

# 突然変異コンディショナルノックインマウスの作製

医学系部門 生命科学実験班

山崎憲政

## 1. はじめに

私は原爆放射線医科学研究所の動物実験系(組織再生制御研究分野-疾患モデル解析研究分野)の技術職員として、主に遺伝子改変マウスの作製の業務に携わってきた。

作製する遺伝子改変マウスは、主に放射線障害の一つである白血病に関連すると考えられる変異遺伝子を導入し、ヒト検体では困難である疾患の分子メカニズムを詳細に解析することを目的とする。

## 2. 遺伝子改変マウス

遺伝子改変マウスの作製法は受精卵にターゲティング DNA をマイクロインジェクションするトランスジェニックマウス(遺伝子導入マウス)と、あらかじめ遺伝子組換えを施したES細胞を受精卵にインジェクションして作製するノックアウト/ノックインマウス(標的遺伝子組換えマウス)などがある。

前回の技術研修会ではBCR/ABLトランスジェニックマウスの作製と解析について発表を行ったので、今回はES細胞を用いたジーンターゲティングにより、定常状態で正常型の遺伝子を発現し、薬剤誘導的に、組織特異的に変異型の遺伝子を発現するコンディショナルノックインマウスの作製をテーマにする。

## 3. CBL 遺伝子

遺伝子変異は放射線や発がん物質などの変異原により高確率で発生し、異常なタンパク質を発生させることにより疾患の原因となることがある。

近年のゲノムワイドな遺伝子変異解析により造血器腫瘍を含むヒト悪性腫瘍に様々な遺伝子の変異が報告されていて、骨髄単球性白血病(CMML)患者のサブセットにおいて、CBL 遺伝子の変異(Q367P: CBL がコードするアミノ酸、367 番目のグルタミンがプ

ロリンに置換される)が同定された(Ogawa S. et al. Nature. 2009).

	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387
WT-DNA	GAA	CAA	TAT	GAA	TTA	TAC	TGT	GAG	ATG	GGC	TCC	ACA	TTC	CAA	CTA	TGT	AAA	ATA	TGT	GCT	GAA	AAT
CBL	E	Q	Y	E	L	Y	C	E	M	G	S	T	F	Q	L	C	K	I	C	A	E	N
CBL(Q367P)	E	P	Y	E	L	Y	C	E	M	G	S	T	F	Q	L	C	K	I	C	A	E	N
Q367P-DNA	GAA	TCA	TAT	GAA	TTA	TAC	TGT	GAG	ATG	GGC	TCC	ACA	TTC	CAA	CTA	TGT	AAA	ATA	TGT	GCT	GAA	AAT

図1. CBL<sup>Q367P</sup>

CBL 遺伝子はE3 ユビキチンリガーゼ酵素をコードし、細胞増殖抑制制御を行うがん抑制遺伝子である。

CMML 発病における突然変異 CBL の寄与を解析することを目的として、変異型 CBL コンディショナルノックインマウス(CBL-mt-cKI マウス)の作製を行った。

## 4. ターゲティングベクター

始めにES細胞にDNAを挿入するためにターゲティングベクターを調製する。

大腸菌内で増殖させるための Ori と、アンピシリン耐性遺伝子が組み込まれた pBluescript(Stratagene社)をベースにしてES細胞への導入後のセレクション用にジフテリアトキシンの A サブユニット遺伝子(DTA),Flpe リコンビナーゼ用 FRT で挟んだネオマイシン耐性遺伝子(FRT(2)NeoR),後天的に Cre リコンビナーゼを発動するための loxP 配列を含んだ [AP+DTA\_loxP1\_loxP\_FRT\_NeoR\_FRT]を用いた。

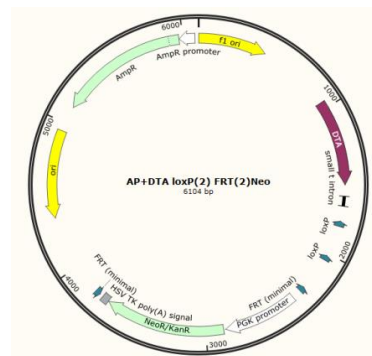


図2. ベクターカセットマップ

このベクターの DTA の下流と NeoR 下流にマウス Cbl 遺伝子領域内で相同組換えを誘導するための相同配列を組み込んだ。

loxP1 と loxP2 の間に正常型 CBL, loxP2 の下流に変異型 CBL を組み込んだ。

両者の cDNA 上流にはスプライシングアクセプターなどスプライシングに関係する配列を含んだ Cbl ゲノム配列, cDNA 下流には転写された mRNA の安定化と転写終了シグナルを含む poly(A)シグナルを挿入し, ES 細胞へ導入するターゲティングベクター [AP+ DTA\_5' arm\_loxP1\_Cbl-genome\_WT-cDNA\_pA\_loxP2\_Cbl-genome\_mt-cDNA\_pA\_FRT\_NeoR\_FRT\_3' arm]を調製した。

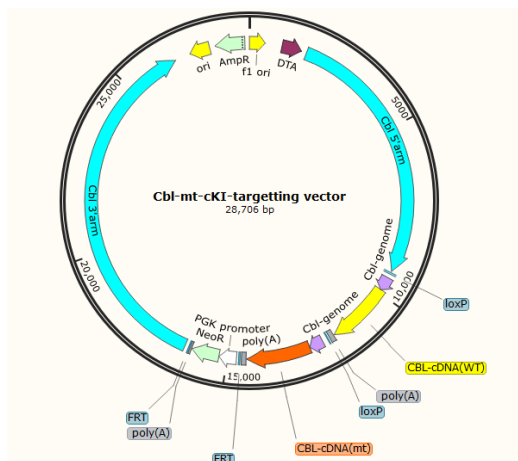


図3. 変異型 CBL-cKI ターゲティングベクター

### 5. ジーンターゲティング

調製したターゲティングベクターをゲノム DNA に導入するためには相同組換えという DNA 修復機構を利用するが,その効率が非常に低く,マウス受精卵に直接導入することはほぼ不可能である。

そこでまず,ES 細胞を  $10^7$  個程度に増やしエレクトロポレーターを用いて細胞膜に穴をあけてターゲティングベクターを細胞内に導入させ,相同組換えにより組換え DNA を挿入させる。

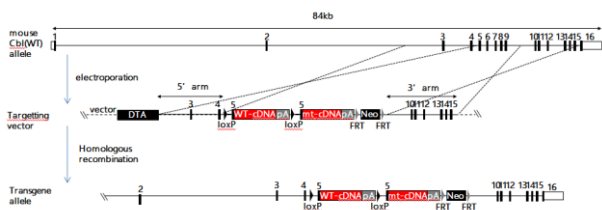


図4. Cbl の相同組換えマップ

ターゲティングベクターがゲノム DNA 内に挿入された ES 細胞は NeoR(+)であり,培養液中に選択薬剤を添加することで抽出することが出来る(陽性選択)。

さらに,ターゲティングベクターが相同組換えにより導入する場合には DTA は相同領域の外側に位置しているためベクターから外れるが,ランダムに染色体に挿入した場合,ターゲティングベクター内に組み込んだ DTA 遺伝子が発現し,その毒素により細胞は死ぬ(陰性選択)。

上記の陽性/陰性選択スクリーニングにより数百個程度の ES 細胞クローンに濃縮される。

### 6. ES 細胞コロニーの選別とジェノタイプピング

残存している数百個の ES 細胞コロニーから ES 細胞能を維持していると見られる状態の良いクローンを選別して顕微鏡下で採取する。(～200 個程度)

次に細胞の一部から DNA を抽出し,PCR と Southern-blot により,予定通りに相同組換えが起こっている ES 細胞を選別する。

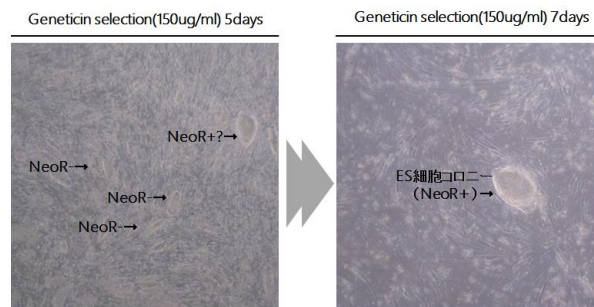


図5. ES 細胞コロニー

PCR はまず,ターゲティングベクターが相同組換えを起こしているかどうか確認するため,相同領域 arm の外側とターゲティングベクター内の配列で挟むプライマーを設計して行う(external-PCR)。

また,スプライシング配列などを含む Cbl-genome 領域や CBL-cDNA 部分で相同組換えが起こる可能性もあるため loxP や cDNA などターゲティングベクター内部配列が外れていないかどうか確認するための PCR, (PCR プロダクトをシーケンス),Southern-blot の追加確認を external-PCR 陽性クローンに対して行う。

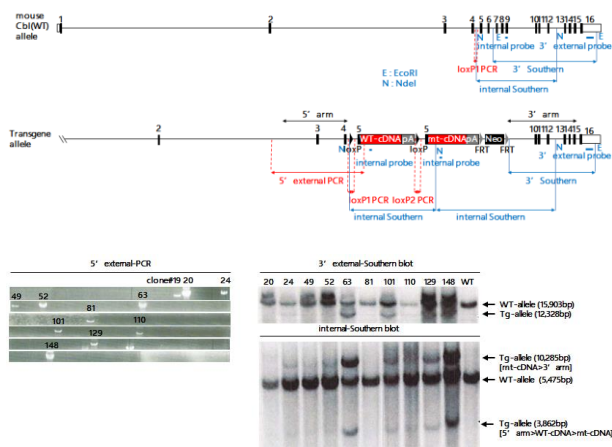


図6. PCR/Southern-blot の設計図と結果

## 7. マイクロインジェクション

PCR/Southern-blot が共に陽性であった ES 細胞クローン調製し、マウス受精卵(胚盤胞)にマイクロインジェクションを行い、偽妊娠レシピエントマウスへ移植した。

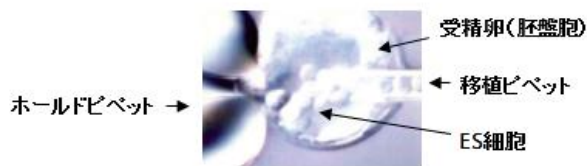


図7. 受精卵への ES 細胞インジェクション

ドナーES 細胞株は 129 系統(白色)でレシピエント受精卵は C57BL/6 系統(黒色)であるため、ES 細胞と受精卵細胞が混ざったキメラマウス(F0)が生まれてきた場合は白色と黒色のモザイク状の様で確認出来る。



図8. キメラマウス(F0 マウス)

無事キメラマウス生まれ、性成熟し、さらにキメラマウス(雄)とC57BL/6(雌)の交配によって生まれたF1 マウスは(129)/(C57BL/6)由来のアグーチ色(野生色)と(C57BL/6)/(C57BL/6)由来の黒色で生まれる。

F1 マウスからアグーチ色のみ選別してDNAを抽出し

て組換え DNA が F1 マウスに伝わっていることを PCR で確認してようやく一安心できる時である。

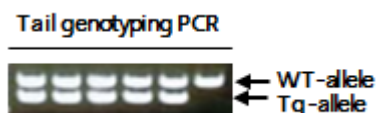


図9. F1 マウスの genotyping-PCR

## 8. Flpe リコンビナーゼ

ES 細胞を薬剤セレクションするためにターゲティングベクター内に NeoR 遺伝子を組み込んでいるが、NeoR 遺伝子発現による影響や染色体立体構造への影響を考慮して余分な遺伝子は除外することが望ましいとされている。

そのため NeoR 遺伝子の両側に FRT 配列が組み込まれていて、Flpe リコンビナーゼ酵素により、2つの FRT 配列で組換えが起こり、間の NeoR 遺伝子は脱離する。

Flpe リコンビナーゼ酵素を発現する CAG-Flpe トランスジェニックマウスと CBL-mt-cKI マウスを交配することで、生まれてくる産仔は NeoR 遺伝子を消失した状態となり、(NeoR[+]アレル) Δ NeoR アレル) NeoR 遺伝子を挟む PCR を設計し確認を行った。

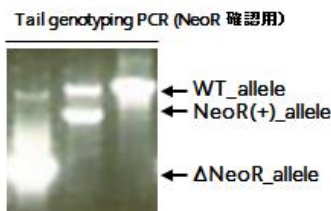


図10. NeoR 遺伝子の欠失を確認する PCR

## 9. Cre リコンビナーゼ

CBL-mt-cKI マウスは正常型 CBL 遺伝子を発現し、野生型マウスとの差は見られない。

Cbl 遺伝子の exon4 までは野生型アレルと同様の配列を持ち、intron4 の 5' スプライシング配列とブランチ配列、組換え DNA 配列中の exon5 上流にある 3' スプライシング配列が結合して、スプライシングは野生型 Cbl-exon4 から正常型 CBL-cDNA の exon5 へ連結され、cDNA の後ろに付加した polyA シグナルで転写は終了し、変異型 CBL は発現しない。

このマウスと Mx プロモーター制御下に Cre リコンビナーゼを発現する Mx-Cre トランスジェニックマウスを交配

し,CBL-mt-cKI/Mx-Cre マウスを産出させた。

Mx1はインターフェロンで誘導されるGTP結合タンパク質であり,定常状態においては CBL-mt-cKI/Mx-Cre マウスは正常型 CBL を発現するが,ポリイノシン-ポリシチジン(plpC)を腹腔内投与することにより,血液細胞において Mx-1 が活性化され Cre リコンビナーゼが発現し,loxPの組換えが起こり,正常型 CBL カセットが脱離する。(ΔWT-CBL-cDNA アレル)

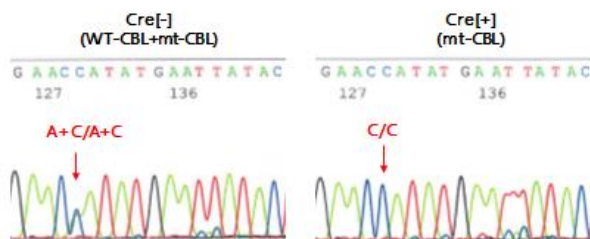


図11. ΔWT-CBL アレルの確認(シーケンス)

ΔWT-CBL-cDNA アレルにおいては Cbl 遺伝子の intron4 の 5'スプライシング配列から変異型 CBL 上流の 3'スプライシング配列までが外れて,スプライシングは野生型 Cbl-exon4と変異型 CBL-exon5へ連結され,変異型 CBL 後方の polyA シグナルで終結する。

つまり,CBL-mt-cKI/Mx-Cre マウスは定常状態では正常型 CBL 遺伝子が発現するが,plpCを投与することにより血液細胞で変異型 CBL 遺伝子が発現する。

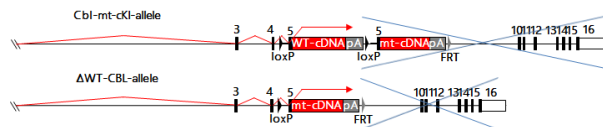


図12. 正常型/変異型 CBL のスプライシング

## 10. マウスの表現型解析

正常型 CBL を発現するマウスと変異型 CBL を発現するマウスの 2 群から定期的に採血し,各種血球などを解析することにより,変異型 CBL 陽性ヒト CMML 検体と同様の症状を呈するかどうかを確認した。

観察の結果,変異型 CBL マウスはヒト CMML と同様の血液異常を発症することが確認できた。

そしてこのマウスを用いた CMML 発症に至る分子メカニズムを解析する解析を行った(Nakata Y. et. al. Blood. 2017)。

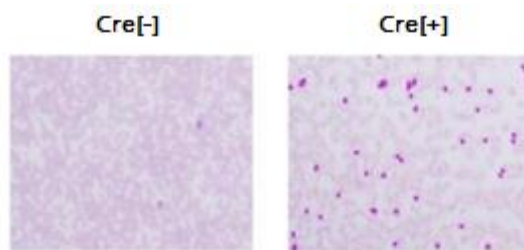


図13. 末梢血ライトギムザ染色(紫=白血球)

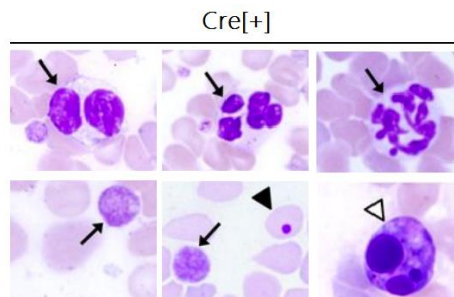


図14. 白血球の形態異常

## 11. 遺伝子改変マウスの作製と技術職員

遺伝子改変マウスの作製は非常に多くの行程と時間と費用を必要としながら,医学研究にとっては研究手段の一つでしかなく,論文では supplemental data として少し掲載される程度である。

そのような煩雑な作業を多忙な教員の代わりにしてくれる人がいる-それがこの分野の技術職員の役割だと考えている。

近年,ゲノム編集技術 CRISPER/Cas9 システムの登場により ES 細胞を用いない遺伝子改変マウスの作製へ移行されつつある(大型サイズの複雑なノックインに関しては,まだ ES 細胞を用いたジーンターゲティングが優勢?)。

長期間絶やすことなく行ってきた ES 細胞培養から解放されたことに一喜一憂しながら,新たな業務に対応するため,日々努力しています。

## 12. 参考文献

Nakata Y, Ueda T, Nagamachi A, Yamasaki N, Ikeda KI, Sera Y, Takubo K, Kanai A, Oda H, Sanada M, Tsuji K, Ebihara Y, Wolff L, Honda ZI, Suda T, Inaba T, Honda H.:Blood,129(15):2148-2160,2017.