

S4 発生工学的的手法による遺伝子発現機構の解析

山 村 研 一

(大阪大学医学部・第4内科)

Analysis of control mechanisms of gene expression by
the method of embryonic manipulation

Ken-ichi YAMAMURA

*Department of Medicine and Geriatrics, Osaka University Medical School,
Fukushima-ku, Osaka 553, Japan*

Summary Recombinant DNA technology have made it possible to isolate a single gene coding for a particular protein from a large amount of DNA in the nucleus of every human cell and examine its functions. The isolated gene can be inserted into cultured human cells in a number of ways such as calcium precipitation method or direct injection with a micropipette. Genes can also be inserted into mouse embryos by microinjection. In both cases genes may be integrated into the nuclear DNA or remain free in the cytoplasm as a self-replicating, extrachromosomal element. In case of cultured cells gene is usually transcribed to give RNA and RNA is translated to give protein. Also in mice, genes inserted at the embryonic stage are expressed. However the site of integration appears to be random and the inserted genes do not function properly. Thus following experiments need to be accomplished before the gene is introduced into human subjects. Firstly, the new gene should be put into the proper target cells and should remain there. Secondly, the new genes should be regulated appropriately in the target cells. Once these experiments has been accomplished, attempts to treat human genetic diseases with gene therapy will be ethically justified. However tissue-specific and stage-specific regulation of gene expression is poorly understood at present. The techniques for introducing genes into animals such as production of chimeric animals and injection of isolated genes into eggs will provide powerful tools for studying these regulatory mechanism of gene expression.

医学の分野における遺伝学研究の一つの目的は、遺伝病での遺伝子治療の可能性を探ることである。遺伝子治療が行われるためには、少なくとも以下の三つの条件がみたされなければならない。

- 1) 目的の遺伝子が単離されていること。
- 2) 遺伝子を目標となる細胞に移入でき、そこにとどまっていること。
- 3) 移入した遺伝子が正常なコントロールのもとに発現すること。

近年の分子生物学の進歩により、遺伝子の単離は容易となり、すでに手に入れることのできるもの

もある。ここ数年のうちに相当数の遺伝子が単離されると考えられる。遺伝子の細胞への移入は、現在多くの研究があるが、そのほとんどは樹立した細胞株を用いたものであり、正常の 2 倍体細胞への移入の報告は二つのみである (Cline *et al.*, 1980; Mercola *et al.*, 1980)。そしてこの二つの報告ではどちらも骨髓細胞を用いたものであり、他の細胞への移入は成功していない。遺伝子発現に関与した塩基配列も判明してきており、これらの配列を含んだ DNA 断片を細胞に移入し、その発現をみたり、あるいは特定の物質でその発現が制御しうるようなプロモーター部分を、発現させたい構造遺伝子の 5' 端に結合した DNA を細胞内に移入し、特定の物質の作用で発現してくるかどうかをみたりした報告がある。しかし、これらはいずれも強制的な発現をみているものであり、正常なコントロールのもとに発現させようとの試みではない。遺伝子発現に関する最大の問題は、その組織特異性および時期特異性にあるといつてよい。体細胞を用いた研究では、この二つの特異性を解析できるとは考えられない。二つの特異性を解析できるのではないかと期待されているのが、発生遺伝学的な手法であり、初期胚を材料とする実験系である。以上のようにまだ解明されなければならない点は多く、遺伝子治療が行われる現況ではない。ここでは、発生工学的な手法にどのようなものがあり、どのようなことを解析できるのかを紹介したい。

1. 発生工学的手法の概要

遺伝子発現を解析するためには、目的の遺伝子を細胞に導入しなければならない。細胞工学的な立場から遺伝子の導入法を三つに分けることができる (表 1)。これを基準にし、発生工学的手法を分類できる (表 1)。遺伝的に異なった二つの受精卵由来の初期胚どうし、あるいは一方は多分化能を持つ奇形癌腫細胞 (ECC 細胞) を用いたキメラ胚の作成は、cell-mediated gene transfer といえる。ただ体細胞の場合と違うのは、初期胚では細胞どうしを融合 (fusion) させるのではなく、単に集合 (aggregation) させるだけである。この中には、核移植なども含めることができる。chromosome-mediated gene transfer も、ECC 細胞と他の細胞とをあらかじめ細胞融合しておき染色体を導入しておくことによって行うことができる。単離した染色体を直接初期胚に注入しようとの試みもあるがまだ成功していない。DNA-mediated gene transfer は、体細胞の場合と全く同じように行うことができる。ただ初期胚の場合は、DNA の導入にはマイクロインジェクション法を用いる必要がある。

2. キメラ動物作成による遺伝子発現の解析

ヒトにおける網膜色素変性のモデル動物がラットで見いだされており、常染色体性劣性遺伝様式をとり遺伝子記号は rdy である。このラットでは網膜が変性してくるが、網膜を構成している色素上皮と光受容体細胞のどちらでこの rdy 遺伝子が発現しているのかが不明であった。Müllen ら (1976) は、この点を明らかにするために正常なラットとの間でキメラを作成して解析した。もし、rdy 遺伝子が色素上皮細胞内で発現している結果、網膜が変性してくるとすれば、rdy/rdy 由来の色素上皮の

表 1

1. Cell mediated gene transfer: Embryo-embryo chimera
Embryo-ECC chimera
Nuclear transfer
2. Chromosome mediated gene transfer: Embryo-ECC chimera
Chromosome injection
3. DNA mediated gene transfer: DNA injection into fertilized eggs
Embryo-ECC chimera

ある部分だけが変性してくるはずである(図 1-a). もし, 光受容体細胞で発現しているとすれば, 色素上皮と関係なく *rdy/rdy* 由来の光受容体細胞が変性してくるはずである(図 1-b). また, もし, 色素上皮と光受容体細胞の両方で発現している結果変性がおけるとすれば, 両方が *rdy/rdy* 由来の部分のみで変性がみられるはずである(図 1-c). この *rdy/rdy* ラットは, 幸運なことに, 色素の色が黒ではなく薄い灰色がかかったピンク色をしているため, 正常な色素上皮と容易に区別することができる. したがってキメラを作成し, その網膜を組織学的に調べることにより, 上記の三つの型を容易に判別できるのである. 実際にキメラを作成し調べたところ, 表 1-a と一致する結果を得, *rdy* 遺伝子が色素上皮で発現していることが確認されたためである. このように典型的には, ある形質が二つの細胞間の相互作用で決定されている場合, どの組み合わせのときに発現してくるかを調べることにより目的の遺伝子がどちらの細胞で発現しているかを決定することができる. そして場合によっては, 発生段階のどの時期に発現してくるかを解析することができる(Yamamura and Markert, 1981).

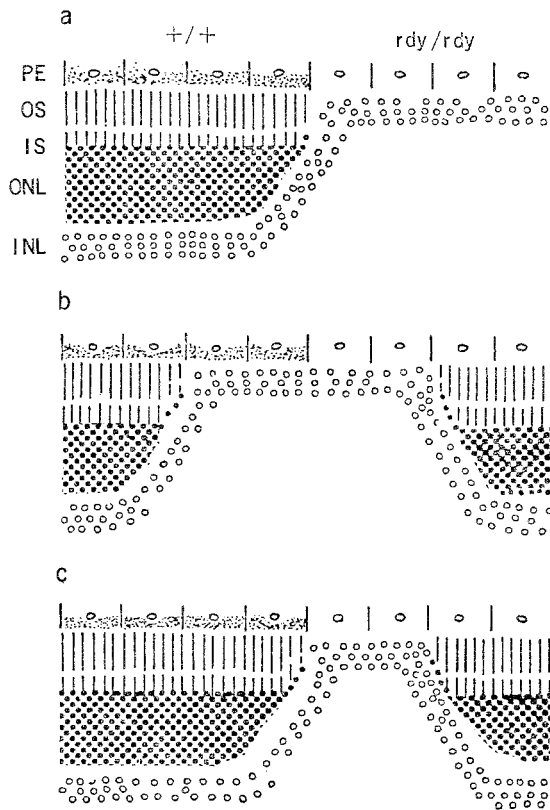


図 1 キメララットで起こると予想される変性のパターン
rdy 遺伝子が, (a) 網膜色素上皮で発現している
 場合, (b) 光受容体で発現している場合, (c) 両方
 で発現している場合.
 PE, pigment epithelium; OS, outer segment; IS,
 inner segment; ONL, outer nuclear layer; INL,
 inner nuclear layer. (Mullen & Lavail, 1976)

しかし、この方法の問題点は、ヒトの疾患のモデルとなる動物を必要とすることと、キメラを作成したとき二つの系統間の細胞を区別するマーカーを持っていない点である。ヒトの疾患のモデル動物はそれほど存在していない。また二つの系統間を区別するマーカーとして、アイソザイムに対するモノクローナル抗体を作成しようとする試みも行われているがまだ成功していない。したがって、手技も簡単で有力な方法ではあるが、まだ応用が限られている。

3. 奇形癌腫細胞の利用による遺伝子発現の解析

奇形癌腫細胞が多分化能を持ち、これと正常な胚との間でキメラを作成することにより、正常な個体にまで発育することが示されて以来 (Brinster, 1974; Mintz and Illmensee, 1975), 非常に期待されている手法である。その利用法としては現在二通りが考えられている。第一は、Dewey ら (1977) によって示されたように、代謝異常等のモデル動物を作りうる可能性である。奇形癌腫細胞をあらかじめ変異原物質で処理し突然変異をおこしておき、このあと例えば 8-アザグアニンを含む培養液中で培養することによりヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損株 (HGPRT⁻) を選択する。これを用いて、キメラを作成することにより、HGPRT⁻ となった細胞も生殖細胞へと分化することが期待される。このキメラマウスを用いて子孫を作れば、Lesch-Nyhan 症候群のモデル動物を作成することができるはずである。第二の方法は、Illmensee ら (1978) によって示されたように染色体を導入することである。奇形癌腫細胞を他の体細胞と融合させておき、これを用いてキメラを作成する。こうすれば染色体異常のモデル動物を作製することもできるし、あるいは他の種、例えばヒトの細胞と融合させることによりヒトの染色体を取り込んだマウスを作製することもできる。

この手法の問題点は二つある。第一は、多分化能を持つ奇形癌腫細胞の取得自体の困難さである。培養自体に相当注意を払わないと多分化能を失ってしまったりする。第二は、奇形癌腫細胞が生殖細胞にも分化しうることは確認された (Stewart and Mintz, 1981) もの、その確率は低いということである。つまりキメラマウスは手に入れることはできるが、次の世代を作ってモデル動物を手に入れることがたいへん困難な状況となっている。実際、まだモデル動物はできていない。以上のような点が改良されれば非常に有力な方法となるであろう。

4. クローン化した遺伝子の受精卵への導入

Gordon ら (1980) によって初めて行われたこの方法は、検討されねばならない多くの点を残しているが、分子生物学の進歩があって可能となったといえる。

受精して卵子および精子由来の前核が形成された後に、精子由来の前核に DNA を直接マイクロインジェクションする方法が主として取られている。精子由来の前核は通常、卵子由来の前核よりも大きく容易に見分けることができる。精子前核に注入する理由は、受精後卵子側の要因によって、精子中の DNA を非常に密な状態で折りたたむために必要であったプロタミン性蛋白が取り去られヒストン蛋白でおきかえる現象がおこるが、このときに外来性遺伝子が存在すると取り込まれやすいといわれているためである (Wagner *et al.*, 1981)。

今までの報告を要約すると、注入する遺伝子のコピー数は、約 100~30,000 で、量は約 1~2 pl である。DNA の大きさは、プラスミドに組み込んだ場合は約 5~18 キロベース (kb) で、ファージを使用しているときは 48.5 kb である。報告のうち最大のものは、この 48.5 kb のもので、この中に約 18 kb のラビットの β -グロビン遺伝子が含まれている。注入の操作で生き残るのは 50~70% で、通常はただちに偽妊娠させた里親の卵管内へ移入する。この移入した胚が着床し、胎児ないしは子供が得られる確率は 8~30% くらいである。注入する DNA 量が多く粘度が高いと死ぬ確率が高い (Gordon and Ruddle, 1981)。また、死産や子宮内胎児死亡も観察されることもある。胎児ないしは

生まれた子供のうち、注入した遺伝子が取り込まれている確率は、3~40% くらいである。この差のみられる原因が、単に偶然なのか、何か注入する遺伝子の質的な相違なのかは今のところ不明である。しかし、胎児で調べたときの確率は高いが、生まれてきた子供を調べたときの確率は低いこともあり (Wagner *et al.*, 1981 と Stewart *et al.*, 1982 を参照)、取り込まれることにより生まれてこないということもおこっている可能性がある。取り込まれた遺伝子の発現する確率は、各研究グループによって著しく異なり、発現を確認していないところもある。発現が確認されているのは三つのグループによってである (Wagner *et al.*, 1981; Wanger *et al.*, 1981; Brinster *et al.*, 1981; Palmiter *et al.*, 1982)。

注入した遺伝子の取り込まれる時期は、注入直後のようである。なぜならば、取り込まれた遺伝子は、体の各組織の全部でその存在を確認でき、次の世代へは約 50% の確率で伝達されているからである。しかし、場合によっては、モザイクとなったりしているのも、このときにはもっと遅い時期に取り込まれるようである。取り込まれるときには、単一のコピーの場合もあるが、タンデムに配列し取り込まれることもある。また、かなり変化を受けて取り込まれることもある。コピー数は、1~150 と、バラついている。取り込まれた染色体を確認しているのは Constantini と Lacy (1981) のみであるので、取り込まれ方に何か法則性があるのかどうかは不明である。以上のように、どのグループにおいても外来遺伝子の取り込みが行われることは確認されている。

現在までのところ、この手法を使って遺伝子発現の解析を試みるための二つの動きがある。一つは、プロモーター部分も含んだままの DNA を取り込ませて、その発現をみようという試みである。E.F. Wagner らは、チミジンキナーゼ (TK) の発現を胎児で確認している。また、T.E. Wanger らは、ラビットグロビンの発現をマウスの赤血球で確認している。TK の場合は、本来どの細胞でも発現されているので組織特異的発現をみるのには適していない。この意味ではグロビン遺伝子は、赤血球でのみ発現されているので実験に適しているといえる。もう一方の試みは、Brinster ら (1981) によって行われている。すなわち、カドミウムやステロイドホルモンによって制御を受けることわかっているメタロチオネイン I 遺伝子 (MT-I) のプロモーター/レギュレーター部分を直接 HSV-TK

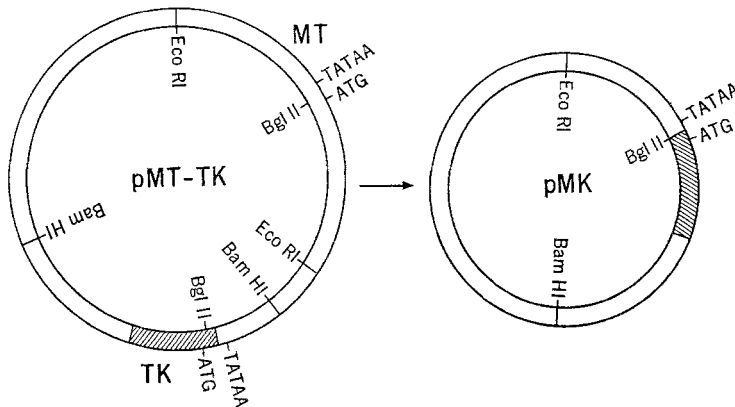


図 2 Brinster ら (1981) の用いた組み換え DNA

pBR322 の BamHI site に TK gene を、Eco RI site に MT gene をいったん組み込んだのち、Bgl II で処理し、MT gene のプロモーター部分が直接 TK gene に接続させてある。

遺伝子に接続したもの(図2)を用いており、このような遺伝子を導入したときにその発現が、カドミウムなどによって誘導されるかどうかを調べている。そして、その発現は必ずしも同じように発現されているわけではないが、あるマウスにおいてはその発現とメチル化との間に相関関係のあったことを報告している。

私たちが、すでに再構成をおこした後のヒトの免疫グロブリン遺伝子を導入する試みを行っており、その取り込みをすでに確認している。免疫グロブリン遺伝子の場合、Bリンパ球のみで発現し、しかも allelic exclusion という現象がおこるので、これらの調節機序を明らかにするのが私たちの研究の目的であり、このためには遺伝子のマウス受精卵への導入という手法が有力であると考えている(なお、私たちが取り込みを確認した遺伝子は、Charon 4A に組み込んで増やしたあと、ヒトの遺伝子部分のみを切り出したものである。ベクターに組み込んだままの DNA は、組み換え DNA 実験として、文部大臣の個別申請を必要とするので現在申請中であり、まだ行っていない)。

以上述べたように、外来遺伝子のマウス受精卵への導入は、未知の部分も多く、はたして本当にこの手法を用いて遺伝子発現を解析しうるのか不明である。しかし、私たちは重要な手法だと考えており、実験系として確立している。最後の、ヒト免疫グロブリン遺伝子のマウス受精卵への導入の仕事は、当大学の第3内科学教室、病理病態学教室、遺伝学教室との共同研究である。

REFERENCES

- Brinster, R.L. 1974. The effect of cells transferred into the mouse blastocyst on subsequent development. *J. Exp. Med.* **140**: 1049-1056.
- Brinster, R.L., Chen, H.Y., Trumbauer, M., Senear, A.W., Warren, R., and Palmiter, R.D. 1981. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell* **27**: 223-231.
- Cline, M.J., Stang, H., and Mercola, K. 1980. Gene transfer in intact animals. *Nature* **284**: 422-425.
- Constantini, F., and Lacy, E. 1981. Introduction of a rabbit β -globin gene into the mouse germ line. *Nature* **294**: 92-94.
- Dewey, M.J., Martin, D.W., Jr., Martin, G.R., and Mintz, B. 1977. Mosaic mice with teratocarcinoma-derived mutant cells deficient in hypoxanthine phosphoribosyltransferase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**: 5564-5568.
- Gordon, J.W., Scangos, G.A., Plotkin, D.J., Barboza, J.A., and Ruddle, F.H. 1980. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77**: 7380-7384.
- Gordon, J.W., and Ruddle, F.H. 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science* **214**: 1244-1246.
- Illmensee, K., Hoppe, P.C., and Croce, C.M. 1978. Chimeric mice derived from human-mouse hybrid cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **75**: 1914-1918.
- Mercola, K.E., Stang, H.D., Browne, J., Salser, W., and Cline, M.J. 1980. Insertion of a new gene of viral origin into bone marrow cells of mice. *Science* **208**: 1033-1035.
- Mintz, B., and Illmensee, K. 1975. Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **72**: 3585-3589.
- Mullen, R.J., and Lavail, M.M. 1976. Inherited retinal dystrophy: primary defect in pigment epithelium determined with experimental rat chimeras. *Science* **192**: 799-801.
- Palmiter, R.D., Chen, H.Y., and Brinster, R.L. 1982. Differential regulation of metallothionein-thymidine kinase fusion genes in transgenic mice and their offspring. *Cell* **29**: 701-710.
- Stewart, T.A., and Mintz, B. 1981. Successive generations of mice produced from an established culture line of euploid teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 6314-6318.
- Stewart, T.A., Wagner, E.F., and Mintz, B. 1982. Human β -globin gene sequences injected into

- mouse eggs, retained in adults, and transmitted to progeny. *Science* **217**: 1046–1048.
- Wagner, E.F., Stewart, T.A., and Mintz, B. 1981. The human β -globin gene and a functional viral thymidine kinase gene in developing mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 5016–5020.
- Wagner, T.E., Hoppe, P.C., Jollick, J.D., Scholl, D.R., Hodinka, R.L., and Gault, J.B. 1981. Microinjection of a rabbit β -globin gene into zygotes and its subsequent expression in adult mice and their offspring. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**: 6376–6380.
- Yamamura, K., and Markert, C.L. 1981. The production of chimeric rats and their use in the analysis of the hooded pigmentation pattern. *Develop. Genet.* **2**: 131–146.