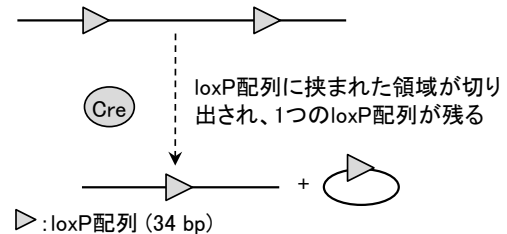


理想的な疾患モデル作製に向けたゲノム改変技術の開発

北海道大学 遺伝子病制御研究
疾患モデル創成分野
森岡 裕香

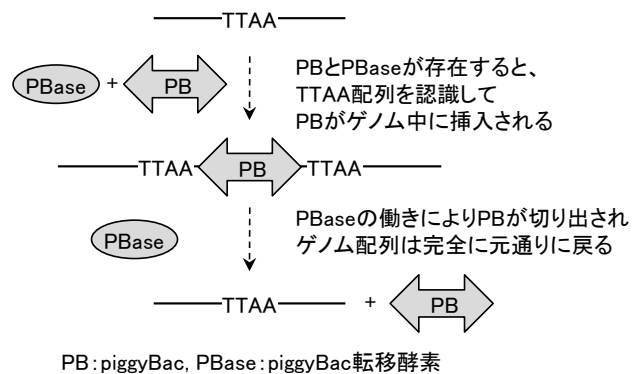
1. 背景・目的

1～数塩基の置換や欠失・挿入に由来する、ヒト遺伝性疾患を反映したモデル動物の作製ならびにその解析は、発症メカニズムの解明や、診断・予防・治療法開発などにおいて極めて有用であり、これまでも、相同組換えにより ES 細胞ゲノムを改変し、そこから変異マウスの作製が試みられている。一般に相同組換えの頻度は低いため、薬剤耐性遺伝子を利用した組換え体の選択が不可欠であるが、選択後は不要となった薬剤耐性遺伝子を除去する必要がある。これを可能にするために、既存の技術では Cre/loxP 部位特異的組換えが利用されているが、この方法では、目的の変異がわずかに 1 塩基の置換であったとしても、それとは別に 34 塩基からなる loxP 配列がゲノム中に残存してしまうのを避けられない【図1】。通常、この「小さな傷」はイントロン領域に残るように設計されるため、表現型に影響を与えないと考えられ問題視されてこなかったが、近年注目を集めているマイクロ RNA の発見に代表されるように、イントロン配列の重要性は無視できなくなっており、新たなアプローチが必要と考えられる。



【図1】 Cre/loxP 部位特異的組換え

本研究では、DNA トランスポゾン の 1 種である piggyBac (PB) に着目した。PB は【図2】に示すように、ゲノム中の TTAA 配列を認識し、PB 転移酵素 (PBase) の働きによりゲノム中を転移するが、この際、他のトランスポゾンとは異なり、「転移の痕跡を一切残さない」という特筆すべき性質を有している。そこで、Cre/loxP の代わりに PB/PBase を利用することで、余分なゲノム変化を伴うことなく標的部位のみを特異的に改変する技術を確立し、目的の塩基配列変化の影響だけを正確に反映する理想的な変異導入マウスの作製を試みた。



【図2】 piggyBac の挿入と切り出し

2. 方法・結果

本研究では、Kit 遺伝子の 1 塩基置換が原因の Wv 自然突然変異をモデルとし、PB/PBase を利用したゲノム改変により、人為的に Wv 変異マウスの作出を試みた。Wv 自然突然変異のヘテロマウスは体毛に白斑が生じ、マスト細胞数や赤血球数の減少といった表現型を示すことが報告されている。また、ホモマウスは白毛黒眼で不妊となる。

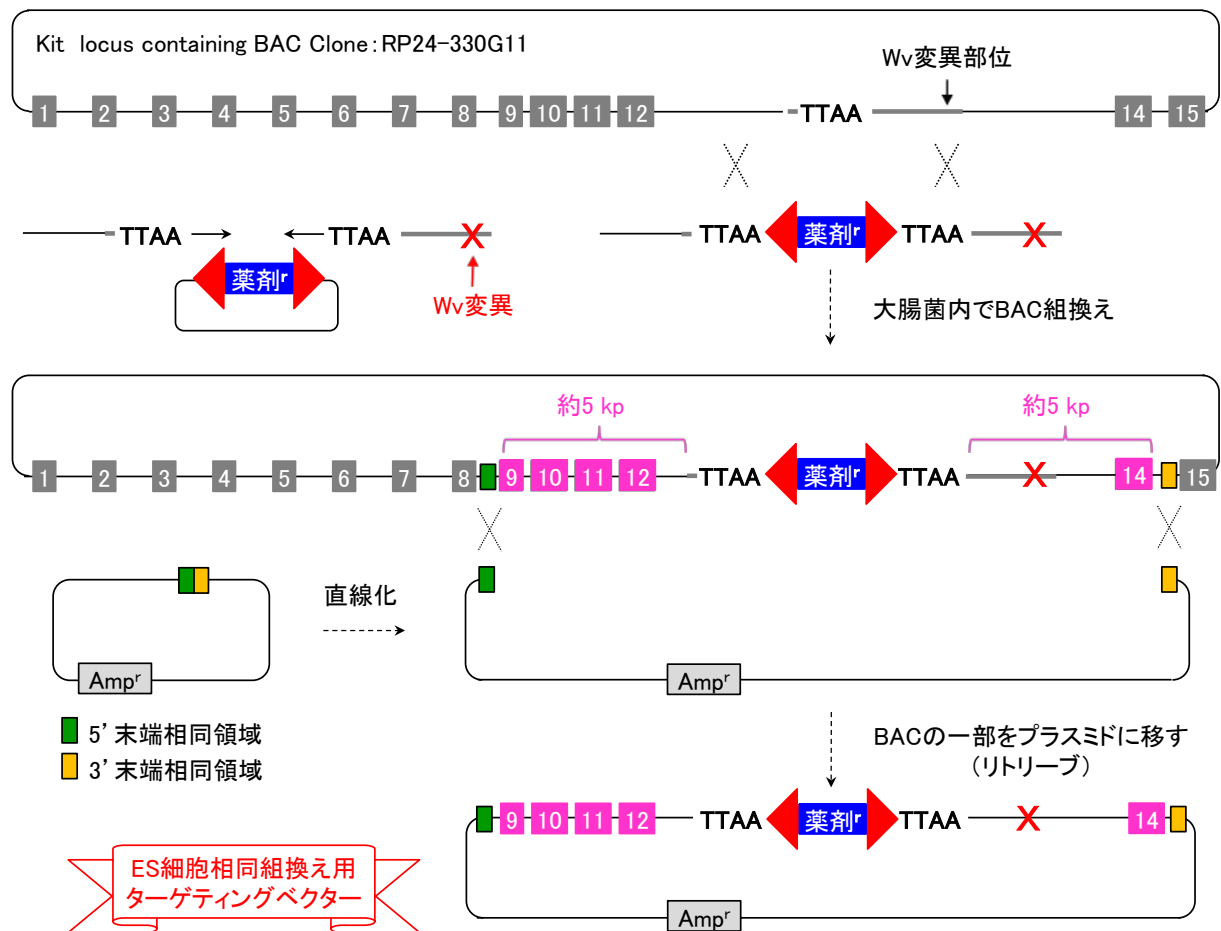
(1) 薬剤選択遺伝子発現カセットを搭載した PB ベクターならびに PBase 発現ベクターの構築

PB には 10 kb 以上の DNA 断片を組み込むことが可能であるため、薬剤選択遺伝子発現カセットを搭載した PB ベクターを作製した。また、最終的にゲノムから薬剤選択遺伝子発現 PB カセットを抜き取るために、CMV プロモーターの制御下に PBase を発現するベクターを構築した。

(2) Kit遺伝子を含むBAC (Bacterial Artificial Chromosome) の修飾と相同組換え用ターゲティングベクターの構築

相同組換え率向上を目的として、両腕5 kb以上の長い相同領域を有するターゲティングベクターを、正確かつ簡便に構築するために、増幅エラーの心配が避けられないPCRによるゲノムからのクローニング法ではなく、BACリコンビニアリング法を利用した【図3】。

具体的にはまず、Kit遺伝子を含むBACを購入し、変異を導入したい部位の近傍にTTAA配列を探した。TTAAとその両側の配列を繋いだプライマーを用いて、(1)で構築した薬剤選択遺伝子発現PBカセットを増幅し、そのフラグメントをリコンビニアリング法でBACに挿入した。プライマーにWv変異を導入しておくことで、Wv変異と薬剤選択遺伝子発現PBカセットが挿入されたBACが得られた。次に、相同組換え用のアームとして、薬剤選択遺伝子発現PBカセットを中心に5'、3'側とも約5 kbずつのBAC領域をプラスミドにサブクローニングし、ターゲティングベクターを得た。この操作はリトリーブと呼ばれ、サブクローニングしたいBAC領域の両末端との相同領域を搭載したプラスミドを構築し、大腸菌内でリコンビニアリングを行うことで効率良く達成された。



【図3】 Kit 遺伝子を含む BAC の修飾と相同組換え用ターゲティングベクターの構築

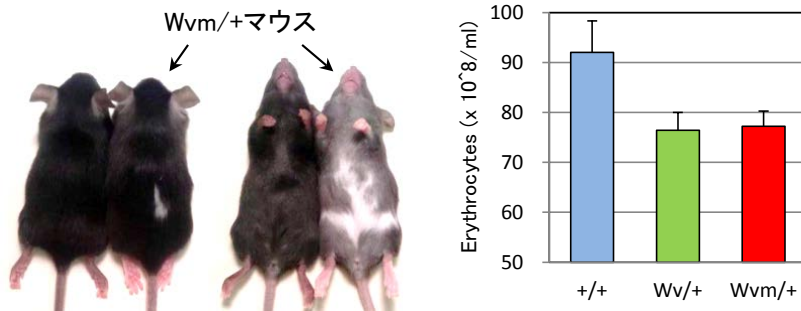
(3) 相同組換えES細胞の作製と薬剤選択遺伝子発現PBカセットの抜き取り

定法に従ってターゲティングベクターをエレクトロポレーションでES細胞に導入し、薬剤選択により相同組換え体を得た。さらに、この組換えES細胞にPBase発現ベクターをエレクトロポレーションで導入することで、薬剤選択遺伝子発現PBカセットを抜き取った。

ES細胞ゲノムのシーケンス解析により、Wv変異が導入されている事ならびに、PBの痕跡が残っていない事が確認できたため、Wvmアレルと命名した。

(4) Wv変異マウスの作製と表現型解析

定法に従って、(3)のES細胞からキメラマウスを作製した。キメラマウスの雄と野生型マウスの雌を交配することでWvm/+マウスを誕生させ、表現型を解析したところ、Wv/+マウスと同様に体毛に白斑が認められ、野生型マウスと比較して有意な赤血球数の減少を示した【図4】。



【図 4】 Wvm/+マウスの表現型解析

以上の結果より、PB/PBaseを利用することでゲノムに目的の変異のみを導入する技術を確認でき、これにより、自然突然変異マウスと全く同じゲノム配列を有し、同じ表現型を示すマウスを人為的に作出することに成功した。

3. 考察・まとめ

本研究で確立した技術を利用すれば、標的以外の変化を伴うことなくES細胞ゲノムの任意の位置に自由に変異を導入することができ、そのES細胞から作製されたマウスは、目的の塩基配列変化の影響だけを正確に反映する有用なモデル動物となり得る。種々の組み合わせで複数の変異を保有するマウスを作製すれば、複雑な病態の再現や解明に繋がる可能性も高い。また、最終的に得られたマウスが外来遺伝子を保有しないことも特筆すべき点であり、自然突然変異マウスと同等であると言える。すなわち、遺伝子組換え生物として取り扱う必要がなく、移動や飼育、使用等に関する煩雑な手続きを省略できることから、多くの研究者にとって利用しやすいバイオリソースになると考えられる。

また、本研究では一例として点変異導入マウスの作製を試みたが、ゲノムの標的部位のみを改変する技術は、変異の「導入」のみならず、「修復」にも有用であることは言うまでもない。1990年から始まった遺伝子治療は、現時点では癌などを対象とした遺伝子産物の補充療法にとどまっているが、ゲノムの改変が自由にできれば遺伝病の根治治療法開発に貢献できる可能性がある。ヒトへの適用を想定した場合、ゲノム中にわずかでも外来遺伝子が残存すると、癌化や新たな遺伝子異常の発現、子孫への伝達などが問題視されるが、これらを回避できることが本研究成果の最大の意義と言える。さらに、本研究成果をiPS細胞技術と組み合わせれば、①患者自身の細胞ゲノムを傷なく修復し、②拒絶反応を伴うことなく移植する。ことが可能となり、遺伝子治療と再生医療の融合とも言うべき新しい医療の発展に大きく貢献するものと期待できる。

4. 発表論文・参考文献

なし