

シンポジウム

病理領域における新しい解析方法の導入
 遺伝子改変動物を利用した形態形成機構の解明

東京女子医科大学 解剖学・発生生物学

ヨコヤマ タカノ ヒコ彦

(受付 平成8年1月29日)

**Genetically Engineered Animal as a Tool to Study
 Mechanisms of Morphogenesis**

Takahiko YOKOYAMADepartment of Anatomy and Developmental Biology,
Tokyo Women's Medical College

Though left and right of our body have symmetrical outlook, almost all inside organs are asymmetrically arranged such that the dextral looping of the heart in vertebrate development, variations in the number of lung lobes on the two sides in mammals and the direction of the gut rotation. Determination of right and left has been proved to be genetically controlled. Genetic mutants which affect the left-right asymmetry have a tremendous value to elucidate the left-right formation.

Advancement of molecular biology and embryo handling have made it possible to produce genetically engineered animals. By random mutagenesis using microinjection of the tyrosinase minigene into mouse one cell stage embryos, we created a new situs inversus (*inv*) mutation. The *inv* homozygous mice for the transgene (*inv/inv*) showed nearly 100% reversal of left-right polarity. Previously reported *iv/iv* mutant reverses left-right polarity approximately 50%. No more than 50% of experimentally manipulated amphibian and mouse embryos produces situs inversus phenotype. Based on consistent reversal of left-right asymmetry in our new situs inversus mutation, we proposed the possible existence of a default or pre-existent pathway for left-right asymmetry.

The *inv* locus has been found on mouse chromosome 4, determined by linkage analysis and FISH (fluorescein in situ hybridization) study. The approach to isolate the gene was discussed.

はじめに

我々の身体は、ひとりひとり微妙な差はあるが基本的形態は共通している。また、この基本的形態は、500年前の人も現在の人も共通している。そして、遺伝学、分子生物学の進歩は、遺伝子がかかるような基本的形態を伝える担い手であることを明らかとした。また、この遺伝子の本体がDNAであることも明らかとなっている。すなわち、我々の身体を建物に例えるならば、遺伝子は設計図に

当たると考えられるわけである。したがって、設計図である遺伝子を変えれば、できあがってくる建物、すなわち形態も変化させることができるわけである。

現在、我々は分子生物学の発展により、遺伝子を自由に組み替えることができるようになった。また、発生工学の進歩により、この組み替えた遺伝子を自由にゲノムに挿入し、さらに組み替えられた遺伝子を持つ動物(遺伝子改変動物)を作製

する手段を手に入れるに至った。このことが、形態形成機構解明のために遺伝子改変動物を利用する理論的根拠となるわけである。

人をはじめとして脊椎動物の形態は、前後軸、背腹軸そして左右軸によって決定される。すなわち、前後軸によって、頭部は前に、尾部は後ろに位置することが決定され、背および腹は背腹軸によって決定される。また、左右は外見上は対称であるが、ほとんど全ての内部臓器が、その形、位置または機能において左右非対称であることに気付かれると思う。例えば、心臓や胃は常に左側に、右肺は左肺より肺葉の数が多いということが観察される。このような左右非対称性を決定するのが左右軸である。

本稿においては、このような形態形成機構の解明のために遺伝子改変動物がどのように利用されているかについて、また我々の形態、特に左右非対称性がどのようにして生じてくるかという問題を論じる。

1. 遺伝子改変動物の作製

様々な動物を対象として、遺伝子改変ということが行われてきているが、ここでは、研究に最も多く用いられているマウスを対象とする。また、遺伝子改変マウスの作製手技に関しては、すでに多くの成書¹⁾があるので、それらを参考にさせていただきたい。

遺伝子改変マウスの作製はその手技は様々あるが、表1のように標的となる遺伝子が既知の場合と未知の場合に分類して紹介する。

まず、標的となる遺伝子が既知の場合(表1のI)形態形成に関与していると考えられる場合、その遺伝子を過剰発現させたり、破壊してしまうことにより、決定的な情報を得ることができる。このようにして脊椎動物の形態形成に関与してい

ることが確認された遺伝子としてHox遺伝子が有名である。例えば、Hoxa-2遺伝子を破壊すると、第2鰓弓由来の構造(アブミ骨、茎状突起)が消失し、その代わり、第1鰓弓由来の構造(ツチ骨、キヌタ骨)がもう一つ形成され、いわゆる、ホメオティック変異を生じる²⁾。Hoxa-2遺伝子以外にも他のHox遺伝子の変異を持った遺伝子改変動物が作製され、主として前後軸方向のホメオティック変異が起こることが明らかになり、Hox遺伝子が、身体の前後を決定するのに重要であることが明らかにされた。また、最近では、lim-1遺伝子を破壊することにより頭部が形成されなくなることから、この遺伝子は頭部形成に必須であることがわかってきた³⁾。

Hox遺伝子は、はじめはショウジョウバエにおいて形態形成に関与する遺伝子としてクローニングされ、脊椎動物においてもそのホモログがあることがわかり、クローニングされた。そして、上記のように遺伝子改変動物を作製することにより、脊椎動物においてもその形態形成に重要な役割を演じていることが明らかになったわけである。

Hox遺伝子をはじめとして、脊椎動物の形態形成に関与することが遺伝子改変マウスによって明らかにされた遺伝子のほとんどは、ショウジョウバエの遺伝子のホモログとして取られてきたものである。

本稿では、左右の成立機構について論じるのであるが、脊椎動物の左右の決定に関与する遺伝子をショウジョウバエの遺伝子から得ることができようか?残念ながら、ショウジョウバエには脊椎動物にみられるような左右は存在せず、ハエより脊椎動物へ、といったアプローチは成功しそうにない。では、遺伝子改変マウスを利用して左右非対称性形成にアプローチするにはどのようなしたらよいのだろうか?左右を決定すると考えられる遺伝子は、まだ単離されておらず、表1のIのようなアプローチをとることはできない。しかし、このように遺伝子が未知の場合、表1のIIにある挿入変異とか遺伝子トラップ法といった方法を用いることができる。この挿入変異とか遺伝

表1 遺伝子改変動物の作製法

I	遺伝子が既知の場合
	1) 遺伝子導入マウス (トランスジェニック マウス)
	2) 遺伝子破壊マウス (ノックアウト マウス)
II	遺伝子が未知の場合
	1) 挿入変異 (insertional mutagenesis)
	2) 遺伝子トラップ法・エンハンサートラップ法

子トラップ法によりランダムに遺伝子に変異を作製し、表現型に基づいてスクリーニングを行い、目的とする変異マウスを探し出すわけである。ただし、これらの場合は遺伝子に変異はランダムに起こり、また、目的とする表現型を得る確率は非常に低いため、スクリーニングなどを工夫する必要がある。

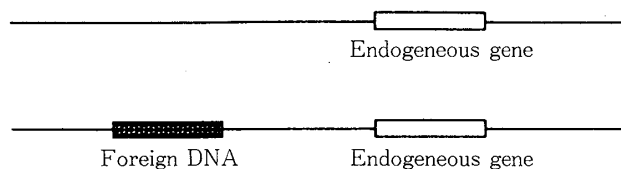
我々は、挿入変異といわれる方法で多くの変異マウスを作製し、その中に左右の逆転するマウスを発見した。まず、挿入変異とはいかなるものなのかを述べる。

2. 挿入変異

遺伝子改変動物においては、マイクロインジェクション法やレトロウイルスを利用した方法等の遺伝子導入法があるが、いずれにしても外来遺伝子をゲノム上に挿入することとなる。そして、標的遺伝子破壊法以外では、外来遺伝子はゲノム上にランダムに挿入されることとなる。そして、通

Integration of foreign DNA

(A)



(B) Insertional mutation

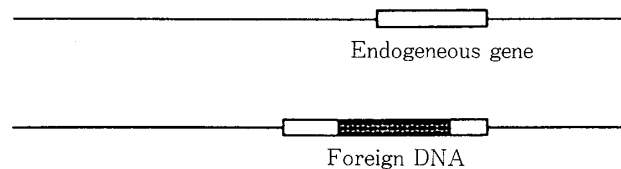


図1 外来遺伝子のゲノムへの挿入
横の棒線はゲノム、白抜き四角の部分は機能を持つ内在遺伝子 (endogeneous gene)、塗りつぶした四角は外来遺伝子 (foreign DNA) を表す。

(A) 挿入が内在遺伝子の発現に影響のない場所に起こった場合

(B) 挿入変異 (insertional mutation) 外来遺伝子が内在遺伝子の中に入り込み、または遺伝子欠失を伴うことにより、その内在遺伝子の発現を阻害する。

常内在遺伝子の発現に支障のない部位に挿入される (図 1A) が、まれに内在遺伝子の発現に重要な部位に挿入され (図 1B)、内在遺伝子の機能を抑制することがある。そして、この内在遺伝子の機能が抑制されたことにより生じた表現型の異常が挿入変異といわれる。

この方法では、表現型を指標にしたスクリーニングを行うことで、望みの変異体を得ることができる。しかしながら、外来遺伝子が挿入することで内在遺伝子の破壊が起こる確率は低く、また内在遺伝子はランダムに破壊されるため、目的とする変異体を得るためには膨大な数のマウスをスクリーニングする必要がある。

中でも、手間がかかる操作の一つは、外来遺伝子が挿入されているかどうかのスクリーニングである。このスクリーニングは、従来はマウスの尾より DNA を抽出し、PCR (polymerase chain reaction) またはサザンハイブリダイゼーションにより外来遺伝子の有無を確認していた。我々は、この過程を簡易化する方法として、導入する外来遺伝子としてチロシナーゼ遺伝子を選んだ。チロシナーゼはメラニン合成の律速酵素であり、この酵素が機能しないと色素産生が起こらない。アルビノマウスでは、この酵素が欠失していることが知られている。我々は、アルビノマウスに正常な機能を持つチロシナーゼ・ミニ遺伝子をマイクロインジェクション法を用いて導入することにより色素産性能が回復するかどうかを調べた。その結果、チロシナーゼ・ミニ遺伝子が導入されたマウスでは色素産性能が回復していた。また、色素産性能が回復したマウスを調べたところ、それらは全て導入したチロシナーゼ・ミニ遺伝子を持っていた。このことより、マウスの尾より DNA を抽出して PCR などで、外来遺伝子の有無を確認する代わりに視覚的に色素産生の有無により外来遺伝子の存在を確認できることがわかった⁴⁾。そして、このスクリーニング法により多くのマウスのスクリーニングが可能となったわけである。

この方法を用いて作製した多くのマウスより一つ一つの家系を確立し、その中でヘミ接合同士を交配させ、形態異常を来すマウスが出現するか否

かを調べた。ヘミ接合同士を交配させる理由は、表現型が劣性遺伝形式にて遺伝する家系を検出するためである。

未知の遺伝子を破壊できるということに加えて、挿入変異の他の特徴は、導入した外来遺伝子を基にして破壊された内在遺伝子を決定することができる可能性があるということである。導入された外来遺伝子は、破壊された内在遺伝子の近傍にあることが当然予想される。したがって、導入された外来遺伝子を手掛かりにして近傍に存在する遺伝子を調べれば、破壊された内在遺伝子を決定できるというわけである。実際、このようにして決定されたいくつかの遺伝子が報告されている⁵⁾⁶⁾。

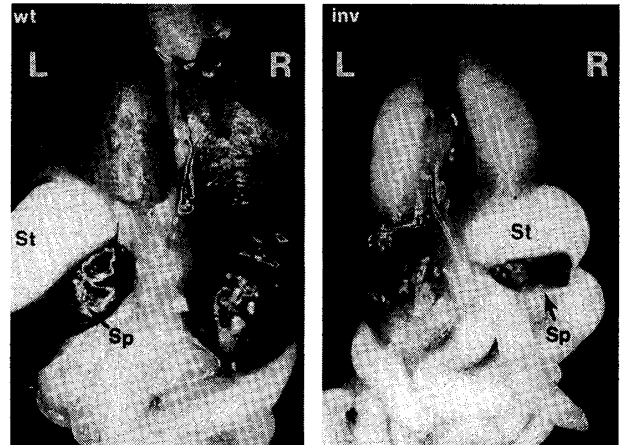
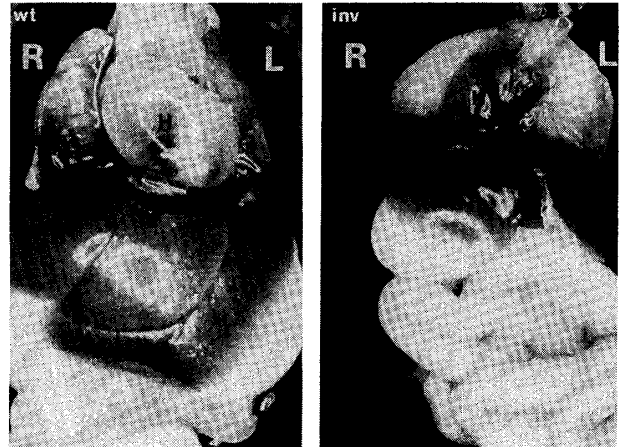
3. 左右非対称性成立機構

前章で述べたように、我々はチロシナーゼ・ミニ遺伝子を導入したトランスジェニックマウスの家系を多数確立し、興味のある挿入変異が生じたものを探していた。その中のマウスの家系の一つ、OVE210と名付けた家系に幸運にもミルクを含んだ胃が右にあるマウスを発見した。

さらに、解剖の結果、胃の位置のみならず、心臓、肝、脾の位置、肺の分葉の数等も左右が逆転していること、すなわち内臓逆位がわかった(図2)。また、この変異マウスは、ヘミ接合同士を交配させて得られた仔の約25%に認められたことから左右を決定する遺伝子の異常がホモになったことから生じたことが考えられた。

この変異体で、導入された遺伝子がホモ接合体になっているか否かを確かめるため、導入したチロシナーゼ・ミニ遺伝子をプローブとして挿入部近傍をクローニングした(図3)。2.0kb Hind II Iフラグメント(p3.2H)を用いてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、この内臓逆位マウスは導入されたチロシナーゼ・ミニ遺伝子がホモ接合となっていることが確かめられた(図4)。すなわち、ヘミ接合同士の交配から得られた仔のうち、アルビノマウスは9.2kbの野生型のバンドを、正常の左右で色素を持つマウスでは9.2kbの野生型のバンドと18kbのトランスジェニックのバンドを持つことが確かめられた。また、調べた限り

VENTRAL VIEW



DORSAL VIEW

図2 野生型および *inv* マウスの内部臓器
 左上：野生型腹側，右上：*inv* 腹側，
 左下：野生型背側，右下：*inv* 背側，
 Sp：脾臓，St：胃，H：心臓。(文献7より引用)

全ての変異マウスがホモ接合体であること、またチロシナーゼ・ミニ遺伝子自体が左右非対称性を逆転させているとは考えにくいことより、外来遺伝子挿入により、左右を決定する遺伝子が破壊されたことによって、左右が逆転したと考えられた。また、発生過程においてマウス胎児は初期にはそっくり返った形をとるが、発生が進むにつれ回転することによりうずくまった形となる。このとき回転方向は、頭部より尾部を向いて時計方向に回転する。その結果、vitelline vesselは胎児の左側に位置することとなる(図5)。回転方向が逆転

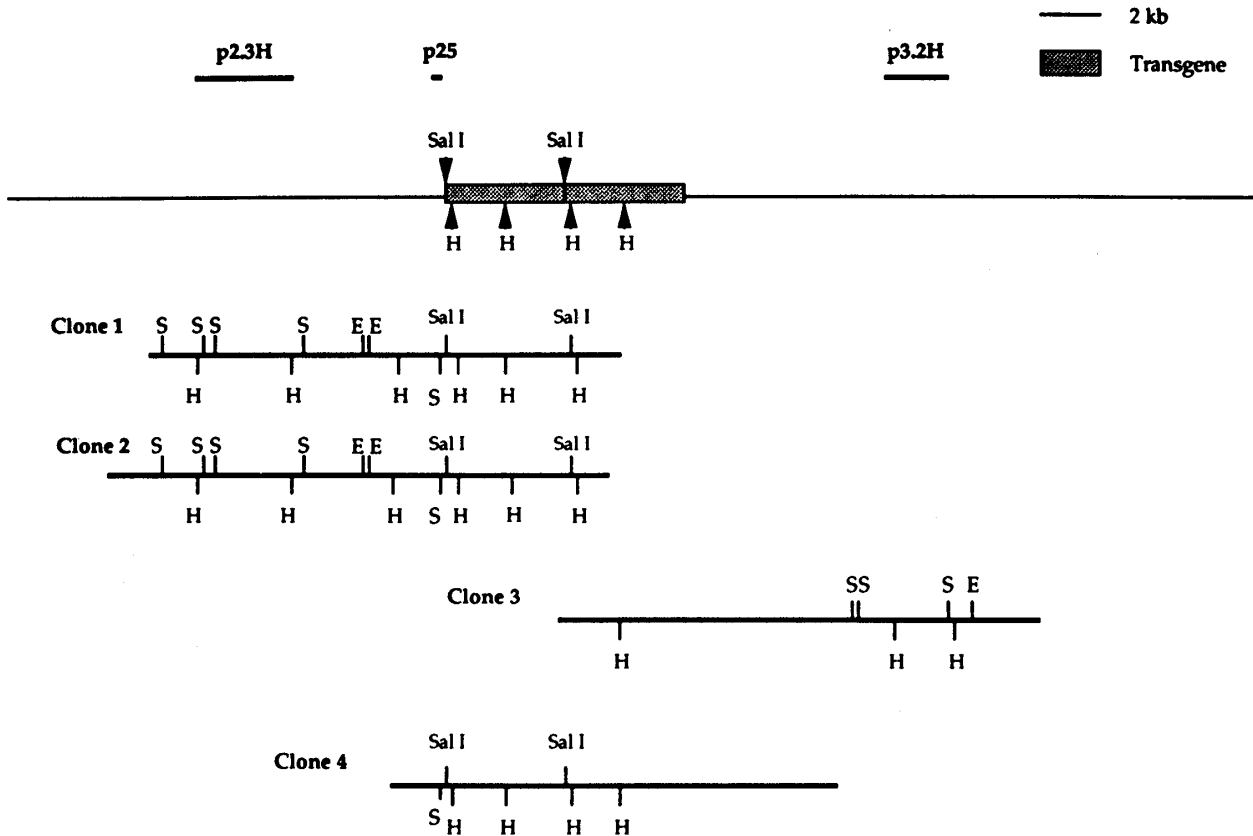


図3 トランスジーン挿入部位の遺伝子地図

変異体の遺伝子ライブラリーより単離された4つのクローン、E: EcoRI, H: Hind III, S: Sat Iの制限酵素部位を示す。(文献7より引用)

すると、vitelline vesselは胎児の右側に位置することとなる。この回転方向を変異マウスで調べたところ、ほぼ全てのホモ接合マウスで回転の向きが逆転していた(図6)。我々は、この変異マウスを*inv* (inversion of embryonic turning)と名付けた⁷⁾。

はじめに述べたように、通常我々の身体は心臓や胃は左に、肝臓は右に位置する。このような内臓の位置が遺伝的に決定されているということは、ヒト、マウスにおいて自然にみられていた左右が逆転する遺伝的変異体の存在より考えられていた。この中でも、マウスの*iv* (inversus viscerum)は、左右形成機構を考える上で重要な役割を果たしてきた。*iv*マウスにおいては、左右の逆転はほぼ半数のマウスに認められる。また、ヒトにおける内臓逆位を示すKartagener症候群でも約半数の患者に左右の逆転が認められる。これら遺伝的な内臓逆位変異体より、左右決定に關与する

遺伝子が破壊されると、左右を決定できなくなったり、左右がランダムに決定されることにより、半数にのみ左右の逆転が起こると考えられてきた。そして、全てに左右の逆転が起こることはないと思われてきた。しかしながら、*inv*変異マウスにおいては、ほぼ全てのホモ接合マウスに左右の逆転が認められ、従来の仮説では説明が付かなかった。そこで、我々は以下のような仮説を提唱した(図7)。

まず、形態形成因子とその受容体の存在を仮定する。*inv*遺伝子はこの形態形成因子の勾配を決定し、*inv*遺伝子が存在しないと、この勾配は逆転してしまう。ただし完全に逆転するのではなく、いくつかはほぼ勾配がない状態に近くなり、このような場合には左右の不完全な逆転が起こる。*iv*遺伝子はこの形態形成因子を関知する受容体であると考えられる。*iv*遺伝子が存在なくなると形態形成因子の勾配を関知できなくなるため、左右がラ

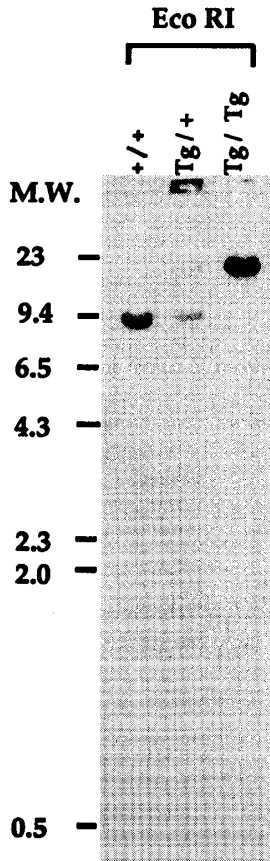


図4 *inv* マウスの RFLP 解析

+/+ : 野生型, Tg/+ : ヘミ接合体, Tg/Tg : ホモ接合体. プロンプ p3.2H によるサザンハイブリダイゼーション. DNA は EcoRI で消化してある. 左側は, Hind III のサイズマーカー. (文献7より引用)

ンダムに決定されたり, 左右が決定されなくなるため, 約半数にのみ左右の逆転が起こると考えられる. この仮説から, *iv*, *inv* の両遺伝子が機能しないと *iv* 遺伝子が機能しない場合と同様な表現型, すなわち半数のみに左右の逆転が起こることが考えられるが, 実際にそのようになっていた.

4. 変異体より遺伝子へポジショナルクローニング

では, *inv* 遺伝子はどのような遺伝子であろうか? 現在, まだこの遺伝子はクローニングされていない. 挿入変異の章で述べたように *inv* 遺伝子も挿入された外来遺伝子の近傍に存在すると考えられる. 以下, どのようなアプローチで遺伝子のクローニングが進められていくかを紹介する.

1) どのマウス染色体に外来遺伝子が挿入されているかを調べる.

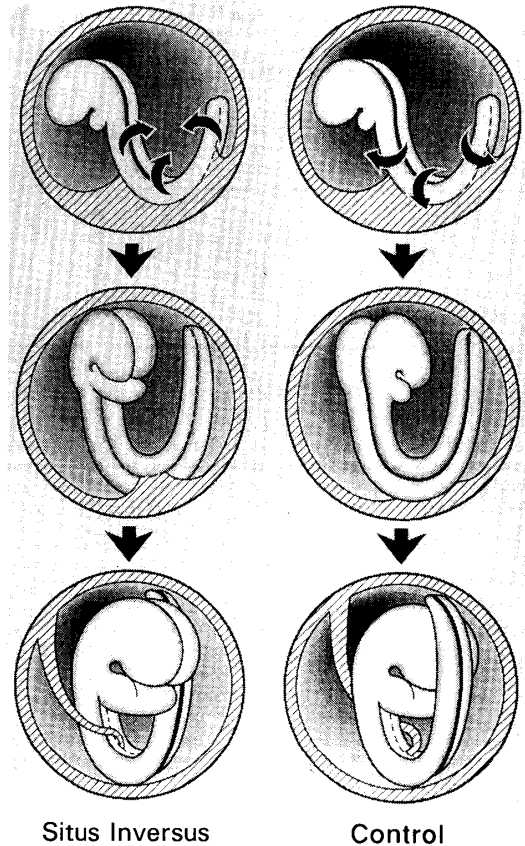


図5 embryonic turning の模式図

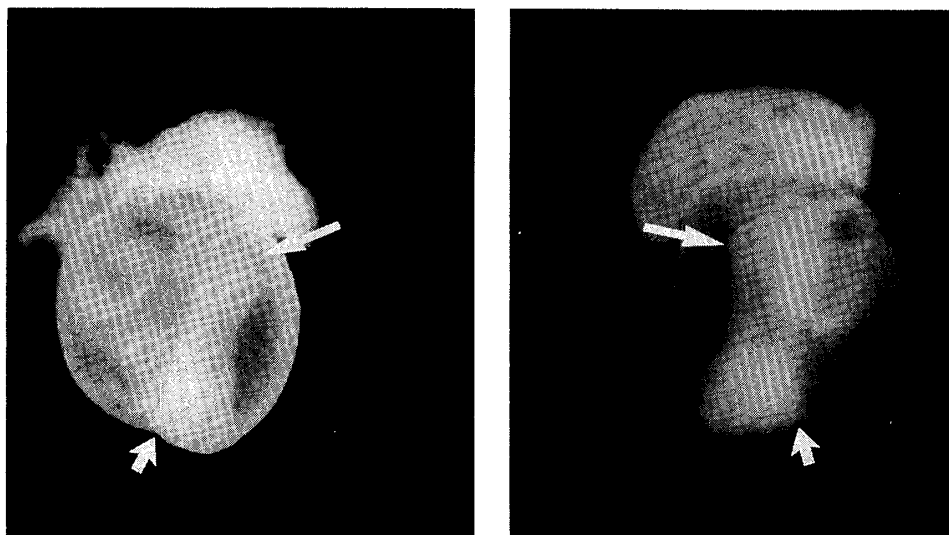
右のパネルは野生型の embryonic turning を示す. 回転方向は, 頭から尾を見て時計回りに回転し, その結果, vitelline vessel は胎仔の左側に位置する. 左のパネルは, *inv* 変異体で反時計方向に回転し, vitelline vessel は胎仔の右に位置する. (文献7より引用)

2) 挿入部近傍をクローニングし, 外来遺伝子がどのような形でゲノムに組み込まれているかを明らかにする.

3) 遺伝子欠失や組み換えが起こっている部位より転写領域を同定する.

4) 転写領域より全長の cDNA をクローニングし, 目的の遺伝子であるか否かを確認する.

まず, *inv* マウスでは外来遺伝子がマウスのどの染色体上に挿入されているかが調べられた. これは, 挿入部近傍より得られたプロンプ p3.2H, p2.3H を用い連鎖解析によりマウス第4番染色体上にあることが決定された. さらに, FISH (fluorescent in site hybridization) でもマウス第4番染色体上に挿入されていることが, 確認された.



Situs inversus

Normal situs

図6 胎生9.5日マウス胎児

左の胎児は *inv* 変異体 (situs inversus), 右の胎児は野生型 (normal situs), 太く短い矢印が vitelline vessel を示す。(文献7より引用)

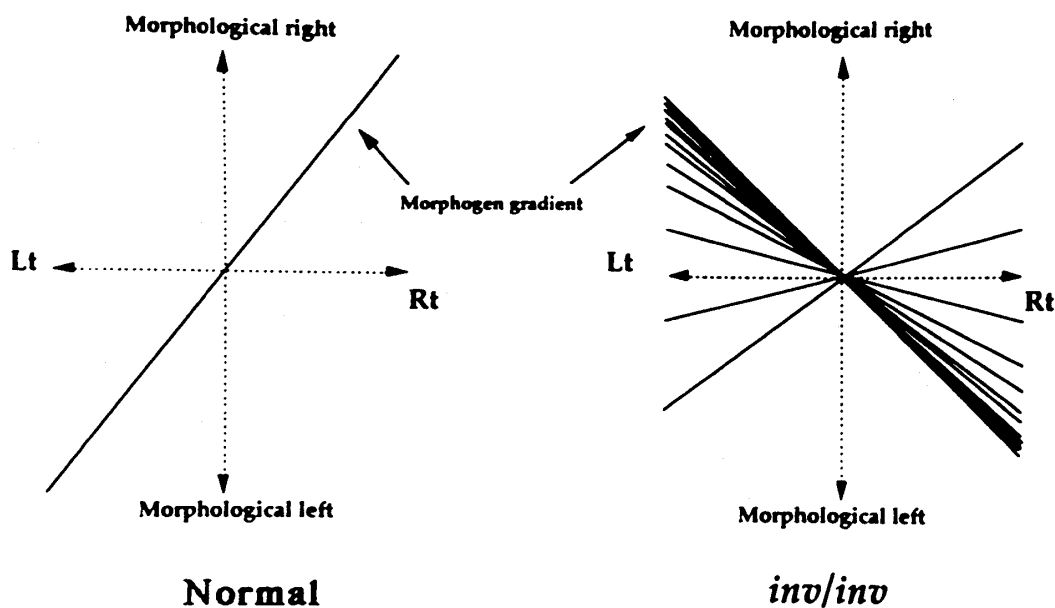


図7 左右非対称性形成の仮説

左：正常。

右：*inv* 遺伝子の機能が消失した状態。太い実線は形態形成因子 (morphogen gradient) の勾配。これが高い状態では、形態的右 (morphological right) または左 (morphological left) が形成される (図では右ができるとしている)。 *inv/inv* ではこの勾配が逆転する。

さらに、ラムダファージ, P1ファージおよび YAC (yeast artificial chromosome) を用いて解析した結果, 遺伝子欠失等があることが分かった。

そして, これらの領域よりエクソン・トラッピング法や cDNA selection といった方法を用いて, 転写領域をみつけられた。

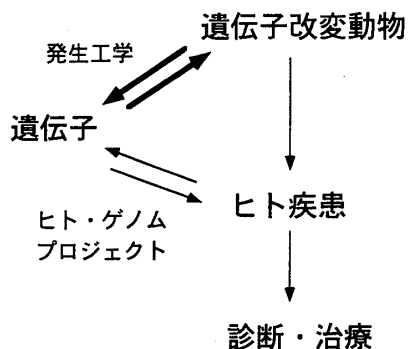


図8 遺伝子，遺伝子改変動物，ヒト疾患のなす関係

現在，これらの領域より全長の cDNA をクローニング中である。inv 遺伝子であることの確認は，2章の遺伝子改変動物の作製で少しふれたが，今度は標的とする遺伝子がわかっているので遺伝子破壊法を用いて確認できる。

おわりに

今まで述べてきたように，遺伝子工学および発生工学の進歩により，我々は，遺伝子を自由に改変し，そして改変した動物個体を作製できるようになった。

また，遺伝的変異体より原因遺伝子を究明する方法もヒトゲノムプロジェクトの進展と共に進んでいる。これらをまとめると，図8を描くことができるであろう。図8の太線の矢印のように遺伝子がわかれば，その遺伝子に関する疾患動物を作製できる。また，遺伝的変異体を作製されれば，その変異の原因となる遺伝子を同定することが可能である。

今回は述べなかったが，遺伝的異常を持つ疾患動物の遺伝子が同定されれば，そのヒトの相同遺

伝子をクローニングすることにより，ヒトの疾患を遺伝子レベルで理解することが可能となる。また，ヒトの疾患遺伝子が同定されればマウス等の動物の遺伝子を改変して疾患モデルを作製することができるようになる。このようなアプローチは，ヒトの疾患を理解する上で非常に強力な手段となるであろう。

文 献

- 1) Hogan B, Beddinton R, Constantini F: Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual. 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1996)
- 2) Rijili FM, Mark M, Lakkarojin S et al: A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption on Hoxa-2, which acts as a selector gene. Cell 75 : 1333-1349, 1993
- 3) Shawlot W, Behringer RR: Requirement for Lim 1 in head-organizer function. Nature 374 : 425-430, 1995
- 4) Yokoyama T, Silversides D, Waymire KG et al: Conserved cysteine to serine mutation in tyrosinase is responsible for the classical albino mutation in laboratory mice. Nucleic Acids Res 18 : 7293-7298, 1989
- 5) Zhou X, Benson KF, Ashar HR et al: Mutation responsible for the mouse pygmy phenotype in the developmentally regulated factor HMGI-C. Nature 376 : 771-774, 1995
- 6) Woychik RP, Stewart TA, Davis LG et al: An inherited limb deformity created by insertional mutagenesis in a transgenic mouse. Nature 318 : 36-40, 1985
- 7) Yokoyama T, Copeland NG, Jenkins NA et al: Reversal of left-right asymmetry—a situs inversus mutation. Science 260 : 679-682, 1993