

マウス飽和突然変異体作製プロジェクト

山村研一

はじめに 真に創造的な基礎研究の発展には、サーチ的研究とリサーチ的研究が不可欠である。サーチ的研究は種を蒔くことにあたり、シーズ的研究ともいわれるが、より戦略的包括的である。これに対し、リサーチは苗を育てることに等しく、短期的に成果が出るのが期待できるが、すでに筋道が決まった研究が多い。この意味から、真に創造的な研究の発展のためには、サーチ的研究がリサーチ的研究よりもより重要であるといえる。1995年度のノーベル賞に輝いた Nüsslein-Volhard らの研究が、サーチ的研究から、すなわちショウジョウバエにおいて前後軸の異常を呈する突然変異体を多数分離することから始めているのは承知の事実である。この努力があってこそその研究であり、わが国ではこの部分に相当する研究は少なく、理解がたりない。

サーチ的研究の代表的なものはゲノム研究であろう。これを思い浮かべればわかるように、サーチ研究には1つの思想が必要である。つまり、得られた成果を多くの人が共有する思想である。多型 DNA プローブの採取やランダムなゲノム DNA 断片または cDNA の塩基配列の決定は、やっている人にとっていかにも意味がないように思える。しかし、これは計画途上のことであり、完成に近づくと実は膨大な研究をしていたことに気づくことになる。そして、いったんそれらのデータが集積し、データベースに組み込まれるや否や、多くの研究者にとって、貴重な情報源となり、こぞって利用する、つまり得られた成果が共有できるようになっている。このサーチ研究の目的は、単一遺伝子病の原因遺伝子のいくつかを単離できるのかを問うのではなく、10万個ある遺伝子のうち何割を一網打尽できるの

かということであり、成果を共有すると同時に、一方で世界を支配できるかという戦略思想でもある。世界的視野からみればゲノムの構造解析が射程内に入り、筆者の考えでは機能解析におけるサーチ研究が次の課題になったと断言してよい。そのための戦略思想の練り直しが欧米ではすでに始まった。

その一つ的手段として世界的に注目を浴びているのが、マウスにおける飽和突然変異体作製であり、ドイツではすでに始まり、米国では年間20億円の予算が始まろうとしている。また、英国の製薬会社であるスミスクライン社では、開発段階から研究費を出し、得られたミュータントマウスのすべてに特許の枠をはめることを始めている。これらはいずれも、10万個と推定される遺伝子について、ランダムな方法でその変異体を可能なかぎり多数作製する計画である。これは単離された興味ある遺伝子の破壊マウスを作製するという発想ではなく、遺伝子破壊マウスをじゅうたん爆撃的に効率よく作製するにはどうすればよいかという思想から結論された方法である。つまり、分子生物学全盛の時代は逆遺伝子学的発想、つまりまず遺伝子ありきが重要視されたが、ここにきて伝統的であるが分子生物学的手法も取り入れた順遺伝子学的な発想、つまりまずミュータントありきという考えが必要になったといえる。

マウスの変異体は、ヒトと同じ哺乳類であるため薬剤開発などへ応用できることから、付加価値が格段に高く、かつ特許が取得できるため、その重要性は遺伝子以上のものがある。遺伝子の機能解析がゲノム研究に含まれていると公言するのなら、日本でなぜマウス

のゲノムの構造解析はもちろんのこと、飽和突然変異体作製プロジェクトが立ちあがらないのか不思議である。日本でも早急に開始するべきであろう。

I. これまでの経緯

分子生物学的な技術が導入される以前より、マウスの突然変異体作製は行なわれていた。最も一般的なのが、飼育中に偶然に生じた自然突然変異体を樹立する方法である。1900年代初頭より営々と続けられてきた方法で、現在までに約1,000種類が樹立され、その染色体地図が完成している。放射線や薬剤による誘発突然変異も行なわれていたが、どちらかというに限られた遺伝子座の突然変異体の作出に用いられていた。たとえば、目で見てすぐわかる色素の異常マウスなどであり、これにより3,000~4,000種類は作製されている。しかし、これらの方法による大規模もしくは飽和突然変異体作製は、他の動物に比し多大の経費と労力を要し、その必要性についてはこれまで懐疑的であった。

しかし、遺伝子の構造解析にめどがたった現在、マウスにおける飽和突然変異体作製をランダムな方法により行なう必要があることが認識されるに至った。その理由の一つは、これをES細胞を利用した相同遺伝子組換えでは、あまりに時間、経費、労力がかさむからである。現在、1つの遺伝子の破壊マウスを作製するのに、人件費と減価償却費を除いても、約200万円必要である。また、遺伝子破壊マウス作製の律速段階は相同組換えを行なったES細胞クローンの単離であるが、組換え用のベクターの作製も含めて1遺伝子につき約3カ月必要で、年間4クローンとるのが精いっぱいである。つまり、10万個の遺伝子破壊マウス作製には、25,000年×人かかることになる。これでは、構造解析のスピードに比しあまりに遅く現実的ではないとのことで、ランダム飽和突然変異が見直されるに至った。ここでは3つの方法、すなわちENU法、クロラムブシル法、遺伝子トラップ法について述べる。

II. 3つの方法

1. ENU法

ENU (ethylnitrosourea) は突然変異原物質で、点突然変異を誘発する。これをマウスに投与することにより、高率に変異体を作製できることが、Russel らにより明らかにされた(図1)¹⁾。具体的には、8~10週齢

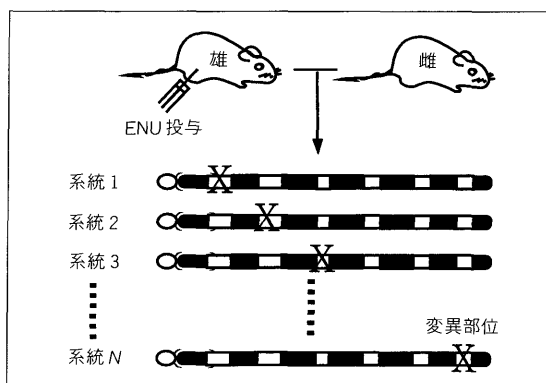


図1 ENU変異体作製

ENUを雄マウスに投与すると、精子にランダムに突然変異が入る。その雄と雌を交配しF₁マウスを得る。F₁は原則ヘテロであるので、交配によりF₂世代でホモを得る。さらに交配により系統として樹立する。

のC3H系統マウス雄にENU (100 mg/kg 体重) を1週間隔で3度腹腔内投与する。7週間経過後、処理マウスを同系のC3H系統雌に交配してF₁マウスを作製する。このF₁マウスのゲノム上には、50~100遺伝子座で突然変異が生じていると推定されるが、1遺伝子座に注目すれば1/1,000の確率で、その変異マウスを得ることができる計算である。したがって、もし1,000頭のF₁マウスを作製すれば、任意の遺伝子の変異マウスを得ることができる。このようにきわめて簡単に、特殊な技術を必要とせず変異マウスを多数得ることができるが、欠点としては、大規模な飼育施設を必要とすること、変異した遺伝子のマッピングには、マウス亜種間交配を行なわねばならないこと、またその遺伝子の単離は、ポジショナルクローニングに頼らざるをえないことである。

2. クロラムブシル法

クロラムブシル投与により、染色体の部分欠失マウスを作製できる²⁾。方法は、原則的にENU法と同じである(図1参照)。すなわち、雄マウスにクロラムブシル10 mg/kg 体重程度を1回腹腔内に投与し、2~3週間後に、雌マウスと交配するだけで、染色体の欠失マウスを作製できる。精子ごとに欠失の部位は異なるが、肉眼的に観察できる劣性の表現型が出現する確率は約25%ときわめて高率で、特定の遺伝子座位においてもおよそ1/1,000と見積もられている。1,000匹子供をとれば1匹は特定の遺伝子座での欠失をもつマウスが得られる計算であり、非常に効率のよい方法である。欠

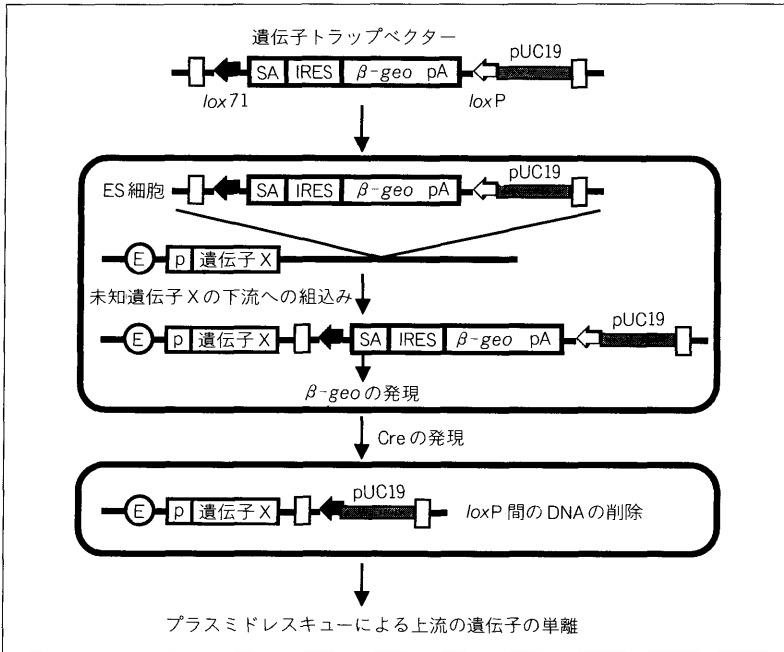


図 2 遺伝子トラップ法の概要

遺伝子トラップベクターは薬剤耐性マーカーとレポーター遺伝子の両方の機能をもつ β -geo を含むが、プロモーターの代わりにスプライスアクセプターの配列のみが上流にある。したがって、マウス内在性遺伝子の下流に組み込まれたときのみ β -geo は発現する。逆にいえば β -geo が発現すればその上流には遺伝子があることを意味している。トラップベクター内に loxP を組み込んでおくと、余分な配列は Cre を発現させることで除去できる。

失する大きさは、3~15 Mb と見積もられている。多型 DNA マーカーが充実してきたので、100 kb 程度の精度で染色体のどの部分に欠失があるのかが簡単に同定できるようになった。

3. 遺伝子トラップ法

遺伝子トラップの原理は簡単である。トラップベクターを ES 細胞に導入し、内在性遺伝子の下流に組み込まれたときにトラップベクター内のレポーター遺伝子が発現するようになっている (図 2)³⁾。筆者らの開発したトラップベクターの基本構造も図 2 に示した。筆者らは、*lacZ* と *neo* 耐性遺伝子の融合遺伝子である β -geo を使用しているが、目的に応じて、別々に配置することもある。スペーサーは、トラップベクターが組み込まれるときに、必ずといっていいほど一部が欠失して入るので、大事な部分が残るようにするためにつけ加えたもので、どのような DNA 断片でもよい。*lox71* については後述する。IRES は、CAP 非依存性に翻訳が開始できるための配列である。pUC19 は、トラップ後に内在性遺伝子をプラスミドレスキュー法により単

離するためのものである。遺伝子トラップ法を行なううえで、ポイントになるのは以下に述べる 2 点である。

A. スクリーニング系

ES 細胞で発現している遺伝子の数は、約 1 万個といわれているが、これでは全遺伝子の 10 % にすぎない。そこで、ES 細胞の分化誘導によるスクリーニング系が考えられている。これらには、レチノイン酸による誘導、胚様体形成による誘導、奇形癌腫形成による誘導、キメラマウス作製による誘導がある。胚様体はマウス 6.5 日胚に類似していること、種々の内胚葉系列の遺伝子をマーカーに遺伝子発現を解析したところ、きわめて正常発生に近い発現パターンが得られること⁴⁾から、筆者らはこの系をスクリーニング系として用いている。

B. ベクターの開発

トラップベクターが複数コピー組み込まれると、プラスミドレスキュー法で内在性遺伝子を単離しようと思っても、ベクターばかりが単離される。これは、pUC19 部分から、その 5' 側に存在するマウス内在性 DNA が距離的に遠くなるためと、ベクターの数が多いという比率の問題による。この問題を解決するため、P1 バクテリオファージの Cre-loxP システムを利用できる。Cre 組換え酵素は 34bp の loxP という配列を認識して (図 3)^{5,6)} 組換えを起こす。そこで、スプライスアクセプターの下流と β -geo の下流の 2 か所に loxP を挿入した。このようなベクターが多数コピー組み込まれたとしても、Cre を発現させることで、pUC19 の上流の β -geo などの余分な配列が除去でき、その結果、pUC19 のすぐ近傍にマウス内在性遺伝子が位置することになり、簡単にこれを単離できるようになった。

C. Cre-loxP による遺伝子挿入

ところで、遺伝子トラップ法では、相同組換えのように微細な変異を導入できないという欠点が指摘されていた。これを克服するために、Cre-loxP システムに

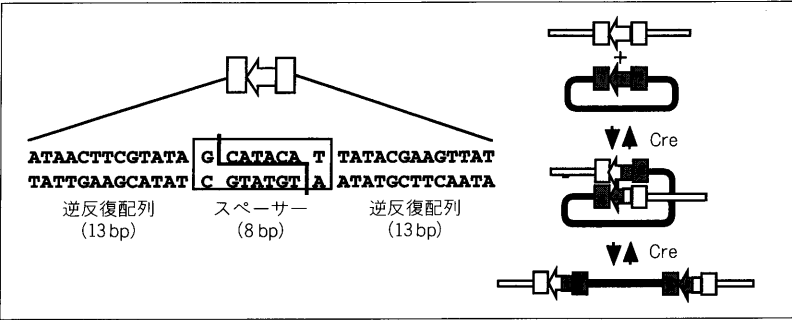


図 3 *loxP* と Cre の反応
Cre は *loxP* 配列のスペーサー部分を切断し、挿入または切り出しを行なう。右の図は、反応をわかりやすくするため、*loxP* 配列を塗り分けてある。

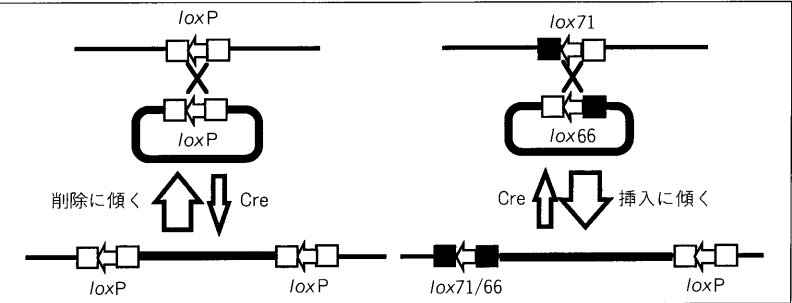


図 4 変異型 *loxP* による DNA 断片の挿入
左側は正常、右側は変異型の *lox* を用いたときの組換えの反応。左側では切り出された *loxP* を含む DNA が物理的に離れるので、挿入よりも削除に反応は傾く。一方、染色体側に *lox71* および環状 DNA 側に *lox66* を用いると、組み込まれたときに生じる *lox71/66* を Cre 組換え酵素は認識できにくくなり、削除反応より挿入反応側に傾く。

よる遺伝子挿入の系の開発を試みた。Cre-*loxP* システムは、削除と挿入反応を行なうが、哺乳類細胞では核が大きく、いったん削除されると、*loxP* を含む環状 DNA が拡散する結果、挿入反応を行なえない。そこで、左端の反復配列に変異をもつ *lox71* と、右端の反復配列に変異をもつ *lox66* を利用すれば、いったん挿入されれば削除ができなくなることがわかった。つまり、左端に変異を有する *lox71* と右端に変異を有する *lox66* の間で組換えが起こると、左側には左端および右端とも変異をもつ *lox71/66* が、右側には正常の *loxP* が配列することになる。Cre は、両端に変異をもつ *lox71/66* を認識する効率が悪く、したがって、削除できなくなり挿入されたままとなる (図 4)。植物細胞での成功例が報告された⁷⁾ので、筆者らは ES 細胞に応用し、10 %程度の効率で挿入反応が起こることを明らかにした⁸⁾。この *lox71* を含むトラップベクターを開発し、これを可変型遺伝子トラップ法と名づけた。これを用いればトラッ

プ後に *lox71* 部位に自在にいろいろな遺伝子でも挿入できるので、格段に応用性が広がったといえる。

4. 方法論のまとめ
3つの方法について、長所と欠点を表 1 にまとめた。

III. 諸外国の現状

ドイツではヒトゲノムプロジェクトの一環として、マウスの ENU 突然変異誘発が 1997 年から始まっている。優性変異については年間 5,000 系統、劣性変異については年間 100 系統を目標に変異体作製が計画されている。変異体作製は、ドイツ GSF リサーチセンターの哺乳類遺伝学研究所で一括に行ない、変異体のスクリーニングを臨床化学、免疫異常、アレルギー、ウイルス抵抗性、形態異常、性の分化異常、行動異常に分けてそれぞれの専門家が担当して

行なう体制をとっている。これまでの結果においてすでに 73 系統の変異マウスを発見しているとのことである。イギリスでも製薬会社が資金を提供して突然変異誘発が始まっている。米国では、ゲノムシステムズ社が、レトロウイルストラップベクターを用いて ENU 突然変異誘発を行ない、すでに 2,000 クローンを解析したとの論文が *Nature* 誌に発表され⁹⁾、衝撃を与えたことは記憶に新しい。また、いよいよ米国でマウス突然

表 1 変異原物質法と遺伝子トラップ法の比較

	ENU 法	クロラム ブシル法	遺伝子 トラップ法
変異の性質	点変異	欠失変異	自在の変異
技術レベル	ルーチン	ルーチン	高度
設備	ルーチン	ルーチン	高度
変異マウス作製	容易	容易	困難
変異遺伝子同定	困難	中程度	容易
必要飼育室	大規模	大規模	小規模

変異誘発も含むマウスゲノムプロジェクトに年間約 60 億円程度の研究費を NIH から交付されるとのことである。種々の総説も発表され機運は高まっている¹⁰⁻¹²⁾。

おわりに 日本では、マウスゲノム研究はほとんど無視されてきたように思える。無視されていないという意見もあるかもしれないが、要はヒトゲノムに投下された資本の何%がマウスに資本投下されたのかという問題である。筆者らは、何年も前からマウスゲノム研究の必要性を訴え、とりわけ日本が欧米に太刀打ちできるためには、飽和変異体作製プロジェクトを欧米に先んじて立ち上げる必要性を訴えているが、日本での動きは遅いし鈍い。

話は変わるが、エイズ薬害訴訟で得られた教訓がある。つまり、危険性を警告する十分な情報をつかみながら、当時やれることをやらなかったことで、そのときの決定権をもつ責任者が罪を問われることである。日本でもマウス飽和突然変異体作製プロジェクトも含めて本格的に始めないと、付加価値の高い変異マウスの大半の特許は欧米に押さえられ、今後の基礎研究のみならず、応用研究や薬剤開発などにおいて致命的な遅れをとることを、マウス個体の遺伝子操作を永らく行なってきた筆者として、警告しておきたい。これでこの警告が無視され、将来筆者が危惧する事態を招いたときは、現在の責任者に罪を問えることになる。

文 献

- 1) Russel, W. L., Kelly, E. M., Hunsicker, P. R., Bangham, J. W., Maddux, S. C., Phipps, E. L. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5818-5819 (1979)
- 2) Russel, L. B., Hunsicker, P. R., Cacheiro, N. L. A., Bangham, J. W., Russel, W. L., Shelby, M. D. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 3704-3708 (1989) ; Abe, K. *et al.* : *Exp. Cell Res.*, **229**, 27-34 (1996)
- 3) Gossler, A., Joyner, A., Rossant, J., Skarnes, W. C. : *Science*, **244**, 463-465 (1989)
- 4) Abe, K., Niwa, H., Iwase, K., Takiguchi, M., Mori, M., Abe, S., Abe, K., Yamamura, K. : *Exp. Cell Res.*, **229**, 27-34 (1996)
- 5) Sternberg, N., Hamilton, D. : *J. Mol. Biol.*, **150**, 467-486 (1981)
- 6) Hoess, R. H., Abremski, K. : *J. Mol. Biol.*, **181**, 351-362 (1985)
- 7) Albert, H., Dale, E. C., Lee, E., Ow, D. W. : *Plant J.*, **7**, 649-659 (1995)
- 8) Araki, K., Araki, M., Yamamura, K. : *Nucl. Acids Res.*, **25**, 868-872 (1997)
- 9) Zambriwicz, B. P., Friedrich, G. A., Buxton, E. C., Lilleberg, S. L., Person, C., Sands, A. : *Nature*, **392**, 608-611 (1998)
- 10) Brown, S. D. M., Peters, J. : *Trends in Genetics*, **12**, 433-435 (1996)
- 11) Hicks, G. G., Shi, E., Li, X.-M., Li, C.-H., Pawlak, M., Ruley, H. E. : *Nature Genet.*, **16**, 338-344 (1997)
- 12) Evans, M., Carlton, M. B., Russ, A. P. : *Trends in Genetics*, **13**, 370-374 (1997)

お知らせ

奈良先端科学技術大学院大学 (NAIST) 技術セミナー 光計測技術を用いた生命現象の解析——分子から個体まで

日 時：平成 11 年 1 月 21 日(木) 10:15~17:00

場 所：奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究調査センター

超高速分子分光学とその応用 濱口宏夫 (東大・理)
生体分子機能の 1 分子イメージング

柳田敏雄 (阪大・医)

マウスを用いた記憶研究の一例 塩坂貞夫 (NAIST・パイオ)

PET/*in vitro* PET による脳機能・代謝の解析

渡辺恭良 (大阪バイオサイエンス研)

バクテリオロドプシンの光駆動プロトンポンプ機構

片岡幹雄 (NAIST・物質創成)

Caged 化合物のピンポイント光解除を用いた情報伝達イ

メージング 杉山範和 (浜松ホトニクス)

機器講習

定員：70 名 参加費：無料

申込先：〒 630-0101 奈良県生駒市高山町 8916-5
奈良先端科学技術大学院大学先端科学技術研究調査センター

Tel. 0743-72-5600/5602 FAX 0743-72-5609

E-mail : t-hayasi@ad.aist-nara.ac.jp

URL : <http://isw3.aist-nara.ac.jp/RCAST/semi/19990121-j.html>