

遺伝子改変マウスの作製と解析

医学系部門 生命科学実験班

山崎 憲政

1. はじめに

現在所属している研究室では、遺伝子改変動物を用いた遺伝子の生物学的機能の解析およびモデル動物を用いたヒト疾患病態生理の解明を目的に遺伝子改変マウスの作製、解析を行っている。

私は当研究室において研究支援として遺伝子改変マウスの作製、マウスの飼育管理、マウスの解析まで一連の実験や、またその一部を担当している。

2. 遺伝子改変マウスの作製

(1) 組換え DNA の作製

病気(主に白血病)に関係するとされる変異遺伝子を人工的に作製する。DNA を切断する制限酵素、連結するリガーゼ、伸長させるポリメラーゼなど遺伝子工学に用いる各種酵素を用いて目的に合った DNA 配列を調製する。

(2) 遺伝子ターゲティング

特定の場所で遺伝子を組換えるときはジーンターゲティングが必要となる。

マウスの受精卵より採取した胚性幹細胞 (ES 細胞) にエレクトロポレーターで電気パルスを加えることによって一時的に穴を開ける。この穴から DNA が入り込んで相同組換えという機序に従って特定の場所で DNA の組換えが起きる。

(3) マイクロインジェクション

トランスジェニックマウス作製の場合は受精卵に DNA を顕微鏡下で注入する(マイクロインジェクション)。ノックアウト、ノックインマウス作製の場合は受精卵に遺伝子ターゲティングを行った ES 細胞を注入する。マイクロインジェクションを行った受精卵を雌マウスに移植して発生させる。ES 細胞インジェクションを行った場合、受精卵由来の細胞と ES 細胞由来の細胞がモザイク状に混ざったキメラマウスが発生する。

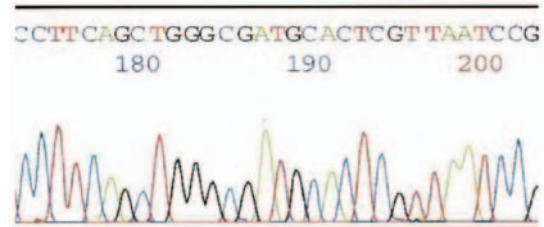


図 1. DNA 配列波形データ

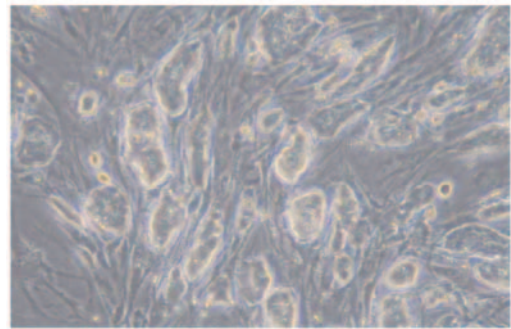


図 2. ES 細胞(位相差顕微鏡 40 倍)



図 3. エレクトロポレーター

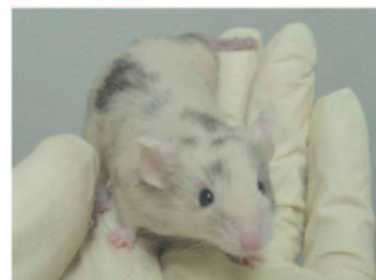


図 4. キメラマウス

3. マウスの維持, 管理

(1) 飼育ケージ交換, 餌等の補給

一週間に一度の頻度で飼育ケージの交換, 餌と水の補給を行う. 担当しているのは 2 部屋分約 200 ケージ.

(2) 観察, 他

定期的にマウスの異常の有無の確認をし, 調子が悪そうなマウスからは採血を行い, 自動血算計で白血球数などを計測, 病気の有無を確認する.

系統維持のための戻し交配, 実験解析用の交配などを行う.

(3) genotyping

約 4 週齢になったマウスの尻尾の先, 約 1cm 程度を採取して DNA を抽出し, PCR, サザンブロットによって導入した変異遺伝子の確認を行う.

4. 表現型解析

変異遺伝子を導入したマウスが思った通りの病気を発症するか, 機能のよくわからない遺伝子変異を導入した場合はどういった影響が出るかを調べる.

(1) 採血

定期的にマウスから数十 μ l 程度の採血を行う. これを自動血算計にて測定, また末梢血スミアの染色も含めて白血病の判定を行う.

(2) 採材

衰弱したマウスを解剖し, 腫瘍組織 (主に脾臓, 胸腺, リンパ節) を単離し固定, 染色して白血病細胞の浸潤を確認する.

また腫瘍組織から細胞 (白血球) を取りフローサイトメーターで分析して, 白血病の種類を同定を行う.

(3) 追加ストレス

単一の遺伝子変異導入で病気が発症しない場合, 得られた遺伝子改変マウスに変化が乏しい場合は関連する別の遺伝子改変マウスとの交配, ウイルス, 変異原物質の投与によって複数の遺伝子変異を与える. または薬剤投与により骨髄細胞に障害を与え, 骨髄の再生能, 成熟分化能の比較などといった手法を用いて導入した遺伝子変異の影響を見やすくする.



図 5. 実験動物飼育室

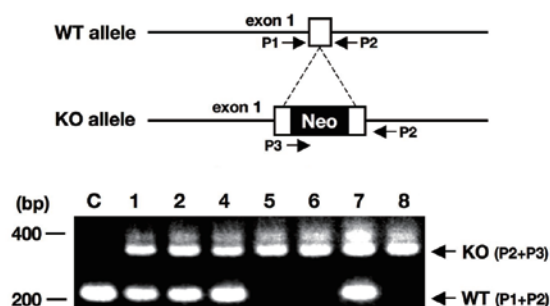


図 6. genotyping (PCR)

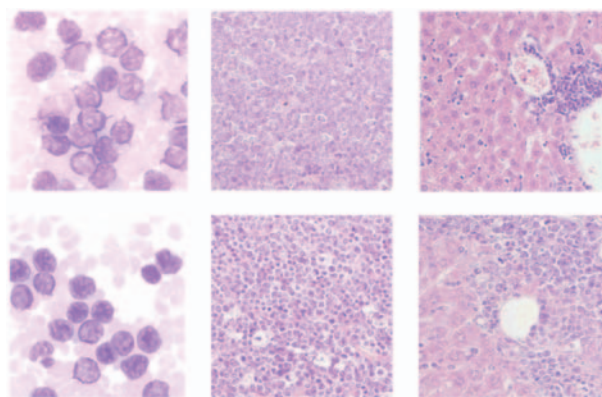


図 7. ライトギムザ染色 (末梢血, リンパ節, 肝臓)

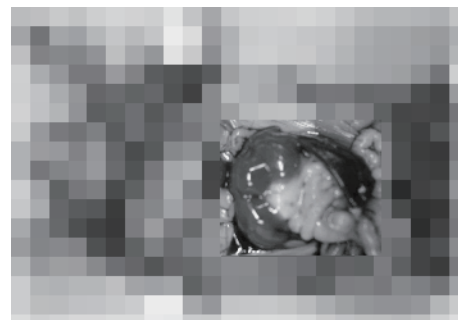


図 8. 白血病マウスの解剖

5. 生化学解析

表現型解析が一段落すると次にその個体で起こった事象を裏付けする細胞、分子レベルでの実験を行う。

(1) マウスにおける変異遺伝子の寄与

マウスから腫瘍組織を採取して、そこから DNA, RNA, タンパク質を抽出、これらから変異遺伝子の発現、ターゲットとなる遺伝子、また下流の分子シグナルなどの確認を行う。

(2) 細胞実験

マウスから骨髄細胞を採取し、変異遺伝子を導入する。細胞培養時に白血病の原因となる高い増殖性などが確認出来る。またコロニーアッセイにより細胞の形態や分化の異常も確認する。

(3) 骨髄移植

コロニーアッセイと同様に採取した骨髄細胞に変異遺伝子を導入、次にレシピエントマウスを放射線照射(原爆放射線医科学研究所, 放射線先端医学実験施設, ガンマセルを使用)して骨髄細胞を不活化する。変異遺伝子を導入した骨髄細胞をレシピエントマウスに移植して白血病発症の再現性を確認する。

(4) ヒト検体との関連性

マウスを用いた解析で検出した遺伝子変異と病気との関連について、ヒトの検体を用いて確認する。

6. おわりに

ある程度の技能と経験、相当の時間を要するジーンターゲットング, また大学院生への技術指導など技術職員に適した業務はあると思っている。それらを積極的にこなし、研究室の活性化に寄与したい。

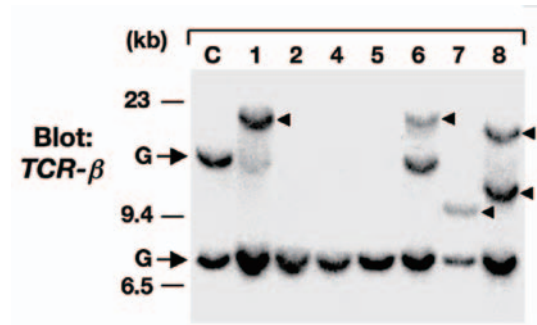


図 9. T 細胞性白血病マウスの DNA パターン

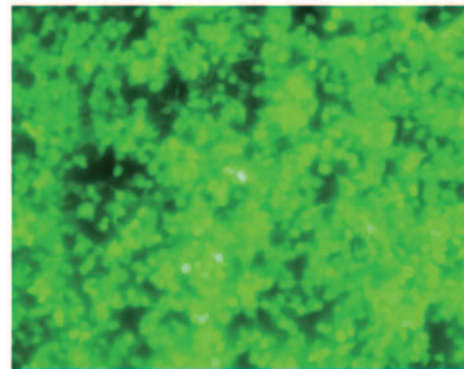


図 10. レトロウイルスの活性確認 (GFP)

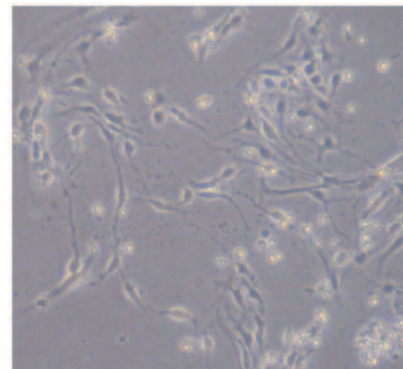


図 11. マウスから単離した細胞

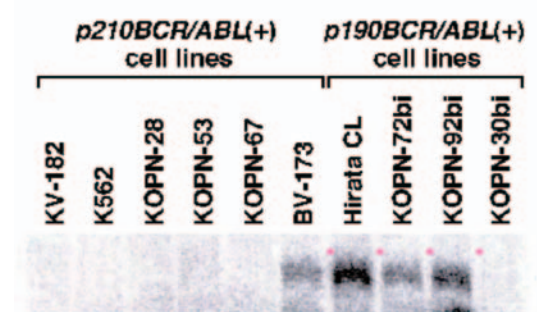


図 12. ヒト白血病細胞株での RNA 発現解析