに5000系統が目標となっており、極めて大規模なプロジェクトであると言える。

このように、ES細胞が生み出した「KOマウス」は、ES細胞培養技術の進展と共に生命科学・基礎医学分野でますます重要な役割を担うようになっている。さらに単純な遺伝子破壊だけでなく、点変異やレポーター遺伝子を導入するノックイン技術や時期特異的/細胞特異的に遺伝子を変異させるコンディショナルKO技術^{13,14)}、さらには双方を組み合わせたコンディショナルノックイン技術など¹⁵⁾、より複雑なことが可能となってきている。また、C57BL/6N背景での解析が世界で主流となりつつあるが、遺伝的背景によりKOマウスの表現型が異なることがあることから、一つの系統だけの解析には限界がある。そのため他の近交系であるBALB/cやNOD、さらには日本産野生由来MSM/Msなどの系統でのKOマウス作製も試みられており¹⁶⁾、このようなマウスを用いた研究はまだ発展を続けていくと思われる。

文 献

- 1) Ying, Q.-L. *et al.*: *Nature*, **453**, 519 (2008).
- 2) Buehr, M. *et al.*: *Cell*, **135**, 1287 (2008).
- 3) Li, P. *et al.*: *Cell*, **135**, 1299 (2008).
- 4) Tong, C. *et al.*: *Nature*, **467**, 211 (2010).
- 5) Geurts, A. M. *et al.*: *Science*, **325**, 433 (2009).
- 6) Mashimo, T. *et al.*: *PLoS ONE*, **5**, e8870 (2010).
- 7) Miller, J. C. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **29**, 143 (2011).
- 8) Schuster-Gossler, K. *et al.*: *Bio Tech.*, **31**, 1022 (2001).
- 9) Pettitt, S. J. *et al.*: *Nat. Meth.*, **6**, 493 (2009).
- 10) 角田 茂ら：新遺伝子工学ハンドブック 改訂第5版, p.289, 羊土社 (2010).
- 11) <http://www.knockoutmouse.org/>
- 12) <http://www.mousephenotype.org/>
- 13) 角田 茂ら：新遺伝子工学ハンドブック 改訂第5版, p.297, 羊土社 (2010).
- 14) 角田 茂ら：新しい薬学事典, p.121, 朝倉書店 (2012).
- 15) Bayascas, J. R. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **281**, 28772 (2006).
- 16) Araki, K. *et al.*: *Mamm. Genome*, **20**, 14 (2009).