

第二章

マウス 20 α -HSD ゲノム DNA のクローニングとノックアウトマウスの作製

緒言

受精卵への DNA 注入によりトランスジェニックマウス (TG マウス) 作製に成功し [Brinster et al. 1981], マウスへの新規遺伝子導入, 個体レベルでの遺伝子発現研究に新たな道が開けた。しかし TG マウスでは, 導入した遺伝子の組み込み部位が特定できない, 遺伝子発現の制御が困難であるなどの問題点もあった。トランスジェニックに対し, ジーンターゲティング法とは, ある特定の遺伝子の塩基配列に変異を誘導し, その遺伝子がどのような生物機能に関係しているのかを解明する技術である [緒方ら 1995]。同じ 1981 年, トランスジェニックとは異なるアプローチにより, ある遺伝子を「付加」ではなく「欠失」させたマウス (ノックアウトマウス, KO マウス) の作製をもたらす鍵となる報告がなされた [Evans et al. 1981]。KO マウス作製過程では機能を調べたい遺伝子をその染色体上の遺伝子座に特定して変異させるので, その遺伝子そのものの作用を解析できる。しかし KO マウスにおいても, 個体の持つ様々な代償機構により 1 つの遺伝子を変異させても個体レベルでの変化が現れない場合があることも事実である。

ES 細胞の存在とその培養系の確立は Evans らにより 1981 年に報告された。体の各組織, 臓器においてはそれぞれ幹細胞が存在し, その維持に貢献しているが, それら幹細胞も元は全て 1 つの受精卵に由来する。マウス受精卵は分裂を繰り返し, 4 日胚では将来胎子になる内部細胞塊 (inner cell mass ; ICM) と, その周りを囲み着床や胎盤形成に関わる栄養芽細胞 (trophoblast) とに分かれる。ES 細胞はこの ICM に由来し, あらゆる組織に分化できる全能性の幹細胞であり, 培養, 継代を繰り返しても全能性を失わない細胞株である。培養過程で遺伝子操作により特定の遺伝子座に変異を起こした変異 ES 細胞を宿主胚に注入し, ICM と共存させると, 体の各組織を宿主胚の ICM と変異 ES 細胞の両方に由来するキメラマウスが誕生する。キメラとは, ギリシャ神話に登場する頭がライオン, 胴がヤギ, 尻尾がヘビという怪物「キマイラ」に由来する名前である。1984 年, ES 細胞が生殖系列細胞にも分化できることが確かめられた [Bradley

et al. 1984]. すなわちキメラマウスの子孫は変異 ES 細胞に由来する変異遺伝子を継承していくことができるのである。このような遺伝子変異マウスの作製は、過剰発現、レポーター遺伝子の挿入（ノックイン）、Cre-loxP システムによるコンディショナルな変異導入など、さらに応用範囲を広げている。

KO マウス作製を支える ES 細胞における遺伝子操作、発生工学技術を駆使したキメラマウス作製は多くのステップを含み、簡単に行えるものではない。しかしマウスゲノム遺伝子のクローニングに始まり、変異遺伝子（ターゲティングベクター）の構築、ES 細胞での相同組み換え、キメラマウスの作製、ヘテロ接合体マウス作製、ホモ接合体マウス（KO マウス）作製の流れは、各ステップにおいて効率を上げるための工夫と改良が重ねられている。相同組み換えの確認は培養 ES 細胞において同定でき、この選別の効率は KO マウスの作製効率を大きく左右する。ターゲティングベクターを ES 細胞へ導入すると、ベクターは標的部位で相同組み換えを起こすかあるいは染色体ヘランダムに組み込まれる。相同組み換え体の選別法は一般に、ターゲティングベクターに組み込まれたマーカー遺伝子を細胞内で発現させることにより、ベクターが組み込まれた ES 細胞のみを生き残らせる方法（ポジティブ選別法）と、その中でもランダムに組み込まれた ES 細胞のみを死滅させる方法（ネガティブ選別法）を組み合わせた二重選別をとる。さらに選別の効率を上げるためには、マーカー遺伝子の発現を標的遺伝子のプロモーターに委ねるのが望ましい（プロモーター選別）が、標的遺伝子が ES 細胞内で発現していない場合には、PGK (phosphoglycerate kinase I) プロモーターや MC1 プロモーター (polyoma enhancer / herpes simplex virus thymidine kinase promoter) といった ES 細胞で活性化されるプロモーターを付加する。ポジティブ選別には、マーカー遺伝子としてネオマイシン耐性遺伝子 (neo^r 遺伝子, aminoglycoside phosphotransferase 遺伝子) を用いる G418 (geneticin) 選別が一般的である。G418 はアミノグリコシド系の抗生物質で、その蛋白合成阻害作用により細胞毒性を示すが、neo^r 遺伝子は G418 をリン酸化することによりその作用を和らげる。neo^r 遺伝子はベクターが組み込まれた ES 細胞で必ず発現するように、相同領域で挟むように構築する。それに対しネガティブ選別では、ジフテリアトキシン A 断片遺伝子 (DT-A) などをベクターの相同領域の外側に設置し、相同性に関係なくベクターが DT-A 遺伝子と共に組み込まれた場合に発現させることで、非相同性の組み換え体を排除する。ジフテリアトキシンは、細胞内でエロンゲーションファクターII を poly ADP リボシル化して蛋白合成を阻害する A フラグメントと、細胞表面に吸着し細胞内に A フラグメントを送り込む B フラグメントから成るが、B フラグメントが無い限り A フラグメントの他細胞への侵入はおこらない。このような二重選別をクリアーした ES 細胞を、PCR あるいは Southern blotting 法により、ベクター領域の外側に設置した primer あるいは probe を用いて標的遺伝子座への変異配列置換をさらに遺伝子レベルで確認する。単離された変異 ES 細胞は、発生工学技術により宿主の胚盤胞あるいは桑実胚にマイクロインジ

エクシオンあるいは凝集法により導入し、仮親に移植して効率良くキメラマウスを得ることができる。

第二章では、20 α -HSD cDNA を元にゲノム DNA を単離すると共に、ジーンターゲティング法により 20 α -HSD の変異遺伝子を有するキメラマウスを作製する。ターゲティングベクターには、20 α -HSD 遺伝子の標的エクソン部位に PGK プロモーターに繋いだ neo^r 遺伝子 [Soriano et al. 1991] 発現カセットを置換し、ネガティブ選別用として DT-A 遺伝子 [Yagi et al. 1990] を MC1 プロモーターに繋いで付加した。さらに、20 α -HSD の発現部位をマウスにおいて検出するため、EGFP (enhanced green fluorescent protein) 遺伝子をターゲティングベクターに挿入した。EGFP 遺伝子のプロモーターには、20 α -HSD プロモーターを用いたが、融合蛋白質の生成を避けその発現を確実にするため、上流にリボソーム結合部位として IRES (internal ribosomal entry site) 配列を連結した。

副腎や性腺由来のステロイドホルモンは、脊椎動物の生殖、発育、恒常性維持において幅広い生理作用を有するが、その作用はほとんどが核内レセプターへの結合を介する。核内レセプターの祖先となるレセプターの存在は、カンブリア紀初期の原始脊椎動物にまでさかのぼるが、当時ステロイドレセプターは陸生動物において祖先分子から高度に分岐を繰り返していたため、リガンドに対する特異性は現在ほど高くはなかった。水酸化ステロイド脱水素酵素群 (hydroxysteroid dehydrogenases, HSDs) は発現を使い分け、活性型ステロイドを代謝することで、当時レセプターとリガンドの特異性向上をもたらしていたと考えられるが、陸生動物が胎盤形成などに見られる進化を遂げると共に、複雑化したステロイドホルモンの生理作用に対応するため、次々と新たなステロイド作用の制御機構に動員されていったと思われる [Baker 2001]。その試行錯誤のあとを表すかのように、多くの HSDs がステロイド産生器官や標的器官において確認されている。HSDs は、short-chain alcohol dehydrogenase/reductase (SDR) family と、aldo-keto reductase (AKR) superfamily に分けられる [Penning 1997]。SDR family は、25-28 kDa の単量体分子であるが、しばしば多量体として機能する。互いに相同性は 25 %程度と低いが、補酵素として NAD(P)(H)と結合し、その結合部位の構造、アミノ酸モチーフは高度に保存されている。SDR family には 3 β -HSD, 11 β -HSD, 17 β -HSD などが属する。一方 20 α -HSD は、3 α -HSD, 17 β -HSD Type5 と共に AKR superfamily の family 1, subfamily C (AKR1C) に属する。AKR superfamily は、その相同性と基質特異性により分類されており (www.med.upenn.edu/akr)、AKR1 もこれら HSDs 以外に、aldehyde reductase (ALR) の属する AKR1A, aldose reductase (ADR) の属する AKR1B などいくつかに分類される。ラット卵巣の 20 α -HSD は AKR1C8 であるが、最後の数字は動物種、発見順序などにより任意に付加される。AKR superfamily は、その多様性にも関わらず互いに高い相同性を有し、34 kDa の単量体であること、NAD(P)(H)を補酵素とすること、活性部位を構成するアミノ酸が Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117 (アミノ酸番号は 3 α -

HSD のアミノ酸に従う) の 4 つであること, また構造においても共通の α/β バレル構造を有するなど保存性が高く, 遺伝子重複による多様化モデルとしての側面も持つ. HSDs はその機能のゆえに, ステロイドホルモン医療分野で着目され, その構造解析やインヒビターのデザイン研究も進んでいる. ALR, ADR, 3α -HSD の変異体作製により, これらの酵素では, Asp 50 は無くても触媒はできるが, 基質の取り換えと補酵素の結合が阻害されること, His 117 も同様に触媒に必須とまではいかないこと, 一方 Tyr 55 と Lys 84 に変異が起きると, 全く触媒活性が失われること [Jez et al, 1997] がわかっている. 本研究では 20α -HSD ゲノム遺伝子を用いたターゲティングベクター構築にあたり, AKRs に共通の触媒活性部位として Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117 の 4 つのアミノ酸をコードするエクソン (E) 2 から E4 を標的にするよう構築した.

第二章 材料と方法

PCR に用いる primer は、特に断らないかぎり表 2-1 に記載したものを使用した。

試薬

Proteinase K は SIGMA (MO, USA) から購入した。Ampli Taq Gold™ は Roche (Mannheim, Germany) から、Klen Taq LA DNA polymerase mix for long, accurate PCR は SIGMA (MO, USA) より、TaKaRa Ex Taq, T4 DNA ligase, JM109, TH2 competent cells, pKF3, DNA Blunting Kit, pNot I linker, 分子量マーカーλ EcoT14 I digest, alkaline phosphatase, 各種制限酵素は宝酒造 (京都) より購入し、gel からの DNA の切り出しは QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン, 東京) を用いて行った。pBluescript SK (+), pfu DNA polymerase は STRATAGENE (CA, USA) より、pEGFP-N1 は Clontech (CA, USA) より購入した。上記以外の試薬は和光純薬工業 (大阪) より購入した。

20α-HSD ゲノムクローンλ 2431 のクローニング (図 2-1)

20α-HSD は、互いに相同性の高い AKR superfamily に属するため、screening 効率の向上を期待して、20α-HSD cDNA の塩基配列にイントロンの配列も加えたゲノム DNA 断片を probe にして screening を試みた。

1) 129 SvJ mouse genomic library の増幅

129 SvJ mouse genomic library (Dr. Iwakura より分与) の host cell には、大腸菌 XL1-Blue MRA を用いた。Host cell の調整は、第一章の「偽妊娠マウス卵巣 cDNA library からの screening, Host cell の調整」と同様に行った。

2) λFIX II phage の host cell への感染

129 SvJ mouse genomic library は軽く遠心し、上清 20 μl (約 100,000 プラーク分) を 1) で調整した大腸菌液 600 μl に加え、37 °C で 20 分間加温した。50 °C の NZY top agarose に加え、37 °C に温めておいた NZY プレートの上に流し混ぜ、37 °C で 9 時間培養し、直径約 1 mm のプラークを得た。以上の方法により 10 プレート、合計 1,000,000 プラーク分を用意した。

3) λFIX II phage 溶液のストック及び DNA 抽出

4 ml の SM buffer (0.1 M NaCl, 8 mM MgSO₄, 50 mM Tris-Cl pH 7.5, 0.01 % gelatin) を各プレートに加え、4 °C で 3 時間穏やかに振とうし、プラーク内の phage を SM buffer 中に浮遊させた (以下、ライセート)。ライセートを回収し、さらに 1 ml の SM buffer でプレートを洗い、回収した。4 °C, 3,000 rpm で 10 分間遠心して上清の phage 浮遊液を回収し、1 ml をとり、これに chloroform

を数滴加えて 4 °C で保存した。

残りのライセート 4 ml に、等量の PEG/NaCl 溶液 (SM buffer 100 ml 当たり 20 g の PEG 6000, 11.7 g の NaCl) を加え混和し、氷上で 1 時間インキュベートした。4 °C, 3,000 rpm で 20 分間遠心分離し、上清を除去した。ペレットを 750 µl の LB 培地に懸濁し、Whatman DE 52 (Whatman, Maidstone, England) を 750 µl 加え、30 回穏やかに転倒混和した。5,000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心し、上清を回収した。1 ml の上清に 1.75 µl の 0.1 mg/ml proteinase K と、42.5 µl の 10 % SDS を加え、混和して室温で 5 分間静置した。さらに 173 µl の 3 M potassium acetate を加え、88 °C で 20 分間加熱した。次に氷上で 10 分間静置し、4 °C, 10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、回収した上清に等量の 2-propanol を加え、-80 °C で 10 分間冷却した。一度室温に戻してから 4 °C, 10,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を除去した。ペレットを 70 % ethanol で洗浄し、真空条件下短時間でペレットを乾燥させ、TE buffer に溶解し、分光光度計 Gene Quant II (Pharmacia Biotech, Cambridge, England) を用いて核酸濃度を測定した。

4) PCR によるイントロン配列の増幅

イントロン配列の増幅には、既知のラット卵巣 20 α -HSD のゲノム DNA 構造 [Zhong et al. 1998] を元に、エクソン (E) 2, E4, E5 上に primer を設計し、Ex Taq DNA polymerase を用いてゲノム DNA 断片の増幅を試みた。PCR 反応液の組成は、全量 100 µl で、鋳型 DNA として phage から抽出したゲノム DNA を 100 ng, 0.5 µM の各 primer, 0.2 mM の dNTP, 1×Ex Taq buffer, 2.5 U の Ex Taq polymerase とした。PCR の反応条件は、94 °C で 1 分, 60 °C (E2F-up/E5R) あるいは 50 °C (E2F/E4R) で 1 分, 72 °C で 1 分を 1 cycle とし、30 cycle 行った。10 プレート分の phage ゲノム DNA サンプルのうち、5 サンプルから、E2F-up/E5R では約 3 kb, E2F/E4R では約 2 kb のゲノム DNA 断片の増幅が見られた。

5) PCR 産物の sequencing

上記 4) でゲノム DNA 断片が増幅されたサンプルの 1 つを取り、1 % agarose gel から切り出して精製し、第一章の方法に従って塩基配列を決定した。ただし sequencing 反応に用いる鋳型 DNA は PCR 産物 100 ng を用い、primer は、PCR 反応で用いたものを使用した。

6) Probe の作製

Library の screening には、E2F/E4R による PCR で増幅した約 2 kb の、イントロン配列を含むゲノム DNA 断片を 1 % agarose gel から切り出して probe として用いた。Probe の ³²P labeling には、第一章方法の cDNA library screening 時と同様に行った。

7) ゲノムクローン λ 2431 のクローニング

ゲノムクローンの単離は、図 2-1 に沿った流れで phage から抽出したゲノム DNA を PCR で解析し、20 α -HSD ゲノム DNA を含む phage 溶液を特定する方法で 5,000 プラーク内にまで絞り、plaque hybridization を行った。すなわち、sequencing により E2, E4, E5 の塩基配列の存在

を確認した後、このゲノム DNA 断片を含む phage が、まず上記 100,000 プラーク中に存在する
と考えると、さらにそこから 50,000 プラークずつ 4 プレート分 (200,000 プラーク分) 作製した。
この 4 プレート由来のゲノム DNA につき、E2F/E4R primer を用いて PCR を行ったところ、4
プレートすべてにおいて E2 から E4 の約 2 kb のゲノム DNA 断片が増幅された (2-1, 2, 3, 4)。
次に、そのうちの 1 プレートの phage ストック溶液から、10,000 プラークずつ 4 プレートを作
製し、同様に E2F/E4R primer を用いて PCR を行ったところ、2 プレートにおいて約 2 kb のゲ
ノム DNA 断片が増幅がみられた (2-4-3, 4)。さらにその phage ストック溶液を用いて、約 5,000
プラークずつ 9 プレート、合計 45,000 プラークを作製して、plaque hybridization を行った。Plaque
hybridization の方法は、第一章の方法に従った。ただしここではメンブレンの duplication は行
わなかった。

8) ゲノムクローンλ2431 の pBluescript SK (+)への組み込み

ゲノムクローンλ2431 の phage ゲノム DNA を、Not I で切断し、phage DNA とインサート DNA
を切り離した。その切断産物を、インサートとベクターのモル比が 3:1 となるように調整して
加え合わせ、T4 DNA ligase を用いて pBluescript SK (+)/Not I/BAP に組み込んだ。JM109 competent
cells を得られた plasmid で形質転換し、X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) と IPTG
(isopropylthio-β-D-galactoside) を塗布した LB プレート (50 μg/ml ampicillin を添加, 以下 LB/Amp
プレート) で 37 °C で一晩培養し、blue-white color selection により、白いコロニーを得た。いく
つかのコロニーから大腸菌を少量培養して plasmid を抽出し、Not I によりインサートを切り出
して、ゲノム DNA の組み込みを確認した。

ゲノムクローンλ2431 の一部塩基配列決定

ゲノムクローンλ2431 は、ターゲティングベクター作製のため、一部イントロン配列を除く
全長の塩基配列決定を試みた。

まず pBluescript SK (+) に挿入されたゲノム DNA を、LA PCR™ Kit Ver. 2.1 を用いて増幅した。
PCR 反応液の組成は、λ2431 が組み込まれた pBluescript SK (+) を 5 ng, 1×LA PCR buffer, 各
400 μM の dNTPs, 各 10 pmol の primers (第一章で用いた M-13 universal primer と M-13 reverse
primer), 2.5 U の LA Taq DNA polymerase を加えて全量を 50 μl とし、合計 600 μl 分作製した。
PCR の反応条件は、94 °C で 1 分加熱後、94 °C で 30 秒, 55 °C で 60 秒, 72 °C で 15 分を 1 cycle
として 30 cycle 行った。その後さらに 72 °C で 15 分間加温し、4 °C で保存した。この PCR 産物
を、Mbo I 用に 13 μg, Alu I 用に 21 μg, Hae III 用に 21 μg に分け、各々 3 つに分けて部分消化
に用いた。部分消化に用いる制限酵素は、各々力価を 24 U, 5 U, 1 U に調整し、全量を 100 μl
として各々 37 °C で 1 時間反応させた。そのうち 9 μl を 4 % agarose gel で電気泳動し、1 U 処理
において部分消化が見られたため、1 U 処理のもののみ phenol 抽出, chloroform 抽出, ethanol

沈殿を行って Milli Q 水 27 µl に溶かした。

部分消化産物は、*Mbo* I 処理産物は pKF3 DNA/*Bam*H I に、*Alu* I と *Hae* III 処理産物は pKF3 DNA/*Sma* I に、T4 DNA ligase を用いて組み込んだ。TH2 competent cells をライゲーション産物で形質転換し、LB プレート（12 µg/ml chloramphenicol, 50 µg/ml streptomycin を添加）に播いて 37 °C で一晩培養した。各々コロニーを 64 個ずつ拾い、コロニーPCR を行った。PCR の組成は、1×PCR buffer, 0.2 mM の dNTPs, 0.025 U の Taq DNA polymerase, 0.5 µM の pKF3 F3 /R2 primers,

pKF3 F3 primer ; 5'-TGCAGGAACACTCTGTTATC-3'

pKF3 R2 primer ; 5'-GGACGTTTTACACCGTATTT-3'

を加えて全量 10 µl とした。PCR の反応条件は、94 °C で 2 分間加熱後、94 °C で 15 秒、52 °C で 30 秒、72 °C で 1 分を 1 cycle として、40 cycle の反応後、72 °C で 7 分間加温し、4 °C で保存した。PCR 産物を 4 % agarose gel で電気泳動し、異なるサイズのインサート DNA が pKF3 DNA に組み込まれていることを確認し、sequencing に用いた。

Sequencing の前に、コロニーPCR 産物は、exonuclease I により primer や一本鎖 DNA を破壊し、alkaline phosphatase により未反応の dNTP を脱リン酸化処理した。すなわち、コロニーPCR 産物 10 µl に MilliQ 水を加えて 5 倍希釈し、2 分間 vortex したもの 4 µl に、3 U の exonuclease I, 0.6 U の alkaline phosphatase を加えて全量を 7 µl にし、37 °C で 15 分間インキュベートした後 80 °C で 15 分間加熱して酵素を失活させ、4 °C で保存した。これと pKF3 F3 primer を用いて sequencing を行った。sequencing は、第一章の方法に従った。その結果、イントロン 1 の一部、イントロン 5 の一部以外の塩基配列を得ることができ、ゲノムクローンλ2431 は E1 から E5 を含むことが判明したので、これをターゲティングベクター作製に用いた。

全長 20α-HSD genome DNA のクローニング (図2-2)

ゲノムクローンλ2431 が、E1 から E5 までしか含んでいなかったことと、エレクトロポレーション後に組み換え体を検出する際にさらに外側の配列情報も必要であったことから、λ2431 の時と同様な方法で、さらに 4 つのゲノムクローンを単離した。すなわち、プロモーター領域と E1 に設計した primers,

P2F primer ; 5'-AAGGGTTTCATAGACAGTAT-3'

E1R primer ; 5'-AATGGAGTGACCATCATTTA-3'

を用いてゲノムクローンλ1212 を、E6 と E7 に設計した primers,

E6F primer ; 5'-TGGCCTACTGCAAGATGAAT-3'

E7R primer ; 5'-ACTTCTTTGCCATGGCACAA-3'

を用いてλ9527 を単離した。

PCR の反応条件は、基本的に全量 100 μ l に対し、ゲノム DNA 100 ng, 1 \times PCR buffer, 0.2 mM の dNTP, 50 pmol の primer, 2.5 U の Taq DNA polymerase の反応組成で行った。ゲノムクローニングに用いた PCR の primer セット, アニール温度, Taq DNA polymerase の種類, PCR 産物の長さは、表 2-1 にまとめて示した。さらに、 λ 1212, λ 9527 の *Bam*H I 切断により生成される、 λ 1212 の 5'端, λ 9527 の 3'端断片を probe に用いて、各々 λ 6115, λ 3217 を単離した。

ターゲティングベクターの作製 (図 2-3)

共通事項として、ライゲーション反応では、ベクターとインサートのモル比を 1:3 から 1:5 に調整し、T4 DNA ligase を用いて 16 $^{\circ}$ C で一晩反応させ組み込んだ。特記しないかぎり JM109 competent cells を 42 $^{\circ}$ C で 45 秒間の反応によりライゲーション産物で形質転換し、LB/Amp プレートに播いて一晩 37 $^{\circ}$ C で培養し、大腸菌コロニーから plasmid を抽出して、制限酵素反応, sequencing によりインサートを確認した。

制限酵素反応後には、phenol 抽出, chloroform 抽出, ethanol 沈殿を行って DNA を精製した。

制限酵素断片の末端平滑化は、基本的に Klenow Fill-in Kit (STRATAGENE, CA, USA) を用いて行った。1 μ g の DNA に、1 \times fill-in buffer (6 mM Tris-Cl pH 7.5, 6 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 0.05 % gelatin, 1 mM DTT), 各 0.4 mM dNTP (*Not*I 断端の場合は dGTP と dCTP, *Afl* II 断端の場合は dATP と dTTP, *Bam*H I 断端の場合は dATP と dTTP と dCTP と dGTP), 10 U の klenow polymerase を加えて全量を 25 μ l として 22 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させ、これに 475 μ l の 1 \times STE buffer (100 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl pH 7.5, 10 mM EDTA) を加えて phenol 抽出, chloroform 抽出, ethanol 沈殿により精製し、1 % agarose gel から切り出し精製した。

1) EGFP 発現用カセットの作製

pBluescript KS II (+)内に組み込まれている internal ribosomal entry site (IRES) と EGFP (pEGFP-N1 由来) の連結遺伝子 (Dr. Iwakura より分与) を、*Eco*R I と *Not*I で切り出し、pEGFP-N1/*Eco*R I/*Not*I にライゲーションし、下流に SV40 poly A を連結した。ライゲーション産物で JM 109 competent cells を形質転換し、LB プレート (50 μ g/ml kanamycin を添加) に播いて、37 $^{\circ}$ C で一晩培養して大腸菌のコロニーを得た。コロニーから plasmid を抽出し、*Eco*R I と *Not*I で切断して約 1 kb のインサートを確認した (pEGFP-N1')。

この plasmid の EGFP の下端を *Not*I で切断し、1 μ g の pEGFP-N1'/*Not*I の断端を平滑化した。この 10 ng を用いて、T4 DNA ligase により全量 10 μ l にして 16 $^{\circ}$ C で一晩反応させ、セルフライゲーションさせて *Not*I サイトを破壊した (pEGFP-N1')。

pEGFP-N1' を *Afl* II で切断し、1 μ g を用いて、*Afl* II 断端を平滑化した。さらにこれを *Eco*R I で切断し、1 % agarose gel から切り出した。この IRES/EGFP/SV40 polyA 断片を、pBluescript SK (+)/*Eco*R I/*Eco*R V/BAP にライゲーションした。得られた plasmid を *Eco*R I と *Sal* I で切断し、

約 1.5 kb の IRES/EGFP/SV40 polyA 断片を確認した (I-pBs).

2) PCR による E2 への停止コドンの挿入

ゲノムクローンλ2431 を鋳型にして, E2 上流のイントロン上に

Stop-F primer ; 5'-GGATTAGAGCTTGCTGTTTTCTGGG-3'

E2 上に停止コドン (下線部) と *Bgl* II 認識配列を含む

Stop-R primer ; 5'-GAAGATCTATGTCAGAACCCAACATCTATAGC-3'

を設計し, pfu DNA polymerase を用いて PCR を行った. PCR の反応液組成は, 10 ng のλ2431 に, 1×reaction buffer (20 mM Tris-Cl pH 8.8, 2 mM MgSO₄, 10 mM KCl, 10 mM (NH₄)₂SO₄, 0.1 % Triton X-100, 100 μg/ml nuclease-free BSA), 各々50 pmol の primer, 0.2 mM each の dNTPs, 5 U の pfu DNA polymerase を加えて全量 100 μl とした. PCR の反応条件は, 94 °C で 30 秒, 62 °C で 10 秒, 72 °C で 30 秒を 1 cycle として, 35 cycle 行い, 4 °C で保存した. この約 250 bp の PCR 産物を 2 % agarose gel から切り出して pBluescript SK (+)/*EcoR* V/BAP にライゲーションした. ライゲーション産物は *Bgl* II で切断して plasmid が直鎖状になることを確認した. さらに sequencing により E2 上の停止コドンを確認した. Stop-R primer に制限酵素認識サイトを加える際には, 認識サイトの外側に付加する塩基数により切断効率が変化するため, New England Biolabs のカタログを参考にして, *Bgl* II サイトの外側に 2 塩基付加した.

3) E2 の下流への IRES の連結

上記停止コドンの挿入された E2 を, *Not* I と *Bgl* II で切断し, 2 % agarose gel から約 300 bp のインサートを切り出した. これを, *Bgl* II 断端と *Bam*H I 断端が結合することを利用して, I-pBs/*Not* I/*Bam*H I にライゲーションし, 得られた plasmid を, E2 上流のイントロン配列内の *EcoR* V と, SV40 polyA 下流のマルチクローニングサイト内の *Sal* I で切断し, 約 1.7 kb のインサートを確認した (I-pBs'). また M-13 universal forward primer と M-13 reverse primer を用いた sequencing によっても確認した.

4) ネオマイシン耐性遺伝子の連結

ネオマイシン耐性 (neo^r) 遺伝子の組み込まれた pPGK-NeobpA (Dr. Iwakura より分与) を, *Xho* I と *Sal* I で切断後, 1 % agarose gel から PGK プロモーターに連結した neo^r 遺伝子 (約 1.5 kb) を切り出した. これを, *Xho* I 断端と *Sal* I 断端が結合することを利用して, I-pBs'/*Sal* I/BAP にライゲーションし, 得られた plasmid を, *EcoR* I で切断して約 3.3 kb のインサートを切り出して neo^r 遺伝子の挿入方向を確認した. また M-13 universal forward primer と M-13 reverse primer を用いた sequencing によっても確認した (I-pBs'-neo).

I-pBs'-neo を, E2 上流の *Bam*H I サイトとベクターのマルチクローニングサイトの *Xho* I で切断し, 1 % agarose gel から約 3.2 kb のインサートを切り出して精製し, 下記 6) のステップに用いた.

5) ジフテリアトキシン遺伝子と 5'側 long arm の連結

ジフテリアトキシン A 断片 (DT-A) 遺伝子の組み込まれた pMC1DTpA (Dr. Iwakura より分与) は以下に述べる方法で MC1 プロモーターとジフテリアトキシン A 遺伝子間の *BamH* I サイトを破壊した。すなわち、pMC1DTpA を *BamH* I で切断し、この DNA 1 µg を用いて、*BamH* I 断端を平滑末端化した。この 15 ng の pMC1DTpA/*BamH* I を、T4 DNA ligase を用いてセルフライゲーションし、得られた plasmid をもう一度 *BamH* I と反応させ 1 % agarose gel で電気泳動し、未処理の pMC1DTpA/*BamH* I と長さを比較して、*BamH* I サイトが破壊されていることを確認した。

BamH I サイトを破壊した pMC1DTpA を、*Xho* I と *Not* I で切断し、1 % agarose gel から約 1.5 kb の DT-A 遺伝子を切り出して精製した。

pBluescript SK (+) に挿入されたゲノム DNA を *Sal* I で切断してインサートを切り離し、そのまま *BamH* I により切断した。1 % agarose gel から、E1 を含み上端が *Sal* I 断端、下端が *BamH* I 断端の約 5 kb の DNA フラグメントを 5' long arm として切り出し精製した。これを pBluescript SK (+)/*BamH* I/*Sal* I にライゲーションし、得られた plasmid を *BamH* I で切断して約 8 kb の直鎖状フラグメントの生成を確認した。この plasmid を *Xho* I と *BamH* I で切断し、1 % agarose gel から、E1 を含み上端が *Xho* I 断端、下端が *BamH* I 断端の約 5 kb の DNA フラグメントを切り出し精製した。

上記約 1.5 kb の DT-A 遺伝子と、約 5 kb の 5' long arm を、pBluescript SK (+)/*Not* I/*BamH* I にトリプルライゲーションし、得られた plasmid を *Xho* I で切断して、約 5 kb の 5' long arm と、ベクターと DT-A 遺伝子が連結した約 4.5 kb のフラグメントの 2 つが切り出されることを確認した (pDT-5')。

6) pTV-DT1 の作製

pBluescript SK (+) に挿入されたゲノムクローン λ2431 を、*BamH* I で切断することにより E1 と下流のイントロンを含む約 5 kb のゲノム DNA 断片、その下流 E2 から E5 の下流のイントロンを含む約 4.5 kb のゲノム DNA 断片、その下流の、E5 下流のイントロンとベクターを含む約 5.4 kb のゲノム DNA 断片とに分けた。このうち両端が *BamH* I 断片の約 4.5 kb のゲノム DNA 断片を、pBluescript SK (+)/*BamH* I/BAP にライゲーションし、得られた plasmid は、*Hinc* II で切断してベクター/E2/イントロン 2 を含む約 4 kb の断片、E3/イントロン 3 を含む約 800 bp の断片、E4/イントロン 4 を含む約 1 kb の断片、E5/イントロン 5 を含む約 1.5 kb の断片に分離してインサートの挿入方向を確認した (pE2-E5)。

3' short arm 用ゲノム DNA には、上記約 1.5 kb の断片を用いたが、この断片の上流断端を *Hinc* II サイトから *Xho* I サイトに換えるため、一度 pBluescript SK (+) に組み込んだ。Plasmid pE2-E5

を *BamH* I と *Hinc* II で切断し、1 % agarose gel から、上流が *Hinc* II 断端、下流が *BamH* I 断端である約 1.5 kb のゲノム DNA 断片を切り出して精製し、pBluescript SK (+)/*Hinc* II/*BamH* I にライゲーションした。得られた plasmid を、再度 *BamH* I と *Hinc* II で切断してインサートを確認した (pE5)。Plasmid pE5 を、*Xho* I と *BamH* I で切断し、1 % agarose gel から、3' short arm 用の約 1.5 kb の断片を切り出して精製した。

この 3' short arm 用の約 1.5 kb の断片と、上記 4) で作製した約 3.2 kb の断片を、pDT-5'/*BamH* I (約 9.5 kb) にトリプルライゲーションし、得られた plasmid を *Sal* I で切断し、E5 を含む約 1.5 kb の断片が切り出すことにより、インサートの挿入方向を確認した (pTV-DT1)。

7) pTV-DT1 へのジフテリアトキシン A 遺伝子の再挿入

ターゲティングベクターは、上流の DT-A 側のマルチクローニングサイト内 *Sac* II により直鎖状にするが、ベクターの両端は ES 細胞内の exonuclease の働きにより削られる可能性がある。ターゲティングベクターの 3' 端には pBluescript 由来の配列があるが、5' 側の DT-A 遺伝子には断端まで数塩基しかない。DT-A の作用の有無は、ES 細胞の screening のネガティブ選別の効率に影響するため、さらに pTV-DT1 の上流にもう一つ DT-A 遺伝子を繋いだ。

pMC1DTpA を *Xho* I で切断し、DNA Blunting Kit を用いて断端を平滑化した。すなわち、1 µg の pMC1DTpA/*Xho* I に、1×buffer を加えて全量を 9 µl にし、70 °C で 5 分間加熱した。これを 37 °C に移して 1 µl の T4 DNA polymerase を加え、37 °C で 5 分間反応した。Phenol 抽出, chloroform 抽出, ethanol 沈殿後、5 µl の MillQ 水に懸濁した。

あらかじめ 70 °C で 10 分間加熱し、徐冷してアニールさせた *Not* I linker (p*Not* I 8mer, pd(GCGGCCGC)) と、平滑末端化 pMC1DTpA/*Xho* I を、モル比 100:1 で加え合わせ、全量 5 µl でライゲーションした。得られた plasmid を、*Not* I で切断して 1 % agarose gel で電気泳動し、DT-A 遺伝子が切り出されることを確認した。両端が *Not* I 断端の DT-A 遺伝子を、pTV-DT1/*Not* I/BAP にライゲーションし、得られた plasmid を *Not* I で切断して、1 % agarose gel で電気泳動し、DT-A 遺伝子が切り出されることを確認した (pTV-DT2)。また、pTV-DT2 を *BamH* I で切断し、その切断パターンから、DT-A 遺伝子は 2 つとも、20α-HSD 遺伝子と逆向きに挿入されていることを確認した。

塩化セシウム平衡密度勾配遠心法による plasmid の精製

ES 細胞へのエレクトロポレーション用に、ターゲティングベクター pTV-DT を大量調整した。pTV-DT の入った大腸菌 JM109 の 1 コロニーをとり、Terrific broth (50 µg/ml ampicillin を添加) 500 ml に懸濁して 37 °C で一晩振とう培養した。大腸菌液を 250 ml ずつに分け、4 °C で 5,000 rpm で 10 分間遠心分離し、大腸菌のペレットを得た。これを 20 ml の solution I (50 mM glucose, 25 mM Tris-Cl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) に懸濁し、5 分間静置してなじませた後、40 ml の solution II (0.2

N NaOH, 1 % SDS) を加えて転倒混和し、氷上で 5 分間静置した。次に 30 ml の氷冷 solution III (5 M CH₃COOK 60 ml, glacial acetic acid 11.5 ml, H₂O 28.5 ml) を加えて転倒混和し、15 分間氷上で静置した。12,000 rpm で 15 分間遠心分離し、回収した上清に、等量の 2-propanol を加えて 15,000 rpm で 15 分間遠心分離して plasmid のペレットを得た。ペレットを 70 % ethanol で洗浄し、15,000 rpm で 10 分間遠心してから風乾後、6 ml の TE buffer に懸濁した。核酸濃度を分光光度計で測定し、3 mg の plasmid DNA を得た。

回収した plasmid DNA を 2 分し、8 ml の TE buffer に対し CsCl を 9 g 加え、よく混和して溶解し、10 mg/ml EtBr を 200 µl 加えて混和し、室温で 3,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を超遠心チューブ (Quick-Seal, Beckman, CA, USA) に回収した。Ty 70.1 Ti ローター (Beckman, CA, USA) を用いてベックマン L-60 超遠心機 (Beckman, CA, USA) で、20 °C, 50,000 rpm で 30 時間超遠心した。遠心後の超遠心チューブ上部に 20 G の注射針で空気穴をあけ、さらに 26 G の注射針で閉環状 plasmid の層に下部からアプローチしてシリンジ内に回収した。さらに 8 ml の TE buffer に CsCl と EtBr を上記と同様に加えた溶液を用意し、回収した plasmid を混ぜ加えて再度 20 °C, 50,000 rpm で 30 時間超遠心した。同様に 26 G の注射針で閉環状 plasmid を回収し、合計 2 回の超遠心で plasmid を精製した。これに isoamyl alcohol を等量加えてよく混和し、15,000 rpm, 室温で 5 分間遠心分離して EtBr の溶出した上層を除去し、さらに等量の isoamyl alcohol を加えるところから繰り返し、下層の plasmid 内の EtBr が除去されるまで繰り返した。溶媒中の CsCl は、透析により除去した。予め約 1 時間 TE buffer になじませた半透膜 (SPECTRUM, USA) に plasmid 溶液を入れ、3 L の TE buffer に浸して 4 °C で一晩 CsCl を溶出させた。さらに 3 L の TE buffer に入れ替えて 2 時間の透析を 2 回繰り返し、146 µg の pTV-DT を得た。

エレクトロポレーション (図 2-4)

1) ターゲティングベクターの希釈と無菌化

エレクトロポレーションに用いるターゲティングベクター pTV-DT は、Sac II で切断し、phenol 抽出、chloroform 抽出後、ethanol 沈殿により精製し、70 % ethanol で洗浄後、クリーンベンチ内で風乾し、1×PBS (1 L 当たり NaCl 8 g, KCl 0.2 g, Na₂HPO₄·2H₂O 1.15 g, KH₂PO₄ 0.2 g) に懸濁して核酸濃度を測定して 1 µg/µl となるように調整し、使用するまで 4 °C で保存した。

2) フィーダー細胞の培養と継代

ネオマイシン耐性遺伝子を導入したマウス胎子繊維芽細胞 (embryonic feeder cells, フィーダー細胞) は、

フィーダー培地

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose, Gibco BRL, CA, USA)

10 % FBS (Fetal Bovine Serum, Bioserum)

1 mM sodium pyruvate (Gibco BRL, CA, USA)

1×non-essential amino acids (Gibco BRL, CA, USA)

50 µg/ml streptomycin (明治製菓, 東京)

50 U/ml ペニシリンカリウム (明治製菓, 東京)

を用いて 0.1 % gelatin コートしたディッシュで培養した。凍結フィーダー細胞を 37 °C で解凍し、フィーダー培地を 1 滴ずつ 2 ml 加え、さらに穏やかに懸濁しながら 9 ml までメスアップし、1,000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心して細胞を集めた。細胞を 1 ml のフィーダー培地によく懸濁してから、20 ml のフィーダー培地入りφ15 ディッシュ (IWAKI, 千葉) に播き、37 °C, 5 % CO₂ 条件で培養した。継代は、コンフルエントに達したディッシュの培地を吸引除去し、10 ml の 1×PBS で 2 回置換し、0.05 % trypsin を 3 ml 加えて 37 °C で約 5 分間反応させて細胞を剥がした。これに 3 ml のフィーダー培地を加えて細胞を遠沈管に回収し、さらに 4 ml のフィーダー培地を加えて回収し合わせて、1,000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心して細胞を集め、1 ml のフィーダー培地に懸濁し、血球計算盤で細胞数を数えて約 1×10⁶ cells/φ 15 ディッシュとなるように播いて、継代した。

0.05 % trypsin は、2.5 % trypsin (Gibco BRL, CA, USA) を以下の組成の Trypsin/EDTA 溶液 (1 L 当たり) で希釈して作製した。

EDTA.Na ₂	0.4 g
NaCl	7.0 g
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	0.3 g
KCl	0.37 g
D-glucose	1.0 g
trizma base	3.0 g

ES 細胞培養の下地に用いるフィーダー細胞は、予めマイトマイシン C (MMC, SIGMA, MO, USA) 処理により増殖を抑制した。コンフルエントなφ 15 ディッシュのフィーダー培地を吸引除去し、MMC 培養液 (フィーダー培地に 10 µg/ml MMC を添加) を加え、37 °C, 5 % CO₂ 条件下で約 2 時間培養した。その後 10 ml の 1×PBS で 3 回洗浄し、0.05 % trypsin を 3 ml 加えて 37 °C で約 5 分間反応させて細胞を剥がした。これに 3 ml のフィーダー培地を加えて細胞を遠沈管に回収し、さらに 4 ml のフィーダー培地を加えて回収し合わせて、1,000 rpm, 4 °C で 5 分間遠心して細胞を集め、1 ml のフィーダー培地に懸濁し、血球計算盤で細胞数を数えてφ 10 ディッシュ (IWAKI, 千葉) に約 1.5×10⁶ cells ずつ播いた。

3) エレクトロポレーション用 ES 細胞の培養と継代

エレクトロポレーションに用いる 129 系統由来の ES 細胞 (E14.1) は、フィーダー細胞上で ES 培地

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, high glucose, Gibco BRL, CA, USA)

15 % FBS (Fetal Bovine Serum, Bioserum)

1 mM sodium pyruvate (Gibco BRL, CA, USA)

1×non-essential amino acids (Gibco BRL, CA, USA)

50 µg/ml streptomycin (明治製菓, 東京)

50 U/ml ペニシリンカリウム (明治製菓, 東京)

0.1 µM 2-mercaptoethanol

1,000 U/ml LIF (Leukemia Inhibitory Factor, ESGRO™, Gibco BRL, CA, USA)

を用いて培養した。凍結ES細胞の解凍は、フィーダー細胞の時と同様に行ったが、遠心は800 rpmで行った。集めた細胞をMMC処理フィーダー細胞 6×10^5 cells 入りのφ6 ディッシュ (IWAKI, 千葉) に播き、37 °C, 5 % CO₂ 条件で培養した。ES細胞は、分化の開始に注意しながら、顕微鏡視野でES細胞の割合が約50 %以上に達すると継代した。継代方法はフィーダー細胞の方法と同様に行ったが、遠心は800 rpmで行った。

4) エレクトロポレーション (電気穿孔法)

予め新しいES培地で3-4時間培養したES細胞の培地を除去し、1×PBSで2回洗浄後、0.05 % trypsinを加えて37 °C, 3分間反応させ、ディッシュ上でピペッティングによりsingle cellにしてから培地を加えて反応を停止した。800 rpm, 4 °C, 5分間の遠心で細胞を回収し、1×PBSに懸濁して細胞数を数え、前細胞数からMMC処理した時のフィーダー細胞数を引いた数をES細胞数とした。もう一度遠心して1×PBSに懸濁し 1.25×10^7 cells/mlとし、うち0.8 ml (1×10^7 cells)をエッペンチューブにとり、20 µgのpTV-DT/Sac IIを加えてキュベットへ移し、Gene Pulser (Bio-Rad, CA, USA)を用いて250 V, 500 µFの条件でエレクトロポレーションを行った。この時ターゲティングベクターを混合しないネガティブコントロールも用意した。室温に5-10分間キュベットを静置し、2 mlのES培地に懸濁してMMC処理済フィーダー細胞が敷かれているφ10ディッシュ (IWAKI, 千葉) に播き、37 °C, 5 % CO₂ 条件で培養した。

5) G418によるポジティブ選別

エレクトロポレーション後一晩培養してから、250 µg (active form) /mlのG418 (Gibco BRL, CA, USA)入りES培地に交換し、7日間毎日培地交換を行って培養した。

6) G418耐性コロニーのpick up

実体顕微鏡下で、ピペットマンを用いて、輪郭が滑らかで中心部に密な盛り上がりを観察できるコロニーをかきとって吸い上げ、予め100 µlの0.05 % trypsinが入った96穴プレートに移し、37 °Cで3-5分間反応させた。4連ピペットマンを用いてコロニーをしっかりとピペッティングしてほぐした後、予めMMC処理済フィーダー細胞 6×10^4 cells/wellが敷いてある24 wellプレートに移し、G418の入っていないES培地で37 °C, 5 % CO₂ 条件下培養した。エレクトロ

ポレーションは合計 2 回行ったが、1 回目 (pTV-DT1 を用いた場合) では、G418 選別後の 5 枚の ϕ 10 ディッシュから 420 個、2 回目 (pTV-DT2 を用いた場合) は同じく 5 枚の ϕ 10 ディッシュから 720 個の耐性コロニーを pick up した。

7) 24 well プレートでの培養

Pick up した ES 細胞の入った 24 well プレートは毎日培地交換し、1 well の面積の 70-80 % ほどにコロニーが増殖したものから順に、1 ml の 1×PBS で洗浄後、150 μ l の 0.05 % trypsin を加えて 37 °C、5 % CO₂ 条件で 5 分間反応させ、さらに 150 μ l の ES 培地を加えてピペッティングにより single cell にした。その 1/6 量 (50 μ l) を凍結保存用に、予め MMC 処理済フィーダー細胞 6×10⁶ cells/well が敷いてある 24 well プレートに播き、残りを Southern blotting 用に、0.1 % gelatin コート済 24 well ディッシュに播いて可能な限り増殖させた。

8) ES 細胞の 24 well プレート内での凍結

1 well の面積の 70-80 % ほどにコロニーが増殖したら、ES 培地と DMSO を 9:1 の割合で混合した凍結保存液を、培地除去した 24 well に 0.25 ml ずつ加え、プレートをキムタオルで包んで -80 °C で凍結保存した。

9) Southern blotting 用 ES ゲノム DNA の抽出

ES 細胞の培地を除去し、1 ml の 1×PBS で 3 回洗浄後、1 well 当たり 400 μ l の 0.5 mg/ml proteinase K/SET lysis buffer (50 mM Tris-Cl pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 0.5 % SDS) を加えてプレートを密閉し、55 °C で一晩ゆっくり揺らしながら細胞を溶解させた。細胞溶解液は、半量 (200 μ l) をとり、MilliQ 水 500 μ l にメスアップしてから自動 DNA 抽出機 (KURABO, 大阪) を用いてゲノム DNA を抽出した。

Southern blotting による相同組み換え体の検出 (図 2-5)

1) 制限酵素による ES ゲノム DNA の消化

ES 細胞の screening は制限酵素 *Pst* I 消化による、3' short arm 側の probe (3' probe) を用いる Southern blotting により行った。3' probe により相同組み換えを同定できた ES ゲノム DNA のみを、さらに *Bgl* I 消化による 5' long arm 側の probe (5' probe)、*Bam*H I 消化によるネオマイシン耐性遺伝子 probe により相同組み換えを確認した。

自動 DNA 抽出機を用いて得られたゲノム DNA は、5 連チューブのまま、50 μ l の 1×buffer H, 50 U の *Pst* I 液を加えてパラフィルムで密封し、37 °C で一晩ゆっくり揺らしながら反応させた。

2) 電気泳動

蒸発により適度に液量の減少した *Pst* I 消化液を、そのまま 1 % agarose gel (13.5×13.5 cm) に、*Bgl* I で反応したものは 0.8 % agarose gel (13.5×13.5 cm) にアプライし、30 V で 6 時間電気泳動した。

3) メンブレンへの transfer

泳動後の gel を、2 $\mu\text{g/ml}$ の EtBr に浸して振とうさせながら 5 分間染色し、UV 下ゲノム DNA が消化されていることを確認した。次に蒸留水中で 10 分間振とう洗浄し、EtBr を除いた後、0.25 N HCl 中で 15 分間振とうさせ、分子量の大きな DNA を加水分解した。次に 0.5 M NaOH/1.5 M NaCl 中で 15 分間振とうさせて 2 本鎖 DNA を 1 本鎖にアルカリ変性させた。アルカリ変性はさらにもう 15 分間溶液を交換して行った。Transfer には、アルカリ変性液をそのまま用いた。メンブレン (Gene Screen Plus, NEN, MA, USA) は使用前に 10 分間 MilliQ 水に浸しておき、気泡を除きながら泳動 gel の底面に重ね、キャピラリー法により、gel 中の DNA をメンブレンに transfer した。メンブレンは GS GENE LINKER™ UV CHAMBER (Bio-Rad, CA, USA) 内で 150 mJoule の UV を照射して、DNA をメンブレンに固定した後、さらに 80 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間加熱して固定し、4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した。

4) 相同組み換え検出用 probe の作製

ゲノムクローン λ 2431 を *Not* I と *Bam*H I で切断して約 2.4 kb のイントロン 5 以降のフラグメントを切り出し、pBluescript SK (+)/*Not* I/*Bam*H I (p3') に組み込んだ。3' short arm 用 probe には、p3' から、*Pst* I と *Bal* I 消化により約 500 bp のフラグメントを切り出して用いた。ゲノムクローン λ 6115 も同様に *Not* I と *Bam*H I で切断してプロモーター領域を含む約 8 kb のフラグメントを pBluescript SK (+)/*Not* I/*Bam*H I に組み込み、ここから *Kpn* I と *Bam*H I で切り出した約 1.1 kb のフラグメントを 5' long arm 用の probe として使用した。また、pPGK-NeobpA から *Xho* I によりネオマイシン耐性遺伝子を切り出し、neo^r probe として使用した。Gel からの切り出しには、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン、東京) を用いた。

5) Probe の ^{32}P labeling 及び精製

第一章方法 Northern hybridization の際の probe の ^{32}P labeling 及び精製に従った。

6) Hybridization

第一章方法 Northern hybridization の際の hybridization の方法に従った。

7) シグナルの検出

Hybridization buffer を除去後 DNA ボトルに 2 \times SSC/0.1 % SDS を入れ、42 $^{\circ}\text{C}$ で 15 分間の洗浄を 2 回行った。次にタッパー内で 0.1 \times SSC/0.1 % SDS に浸して振とうしながら 65 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間の洗浄を 2 回行った。メンブレンはハイブリバック内に密封し、IMAGING PLATE (IP, FUJIFILM, 神奈川) に一晩露光させた。IP は FLA 3000 (FUJIFILM, 神奈川) により読みとり、ソフトウェア Image Gauge Ver.3.11 を用いて解析した。

相同組み換え体 ES クローンの解凍融解

24 well 内の凍結細胞に、37 °C の ES 培地を 0.5 ml 加え、速やかに培地を吸引除去した。再度 37 °C の ES 培地を 0.5 ml 加え、培地を十分溶かしてから吸引除去し、MMC 処理済フィーダー細胞 6×10^4 cells の入った ES 培地を 0.5 ml 加えて一晩 37 °C、5 % CO₂ 条件で培養し、毎日培地交換した。1 well の面積の 70-80 % ほどにコロニーが増殖したら、MMC 処理済フィーダー細胞 1×10^6 cells/well の敷かれた 6 well プレーットの 2 well に継代した。24 well プレーットの組み換え ES コロニーの well を 1 ml の 1×PBS で洗浄後、0.05 % trypsin を 150 µl 加え、37 °C、5 % CO₂ 条件で 5 分間反応させた。これに ES 培地を 150 µl 加え、ピペッティングにより single cell にほぐし、150 µl ずつ 1.9 ml の ES 培地の入った 6 well プレーット 2 well 分に播き、37 °C、5 % CO₂ 条件で培養した。1 well の面積の 70-80 % ほどにコロニーが増殖したら、2 ml の 1×PBS で洗浄し、0.5 ml の 0.05 % trypsin を加え、37 °C で 5 分間反応させた。これに ES 培地を 1 ml 加えて細胞を回収し、さらに 2 ml の ES 培地で回収し、800 rpm、4 °C で 5 分間遠心して細胞を集め、ES 培地 2 ml に懸濁した。このうち 0.25 ml (1/8 量) をさらに MMC 処理済フィーダー細胞入り 6 well プレーット 2 well に播いた。これは増殖を待って、1 well は染色体分析用に、1 well は凍結保存用に用いた。さらに 0.25 ml (1/8 量) を Southern blotting 用のゲノム DNA 回収用に 0.1 % gelatin コート 6 well プレーット 1 well に播き、可能な限り増殖させた。残りの 1.5 ml には、1.5 ml の 2 ×freezing 培地 (30 % FBS, 20 % DMSO を ES 培地に添加) を加え、1 ml ずつ凍結用チューブ 3 本に分注して -80 °C で凍結保存した。凍結保存用には、上記 1 well 分の ES 細胞もあわせて 5 本を保存した。

染色体分析 (karyotype analysis) (図 2-6)

あらかじめ 2 時間前に培地交換して増殖を促した ES 細胞 (6 well プレーット 1 well 分) を、0.02 µg/ml コルセミド入り ES 培地で培地交換し、2 時間 37 °C、5 % CO₂ 条件で培養した。2 時間後、浮遊細胞を培地ごと回収し、1 ml の 0.15 % trypsin で細胞表面を軽く洗い同じ遠沈管に回収した。もう一度 1 ml の 0.15 % trypsin を加え、37 °C、5 % CO₂ で 5 分間反応させ、ピペッティングにより single cell にして同じ遠沈管に回収した。これを 800 rpm、4 °C で 5 分間遠心して細胞を集め、ペレットをタッピングによりほぐした。これに 2 ml の 0.56 % KCl 溶液をタッピングしながら加えて懸濁し、37 °C で 20 分間インキュベートした。冷固定液 (CH₃COOH : methanol = 1:3) を、最初の 2 ml はタッピングしながら、その後 6 ml の冷固定液を加え混ぜた。800 rpm、4 °C で 5 分間遠心して細胞を集め、再び冷固定液 5 ml を加えて 800 rpm、4 °C で 5 分間の遠心を 2 回繰り返す。最後に冷固定液 0.5 ml に懸濁して 4 °C で保存した。

固定 ES 細胞溶液をスライドグラスに滴下して展開し、速やかに乾燥させた。これをギムザ染色し、MilliQ 水で洗浄後、風乾して顕微鏡で 1 細胞当たりの染色体数を 1 クローンにつき 30

細胞数え、染色体数が 40 本の細胞の割合を調べた。

キメラマウスの作製 (図 2-7, 8)

キメラマウスの作製は、須藤カツ子博士の御協力により行った。

1) マウスの系統

キメラマウスの作製は、集合キメラ法により行った。ES 細胞と共培養する胚は、C57BL/6J の雌と BDF1 (C57BL/6J×DBA/2 の F1) の雄との交配により得られた 2.5 日胚を用いた。ES 細胞と集合させた 3.5 日胚を移植する仮親マウスには、精管切除した ICR の雄と交配して偽妊娠させた ICR マウスの雌を用いた。

マウスは、明 12 時間 (8:00–20:00)、暗 12 時間 (20:00–8:00) で飼育し、specific pathogen free (SPF) 環境下で飼育したものを用いた。PMS (PEAMEX) 及び hCG (PUBEROGEN) は、三共 (東京) より購入した。麻酔は、10 %希釈ネブタールを体重 1 g 当たり 0.01 ml 腹腔内注射した。胚の培養は、37 °C、5 % CO₂ 条件下の CO₂ インキュベーター内で行い、採卵・酸性タイロッド処理など、CO₂ インキュベーター外での胚操作には M2 培地 (Hepes+, SIGMA, MO, USA) を、採卵後の胚・集合胚の CO₂ インキュベーター内での培養には M 16 培地 (Hepes-, SIGMA, MO, USA) を用いた。

2) マウスの準備

4-5 週齢の C57BL/6J の雌に交配の 2 日前の夕方 (17:00–18:00) に PMS、交配直前 (16:00–17:00) に hCG をそれぞれ 5 IU 腹腔内投与し、過剰排卵させて BDF1 の雄と交配した。翌朝膣栓形成を確認できたものを採卵用マウスとした。また、C57BL/6J の雌を交配した翌日に、6 週齢以上の ICR の雌の中から膣部分を見て発情しているものを選択し、精管切除した ICR の雄と自然交配し、翌朝膣栓形成を確認して偽妊娠マウスとした。

3) ES 細胞の準備

先に述べた方法で MMC 処理済フィーダー細胞を準備し、その上に凍結保存していた ES 細胞を戻した。培地は毎日交換し、培養状態の良い ES 細胞を 0.05 % trypsin で弱く処理して分離させ、10–20 個よりなる ES 細胞の塊を回収して、キメラマウスの作製に用いた。

4) 採卵

膣栓形成確認後 2 日で、採卵用マウスを解剖し、卵管及び子宮を M2 培地の中に取り出し、30 G の胚採取用シリンジを用いて灌流した。子宮は子宮頸のところから、卵管は卵管漏斗から灌流し、8 細胞から桑実胚期にある 2.5 日胚を回収した。

5) 集合キメラ法 (sandwich 法)

シャーレに刺しゅう針で穴をあけ、M16 培地のドロップを作り、ミネラルオイル (Embryo culture 用, SIGMA, MO, USA) で覆ったものを用意した。酸性タイロッド液 (pH 2.5) (100 ml

当たり NaCl 0.8 g, KCl 0.02 g, CaCl₂·2H₂O 0.024 g, MgCl₂·6H₂O, glucose 0.1 g, BSA 0.4 g) で処理して透明帯を除去した 2.5 日胚 2 個と、解離させた ES 細胞の塊をその穴に落とし、2 胚で ES 細胞を挟むようにして集合させて一晩培養した。

6) 子宮内移植

翌日、1 個の胚盤胞になったもの、及び桑実胚のままであるが 1 個の胚になって形の良いものを偽妊娠させた仮親マウスの子宮に移植した。仮親（偽妊娠）マウスの腹腔内にネンブタールを注射して麻酔をかけ、背中から筋層を開いて子宮部分を引き出した。実体顕微鏡下で 27 G シリンジを用いて子宮に穴をあけ、その穴に移植用ピペットをさして 3.5 日胚を注入した。

7) 帝王切開

移植の 17 日後に生まれなかったものは帝王切開を行った。妊娠マウスを解剖し、子宮内の胎子を取り出してキムワイプでよく拭き、肺呼吸をさせた。新生子の体が赤くなり、よく動くようになるまで白熱灯下で暖めながら蘇生を行った。別の仮親が妊娠している場合にはそこに里子に出し、仮親がいない場合には、前日か当日に出産した他のマウスを里親にした。

8) キメラ率の判定

生まれたマウスの毛色は、生後 1 週間ぐらいでわかるようになり、宿主胚由来のものは black 色、ES 細胞由来のものは由来する細胞により異なる色を呈する。キメラ率は、離乳時に、宿主胚由来の毛色の割合で判定した。

9) 生殖系列キメラの判定

ES 細胞は雄 (XY) に由来する。6-8 週齢に達したキメラマウスを C57BL/6J の雌と交配し、子マウスの毛色で、生殖系列の判定を行った。本実験で用いた E14.1 ES 細胞に由来する生殖系列キメラの子は野生色 (agouti) となる。20 匹以上の子マウスが黒色で、agouti の子が産まれなかった場合には、生殖系列キメラでないと判定した。

ノックアウトマウスのライン化

13 匹のキメラマウスのうち生殖系列の細胞がすべて ES 細胞クローン由来と思われるマウス即ち C57BL/6J と交配して生まれる子の毛色がすべて野生色 (agouti) であり、かつ多産のマウスを選びノックアウトマウスの産出に用いた。

第二章 結果

マウス 20 α -HSD ゲノム DNA のクローニング (図 2-2, 表 2-2)

129 SvJ mouse genomic library は、4-8 週齢の雌マウス肝臓由来のゲノム DNA を、*Sau* 3A I で部分消化した約 9-22 kb のゲノム DNA インサートを λ FIX II ベクターに挿入された library である。Library から 1×10^6 プラーク分の phage を取り、 1×10^5 プラーク分ずつ 10 の phage ストック溶液に分け、phage ゲノム DNA を抽出した。このゲノム DNA を鋳型にしてエクソン (E) 2 と E4 の間を検出する PCR を行い、20 α -HSD ゲノム DNA を組み込まれた phage クローンを含む phage ストック溶液を特定した。ポジティブな phage ストック溶液を希釈して含まれる phage の種類を減らし、同様に PCR で解析することで最終的に 5,000 プラーク中に 20 α -HSD ゲノムクローンが含まれる phage ストック溶液を特定した。さらにこの PCR 産物は同時に、plaque hybridization を行う時の probe としても利用した。このような screening の結果、E1 の上流約 8 kb と E1 から E3 までを含む約 15 kb の λ 6115, E1 から E8 を含む約 17.5 kb の λ 1212, E1 から E5 を含む約 12.5 kb の λ 2431, E2 から E8 を含む約 13.5 kb の λ 9527, E8 と E9 を含む約 14 kb の λ 3217 の 5 種類のゲノムクローンを得た。それぞれのゲノムクローンを統合した結果、マウス 20 α -HSD ゲノム遺伝子は、全長約 18 kb で、E1 から E9 までを含み、E1 の開始コドン (ATG) の 50 bp 上流には転写開始点、その上流には TATA ボックスが見られた。エクソンとイントロンの結合部位には、GT-AG 則が保存されていた。エクソンの数、各々のエクソンの長さは、ラット 20 α -HSD [Zhong et al. 1998], ヒト 20 α -HSD [Nishizawa et al. 2000] と全く一致していた。

ターゲティングベクターの構築 (図 2-3, 図 2-5)

AKR superfamily で保存されているアミノ酸 Asp 50, Tyr 55, Lys 84, His 117 は、E2 から E4 にコードされていた。最初に得られたゲノムクローン λ 2431 が 20 α -HSD の触媒活性部位をコードする E2 から E4 を含有していたことから、20 α -HSD 遺伝子の標的破壊部位は E2 から E4 とし、ターゲティングベクター作製には λ 2431 を用いた。この部位を欠失させるかわりに、EGFP 遺伝子を挿入し、20 α -HSD 遺伝子の発現細胞を検出できるようにした。EGFP の発現方法には、EGFP 遺伝子上流に IRES 配列を、下流に poly A を連結し、20 α -HSD プロモーターで転写された IRES/EGFP/poly A の IRES から EGFP が翻訳されるようにした。本実験では EGFP 遺伝子がスプライシングの対象にならないように、EGFP は E2 の途中から挿入した。内因性の 20 α -HSD は、E2 において停止コドン挿入し、E2 以降の翻訳は起こらないようにした。停止コドンの挿入は、PCR により行った。すなわち、E2 上の cDNA 配列を停止コドンに変え、組み込み用に制限酵素認識サイトも繋いで reverse primer を設計し、E2 上流のイントロン配列を forward

primer とする primer セットで PCR を行い、得られた PCR 産物をターゲティングベクターに組み込んだ。

ターゲティングベクターには、非相同組み換えを起こして ES 細胞にベクターが組み込まれた場合に発現してその細胞を自滅させるためのネガティブ選別用としてジフテリアトキシン A (DT-A) 遺伝子を、また相同組み換えを起こした場合には、G418 を加えても耐性を有して生き残るためのポジティブ選別用として、ネオマイシン耐性 (neo^r) 遺伝子を発現させるようにターゲティングベクターを設計した。ランダムに組み換わった細胞を排除するためにも、neo^r 遺伝子の発現を 20 α -HSD 遺伝子のプロモーターに委ねるのが理想的であるが、20 α -HSD が ES 細胞において高レベルで発現しているという報告はないため、neo^r 遺伝子には、専用の ES 細胞で強力に発現する PGK プロモーターと poly A を連結した。

完成したターゲティングベクター pTV-DT は、pBluescript SK (+)ベクター部分も含めて全長約 14.2 kb で、5' long arm として、5' 端の DT-A 遺伝子に連結して E1 から E2 の一部まで含む約 5 kb のゲノム DNA 断片、3' short arm としては E5 を含む約 1.5 kb のゲノム DNA 断片を有し、両 arm の間に EGFP 遺伝子と、逆向きに挿入された neo^r 遺伝子から成る。エレクトロポレーションに際してベクターの大量調整を行ったが、ベクターが長いため、従来の LB/Amp 培地での培養では十分量の plasmid を回収できなかった。そこで培地を Terrific broth/Amp 培地に変えて培養したところ、大量の plasmid を回収できた。ターゲティングベクターは、DT-A 遺伝子側のマルチクローニングサイト内 Sac II で切断することにより直鎖状にしてからエレクトロポレーションに用いた。

相同組み換え ES 細胞の単離 (図 2-5, 図 2-6)

第 1 回目のエレクトロポレーションでは、7 日間の G418 添加培地での培養により耐性を示したコロニーを 420 個 pick up した。そのうち 369 クローンを、相同組み換え領域の外側 3' 領域に probe を有する Southern blotting (*Pst* I 消化) により screening した結果、1 つの ES クローンにおいて wild type gene では E4 と E5 を含む約 4 kb の断片を検出し、mutant gene からは、E5 のみを含む約 2.2 kb の断片を検出した。Southern blotting において相同組み換えが確認されても、染色体分析により細胞自身の異常が発覚した場合や、キメラマウスが不妊の場合破棄の対象となる可能性があるため、少なくとも 2 つ以上のポジティブクローンを用意しておいた方が無難である。そこで、pTV-DT1 にもう 1 つ DT-A 遺伝子を並べて接続した pTV-DT2 を用いてもう一度エレクトロポレーションを行った。DT-A 遺伝子を再付加した理由は、pTV-DT1 では直鎖状にする際 DT-A 遺伝子がターゲティングベクターの 5' 末端からわずかに数塩基の位置に存在するため、エレクトロポレーション後に細胞内 exonuclease の働きによって分解され、その機能を十分に発揮できない可能性があり、screening の効率を上げるために行った。

第 2 回目のエレクトロポレーションでは、G418 耐性コロニーを 720 個 pick up し、Southern blotting により 681 個のクローンを解析した結果、3 つのポジティブクローンが得られ、ターゲティングベクター改良の効果を思わせた。

3'側を分析する Southern blotting によりポジティブと判断したクローンは、さらに相同組み換え領域の外側 5'領域に設定した probe を用いて Southern blotting を行い(*Bgl* I 消化), wild type gene では E1 から E7 まで含む約 20 kb を, mutant gene では IRES 配列内部から E7 までの約 10 kb を検出し、5'側も理論通りに組み換えが起こっていることを確認した。さらに、wild type gene には存在しない neo^r 遺伝子の存在も、Southern blotting (*Bam*H I 消化) によりポジティブクローンにおいて IRES/EGFP/neo^r/E5 を含む約 5.5 kb の断片として検出した。本実験では、probe は plasmid に挿入したゲノム DNA から、制限酵素反応により切り出して使用したが、probe が大量あるいは頻回に必要な場合は、PCR により probe として特定領域を増幅する方が短時間で大量の probe を回収できると思われる。

Southern blotting によりポジティブな結果が得られた 4 つのクローン (1A-1, 10A-6, 20D-5, 23B-6) を相同組み換えが起こったクローンと判断したが、キメラマウス作製に備え、染色体数が異常な細胞を多く含むクローンを排除する目的で、その染色体数を分析した。細胞の 70 %以上が正常な染色体数 (40 本) を有するクローンは 4 クローン中 2 クローン (10A-6 と 20D-5) であったが、いずれも正常染色体数を有する細胞の割合は 90 %以上と高かった。正常染色体数を有する細胞の割合は、クローン 1A-1 では 10 %に満たず、23B-6 でも 40 %以下であった。そこで 10A-6 と 20D-5 をキメラマウス作製に用いた。

キメラマウスの作製 (図 2-8, 表 2-3)

集合キメラ法により出生したキメラマウスは、クローン 10A-6 からは 12 匹、クローン 20D-5 からは 1 匹であった。性染色体が XX と XY の細胞に由来するキメラマウスでは、精巣内のセルトリ細胞の殆ど全ては XY となるが、それ以外の組織ではそのような偏りはみられない [Palmer et al. 1991]。従って、XY の ES 細胞と XY の細胞のキメラであっても、おそらく ES 細胞由来の細胞は体組織にほぼ均一に分布すると考えられる。従って、キメラマウスの毛色への ES 細胞の寄与の程度は生殖細胞系列への寄与の程度と相関があり、毛色からある程度キメラ率を推測できる。本実験では、キメラマウスにおいて全体の毛色のうち、黒色が何%残っているかでキメラ率を判定したところ、10A-6 由来では 100 %が 10 匹、残りの 2 匹には背部に黒色が残っていた。20D-5 由来の 1 匹のキメラマウスは 100 %であった。キメラマウスには、尻尾に至るまで野生色、cream 色、白色が混在して現れ、眼色が片方ずつ pink 色と黒色のもの、両眼とも pink 色のものも存在した。

キメラマウス (雄) を C57BL/6J の雌と交配し、産子の毛色により ES 細胞が生殖細胞に分化

しているかどうかを判定した。キメラマウスが由来を持つ細胞の系統の毛色遺伝子は、

ES 細胞 E14 が由来する 129/Ola 系統 ; A^w/A^w , B/B , c^{ch}/c^{ch} , D/D , p/p

C57BL/6J 系統 ; a/a , B/B , C/C , D/D , P/P

DBA/2 系統 ; a/a , b/b , C/C , d/d

BDF1 系統 ; a/a , B/b , C/C , D/d

である。従って 129 系統に由来する生殖細胞と C57BL/6J の生殖細胞との接合体は、必ず $A/-$, $B/-$ の野生色 (agouti) となる (図 2-8)。キメラマウス 13 匹中、5 匹 (No.1, 6, 8, 10, 13) では産子はすべて野生色であった。また 3 匹 (No.5, 11, 12) の産子はすべて黒色で、1 匹 (No.7) は不妊、残りは野生色と黒色の両方の産子をもうけた。すべての産子が野生色であるキメラマウスのうち、繁殖成績のよいマウス (10A-6 からは No.6, 20D-5 は No.13) をノックアウトマウスの産出に用いた。

第二章 考察

129SvJ mouse genomic library の screening により, 全長 20 α -HSD ゲノム DNA が得られた. Library の screening では, 一般に全長 cDNA が probe として用いられるが, 20 α -HSD 遺伝子に関しては, これが互いに高い相同性を有する AKR superfamily に属すること, 全長 cDNA を probe として plaque hybridization を行った際にラット肝臓 3 α -HSD と一部 93 %の相同性を有し, ウサギ卵巣 20 α -HSD, ウシ prostaglandin F synthase II, ラット卵巣 20 α -HSD らと一部高い相同性を有するが, sequencing の結果マウス卵巣 20 α -HSD とは異なる遺伝子が単離されたことなどから, probe の特異性の向上を期待して, ゲノム DNA を鋳型にして PCR を行い, 20 α -HSD のイントロン配列を増幅することでイントロン配列を含む probe を用意し, plaque hybridization に持ち込むという方法をとった.

ラット卵巣 20 α -HSD cDNA はエクソン (E) 1 から E9 に分けられるが, 各イントロンの長さは不明であった [Zhong et al. 1998]. そこでマウス卵巣 20 α -HSD cDNA 上にラットと同様な区分を想定し, エクソン上に primer を設計し, 比較的長いフラグメントの増幅にも適する Ex Taq DNA polymerase を用いて, library の phage 100,000 プラーク分から抽出した phage ゲノム DNA を鋳型にして PCR を行ったところ, E2-E4 で約 2 kb, E2-E5 で約 3 kb の PCR 産物が得られたが, E1-E2 では何も増幅されなかった. E2-E4 産物を sequencing した結果, マウス 20 α -HSD cDNA の配列と一致した配列が確認され, また E2-E5 産物を鋳型にした PCR でも E2-E4 産物が増幅されたため, さらにこれを約 5,000 プラーク内で増幅できる phage ストック溶液を希釈により特定した. E2-E4 の約 2 kb のフラグメントを probe にして plaque hybridization を行い, 最終的に 45,000 プラーク中で 8 個のポジティブプラークを得た. 本実験では各希釈段階の phage 溶液から phage ゲノム DNA を抽出して PCR に用いたが, phage 溶液を一部とり, 100 °C で 10 分間熱変性させ, 氷上で急冷したものを鋳型にしても PCR で増幅反応も可能であり, phage ゲノム DNA 抽出のステップを省けばさらに効率よく screening できると考えられる.

最初に得られたゲノムクローン λ 2431 は, 約 12.5 kb の長さを持ち, ターゲティングベクターへの利用を考えて, 全長の塩基配列決定を試みた. その結果, λ 2431 には E1 から E5 まだが含まれることが判明した. イントロン 1 とイントロン 5 の一部は配列決定ができなかったが, 各数 kb の配列は決定でき, ターゲティングベクター作製には十分な情報となった. ゲノム DNA の塩基配列決定には, λ 2431 を制限酵素 *Alu* I, *Mbo* I, *Hae* III で部分消化し, ベクターに組み込んで塩基配列決定し, 相同領域どうしを繋ぎ合わせて配列を決定した. エクソン近辺はエクソンという足がかりがあるため比較的順調に決定されたが, イントロン内では長い繰り返し配列も見られ, 位置の同定が困難であった. 従って, イントロン 1 とイントロン 5 の長さがかな

り長いことが予想された。そこで E1-E2, E5-E6 の増幅に対して, Taq DNA polymerase を Ex Taq DNA polymerase から Klen Taq LA polymerase に代えて, λ 2431 あるいは phage ゲノム DNA を鋳型にして PCR を試みたところ, 各々約 5.1 kb と約 4.7 kb のフラグメントが増幅された。

λ 2431 には E1 上流に約 600 bp のプロモーター領域が含まれていたため, ここに PCR の primer を設計し (P2F primer), E1 との間で PCR を行い, 得られた約 0.5 kb の増幅産物を元に, λ 2431 と同様な方法で 5' 上流域のゲノムクローン λ 1212 も得た。また, 同様に E6-E7 の PCR による約 0.4 kb の増幅産物を元に, ゲノムクローン λ 9527 を得た。 λ 1212 は λ 2431 より 5' 上流域に約 1.5 kb しか伸びず, λ 9527 は λ 2431 より 3' 上流域に伸びたが E8 までしか含まれていなかったため, さらに各々のクローンの *Bam*H I 切断産物である, イントロン領域を含む配列を probe にして plaque hybridization により λ 6115 と λ 3217 を得た。 λ 6115 は E1 上流約 8 kb, λ 3217 には E9 も含まれており, 20 α -HSD ゲノム DNA 全長をクローニングすることができた。各ゲノムクローンを sequencing または PCR, 制限酵素切断により並べ合わせ, マウス卵巣 20 α -HSD ゲノム DNA 全長のエクソン・イントロンの配置を推定した。制限酵素 *Bam*H I は, ゲノム DNA 上約 5 kb 間隔でその認識サイトが存在し, 長いゲノム配列を扱いやすい適度な長さに分断するのに大変有用であった (図 2-2)。

20 α -HSD ゲノム遺伝子は, ヒトで既にクローニングが報告され, そのゲノム構造も明らかにされている [Nishizawa et al. 2000]。ヒト 20 α -HSD (AKR1C1), マウス 20 α -HSD, ラット 20 α -HSD (AKR1C8) のゲノム構造において各エクソンの長さはすべて一致していた。すなわち, いずれもアミノ酸の数は 323 で, エクソンとイントロンの境目はすべて一致していた。さらに, aldo-keto reductase (AKR) superfamily のメンバーであるヒト 20 α -HSD (DD1, AKR1C1), ヒト bile acid binding protein (BABP, 3 α -HSD Type 3, AKR1C2), ヒト prostaglandin F synthase (PGFS, AKR1C3), ヒト dihydrodiol dehydrogenase 4 (DD4, 3 α -HSD Type 1, AKR1C4), マウス 17 β -HSD Type 5 と, すべて各エクソンの長さは一致していた。ヒトでは BABP, PGFS, DD4 は, chromosome 10p 14-15 の領域に 20 α -HSD 遺伝子と並んで存在し, また高い相同性を有することが報告されており, AKRs が遺伝子重複により進化的に多様化したモデルと考えられている。

一方, 同じ AKRs でも, マウス aldehyde reductase (AKR1A4) は, アミノ酸の数が 325 と異なるものもある。また面白いことに, ラット肝臓 3 α -HSD Type 1 (AKR1C9) は, 他の AKR 1C とは異なり, ORF が 966 bp で, 322 アミノ酸から成る。即ち, E5 で 3 塩基少ない代わりに, E6 が 3 塩基多く, また E9 において停止コドンが他の AKR1Cs に比べて 1 アミノ酸分前にずれているが, 他のエクソンの長さは他の AKR1Cs と全く同じである。ラット 3 α -HSD はゲノムレベルで Type 1, 2, 3 が報告され, これらは ORF が同じであるが, Type 2 は E2 から E5 が連結しており, Type 1 と Type 3 はイントロンの長さのみが異なる。ラット肝臓では Type 1 が主に転写されており, Type 2 と Type 3 は偽遺伝子である可能性もある [Lin et al. 1999]。またゲノム構

造も、ヒトとマウスの AKRIC に比べると若干エクソンの配置が異なっている (図 2-9)。従って、 3α -HSD 遺伝子では由来は同じでもラットにおいてかなりの遺伝子重複が起こったことが予想され、停止コドンの前方変異も、もともと 323 番目のアミノ酸が停止コドンであったものが、遺伝子重複の結果偶然生じたサイレント突然変異であるかもしれない。図 2-9 に AKRs のゲノム構造を並べて示したが、面白いことに、ラット 3α -HSD、ヒト DD4 以外のゲノム構造では、ほぼ一致して E2 から E5 が約 3 kb 以内に並ぶ構造をとっていた。また、いずれのゲノム構造においても、E6-E7 が近接していること、E8 と E9 の間隔もほぼ一致しており、これらの遺伝子の種を越えた保存性の高さを伺わせ、これらの遺伝子が AKRs の中でもより下流に同一の祖先遺伝子を持つ可能性が考えられる。ヒトにおける 20α -HSD は主に肝臓、副腎、腎臓で発現しているが、生殖器官では卵巣、子宮、胎盤、精巣、また筋肉、末梢血白血球でも RT-PCR で発現が検出されている。プロモーターassay によると、ラット肝細胞で活性が高く、さらに卵巣においては、hCG により黄体化したブタ顆粒層細胞におけるプロモーターassay で、無処置で活性が見られ、 $\text{PGF}_{2\alpha}$ と oxytocin の添加によりさらに活性が上昇し、ラットやマウスにおける発現制御との共通性も見られる。しかしヒトでは分娩直前に胎盤において 20α -OHP が増加するものの、progesterone の減少は見られない。また性周期中もラットやマウスと異なり、排卵後黄体が機能化する完全性周期を回帰するため、その生殖機構における 20α -HSD の働きは、ラットやマウスほど顕著ではないと思われる。この違いには、ヒトにおける 20α -HSD 発現細胞内の環境の違いが関わっている可能性もあるが、一方、プロモーター領域の相同性がヒトとラットで 50 % と低いことも事実であり、その働きの違いにはさまざまな因子の関わりが考えられる [Nishizawa et al. 2000]。

完全性周期と不完全性周期を区別する決定的因子を、 20α -HSD 発現制御の違いに求めるとすると、ヒトとマウスの 20α -HSD の由来が同じであることは興味深い情報である。仮に同じ先祖遺伝子から生じたとすれば、全く平行に別々に進化した結果異なる意義を持つようになったのであろうか。ラットやマウスの肝臓での 20α -HSD 活性発現については、現在のところマウス胎子肝臓以外に報告はない。AKRs は、その多くが肝臓で発現していることから、もともと先祖遺伝子は肝臓において体内のステロイドや prostaglandin、外来異物の代謝などの体内浄化機構において生命維持に重要な役割を担っていたことが考えられる。一方、ステロイド代謝作用がある以上、ステロイド産生器官、ステロイド標的器官においてその発現を利用できることは言うまでもない。ヒト 20α -HSD が、そのプロモーターに齧歯類における制御を思わせる $\text{PGF}_{2\alpha}$ や oxytocin に対する感受性を持つことも興味深い。筆者は、原始哺乳類においては、 20α -HSD プロトタイプの分子が共に肝臓、卵巣において同じような働きを持って発現していた時期があると想定する。ところが齧歯類では、偶然 progesterone 産生器官である黄体においてその形成直後より 20α -HSD を発現させるものが現れ、その結果繁殖効率が向上し、環境に対する適応力が

高まって淘汰を免れてきた。その生殖戦略における重要性と、progesterone 産生器官で直接不活化するという効率の良さから今日までその発現様式は固定されていると思われる。一方、肝臓で発現していた方の 20 α -HSD プロトタイプの分子はやがて卵巣の 20 α -HSD 分子にその働きを委ね、自身は遺伝子重複により変化し、20 α -HSD とは異なる分子に形を変えたのではないだろうか。実際、同じ AKR に属し、肝臓で発現するマウス 17 β -HSD Type 5 は、recombinant 蛋白においてわずかながら 20 α -HSD 活性を併せ持ち、ゲノム構造の面からも 20 α -HSD とかなり進化的に近い分子である可能性がある [Rheault et al. 1999]。さてヒト卵巣で発現する 20 α -HSD は、齧歯類ほど強力な発現変動を持たず、また妊娠期には卵巣以外に胎盤からも progesterone が産生され、妊娠第 6 週以降に卵巣を摘出しても妊娠が持続することからも、卵巣での progesterone の直接的制御はさほど効果的ではないとすると、ヒトでは血液を介して不要な progesterone が運ばれてくる肝臓での 20 α -HSD 分子の働きが重要なまま、その肝臓での発現を現在もとどめているのではないだろうか。

本実験で用いた ES 細胞株は、E14.1 で、CCE, D3, R1 と共に 129 系統に由来する。ES 細胞と同じ系統のマウス由来のゲノム DNA を用いることは、相同組み換え頻度を上げる 1 つのポイントであり、ここでは第一章でクローニングした ICR の 20 α -HSD cDNA 配列を元に、129 系統由来の genome library から単離したゲノムクローン λ 2431 をターゲティングベクターの構築に用いた。 λ 2431 は全長約 12.5 kb であり、E1 から E5 が含まれ、E1 は 5'端から約 0.6 kb の位置にある。ターゲティングベクター内の相同領域の長さは置換領域を挟む long arm, short arm 合わせて 5–8 kb が一般的である。従って λ 2431 では E1 上の開始コドンの破壊は不可能であったため、本酵素の触媒活性発現に必須とされる 4 アミノ酸をコードする、E2 から E4 の領域にポジティブ選別マーカー (neo^r) 遺伝子及び EGFP 遺伝子を挿入し、置換領域とした。E1 を残すため、挿入する外来遺伝子は、イントロン 1 内に挿入すると内因性 20 α -HSD 発現機序においてスプライシングの対象になってしまう。従って挿入遺伝子は E2 の途中から繋いだ。置換されたゲノム DNA からは、20 α -HSD のプロモーター活性化により、E2 の停止コドンを含む IRES/EGFP/poly (A)が転写産物として生成され、IRES にリボソームが作用することで EGFP が翻訳されるはずである。また、一般にターゲティングベクターの両端は、ES 細胞内の exonuclease 活性により削られる可能性があるため、相同領域外に接続するネガティブ選別マーカーの外側には plasmid 部分の配列が来るようにターゲティングベクターは設計される。しかし本実験ではターゲティングベクター構築の設計上 DT-A 遺伝子の外側に十分な長さの plasmid 配列を持つてくることができなかった (pTV-DT1)。第 1 回目では、技術の習得も兼ねて pTV-DT1 を用いてエレクトロポレーションを行ったが、第 2 回目には DT-A 遺伝子の外側にさらにもう一つ DT-A 遺伝子を接続し、一番外側の DT-A 遺伝子が削られて機能を失っても、内側の DT-A によりネガティブ選別を行えるようにした (pTV-DT2)。

1 回のエレクトロポレーションで、 1×10^7 cells の ES 細胞に 20 μg のターゲティングベクターを導入したものを 5 セット作製した。一晩培養後、250 $\mu\text{g/ml}$ の G418 入り ES 培地で 7 日間毎日培地交換することで、G418 耐性コロニーを選別した。始めディッシュ内全体に盛んに増殖の見られたコロニーも、3 日目には G418 の影響で死亡し、培地に浮遊するものも現れ、やがてコロニーどうしの間隔が単離するのに十分になるくらいに減少した。Pick up するコロニーには、分化の可能性があるため薄く輪郭がギザギザしたものを避け、未分化状態で増殖が活発であると思われる、中心部が密に盛り上がって輪郭の滑らかなコロニーを選んだ。エレクトロポレーションにより、相同組み替えの起こった ES 細胞は、Southern blotting 解析により、運良く 2 つの allele で相同組み換えが起こらない限り、片方の allele のみで相同組み換えが起こったヘテロ遺伝子型として検出される。相同組み換えを確認できたクローンは、pTV-DT1 を用いた場合は、369 クローン中 1 クローン（約 0.2 %）、pTV-DT2 を用いた場合では、681 クローン中 3 クローン（約 0.4 %）であり、効率は 2 倍に上昇した。その内 2 クローンは、染色体数に異常が見られたため、キメラマウス作製に進めたのは最終的に 2 クローン（10A-6, 20D-5）となった。これら 2 クローンからキメラマウス 13 匹を作製した。キメラマウスにおける ES 細胞の寄与の度合いが高いほど、その毛色に宿主胚由来の黒色が少ないと考えられるため、黒色がほとんど見られない 10 匹について主に C57BL/6J の雌と交配し、産子（F1, agouti）の毛色により ES 細胞がキメラマウスにおいて生殖系列の細胞に分化しているかどうかを確認した。その結果、生殖系列の細胞に分化が見られ、かつ繁殖成績も良かったキメラマウスを、ES クローン 10A-6, 20D-5 それぞれにつき No. 6 と No. 13 としてライン化することにした。第三章においては、これらキメラマウス由来の F1 ヘテロを交配し、ノックアウトマウスを作製してその表現型の解析を行った。

primer	location	sequence (5'-3')	product length (kb)	annealing temperature (°C)	Taq DNA polymerase
P2F	-495 - -476	AAGGGTTTCATAGACAGTAT	0.53	50	Taq Gold
E1R	29 - 48	AATGGAGTGACCATCATTTA			
E1F	29 - 48	TAAATGATGGTCACTCCATT	5.1	50	Klen Taq LA
E2R	193 - 212	TCTTCAATCTTGCTTAGAAT			
E2F	193 - 212	ATTCTAAGCAAGATTGAAGA	1.8	50	Ex Taq
E4R	410 - 429	ATCCACTGTGTCAAATATTA			
E2F-up	133 - 152	GGGTTC TGCCATATTGATTG	2.8	60	Ex Taq
E5R	503 - 522	CTCCAGTTGTCTACGGTTAA			
E5F	484 - 503	TCCATCGGGGTGTCTAACTT	4.7	60	Klen Taq LA
E6R	626 - 645	GGCAACCAGAACAATGTCAT			
E6F	608 - 627	TGGCCTACTGCAAGATGAAT	0.4	60	Ex Taq
E7R	723 - 742	ACTTCTTTGCCATGGCACAA			
E8F	857 - 876	TCCAATTGGCTTCAGATGAC	2.3	58	Ex Taq
E9R	1028 - 1047	TCGAGTTATTGGCATCTGAG			

表2-1. ゲノムクローニングに用いたPCR primer.

ラット20 α -HSDゲノム構造 [Zhong et al. 1998] を元に、各エクソン上にprimerを設計した。各primerの位置は、マウス卵巣20 α -HSD cDNA配列上開始コドンのアデニンを+1とした場合の塩基数で示した。ただしP2FはゲノムDNA 配列上の塩基数で示した。

Taq Gold ; Ampli Taq Gold.

Klen Taq LA ; Klen Taq LA DNA polymerase mix for long, accurate PCR.

EX Taq ; TaKaRa Ex Taq.

exon	size (bp)	cDNA nucleotide number	sequence at the exon-intron junctions		intron	size (kbp)
			3'-splice acceptor	5'-splice donor		
1	134	-50-84		...ACT GAA GAG gt aataaaaa T E E	1	5.1
2	168	85-252	gtttcttt ag CAT CTC AAG... H L K	...ACT TCG AAG gt atgttcta T S K	2	0.8
3	117	253-369	tcttctgc ag CTT TGG TCA... L W S	...TCT CTG AAG gt aggcaatt S L K	3	1.0
4	78	370-447	actattcc ag CCA GGG AAT... P G N	...ACA TGG GAG gt gagtgact T W E	4	1.0
5	123	448-570	ccttcccc ag GCC ATG GAG... A M E	...TGC AAC CAG gt gaggttct C N Q	5	4.7
6	110	571-680	ttatgtac ag GTA GAA TGC... V E C	..C AAA TAC TG gt aataacaa (Y) K Y (C)	6	0.4
7	166	681-846	ttccttcc ag T ATA AAT GA.. (C) I N (E)	...AAC ATG CAG gt gatgaaga N M Q	7	1.5
8	83	847-929	tctgtaac ag GTC TTT GAT... V F D	..T GCT GAT AT gt aagaaact (P) A D (M)	8	2.3
9	210-	930-	cttactgc ag G TTT AAG GC.. (M) F K (A)			

表2-2. 20 α -HSDゲノムDNAにおけるエクソンとイントロンの結合部位の配列.

各エクソンのサイズはラット [Zhong et al. 1998] , ヒト [Nishizawa et al. 2000] の 20 α -HSDと完全に一致していた.

ESクローン													20D-5
10A-6													
キメラ 毛色 (No.)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
♂	13	1	6	0	0	36	0	42	0	4	0	0	25
Ag (匹)													
♀	14	1	2	1	0	41	0	27	2	3	0	0	31
BL (匹)	0	27	20	23	36	0	0	0	45	0	7	7	0

表2-3. 約3ヶ月間におけるキメラマウスの繁殖成績.

C57BL/6Jと交配して野生色 (agouti, Ag) の子が生まれる個体では, 発生過程でES細胞が生殖系列の細胞に分化したと考えられる. すべての子が野生色であるキメラマウスのうち, 繁殖成績のよいマウス (丸印) をノックアウトマウスの産出に用いた. No.11とNo. 12はキメラ率が低かったので交配は1回のみ行った.

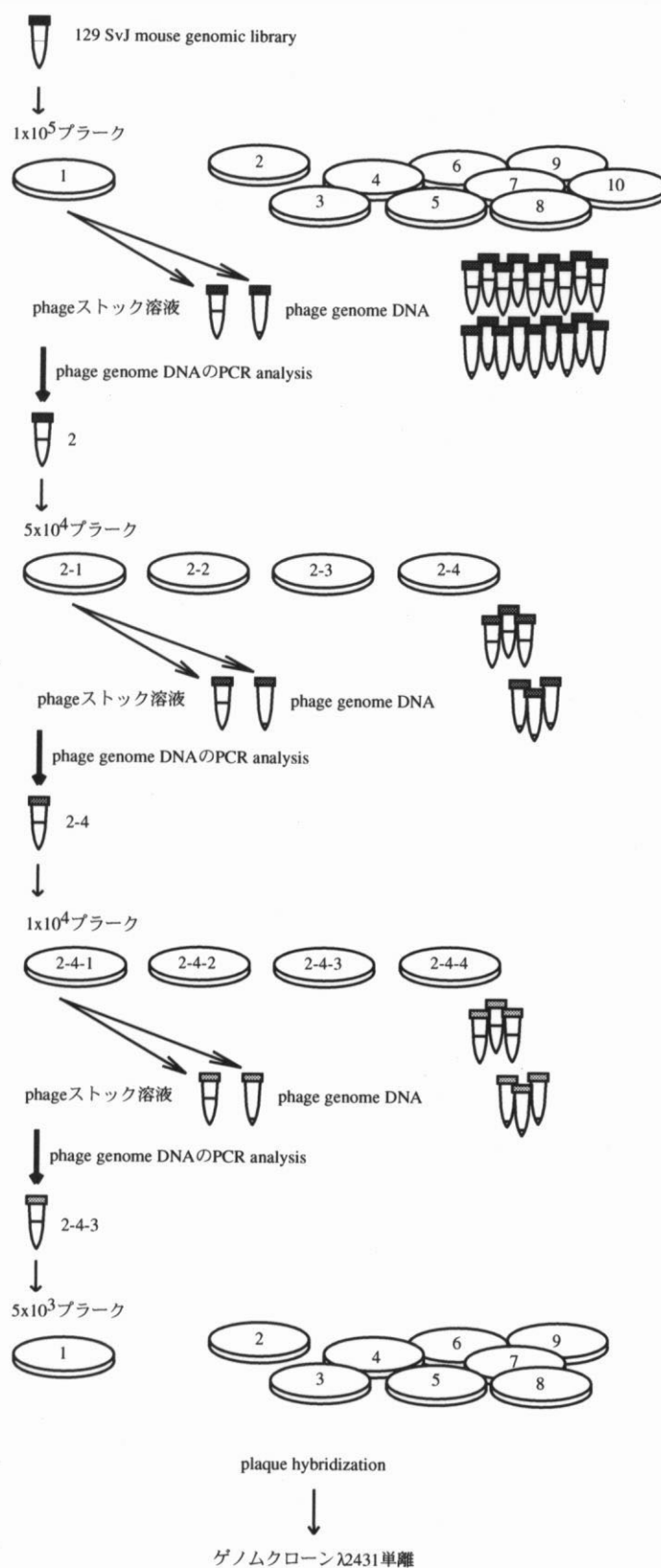


図2-1. PCRを用いた129SvJ mouse genomic libraryからのλ2431単離の概略

20 α -HSD genome DNA

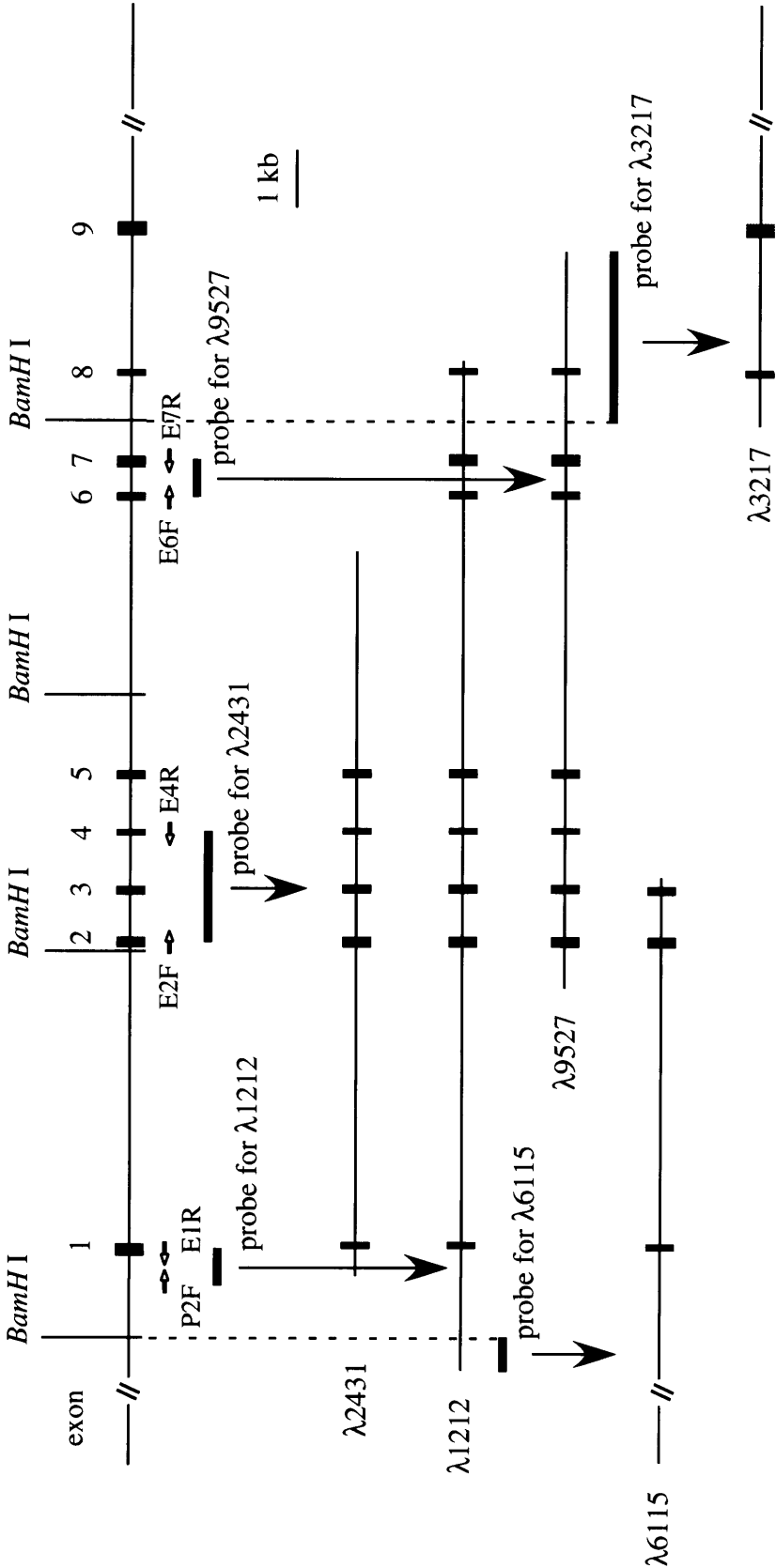


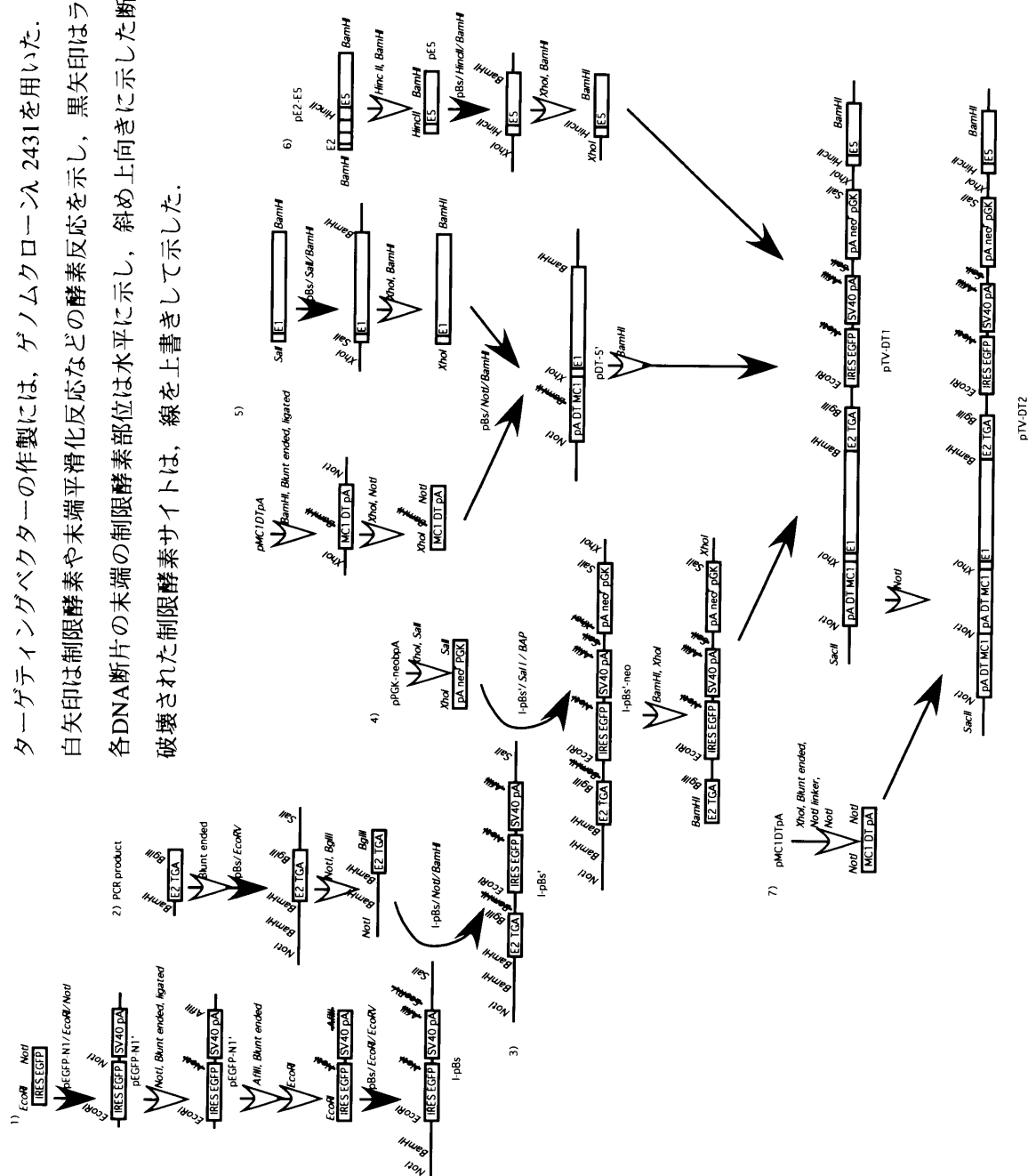
図2-2. 20 α -HSDゲノムクローンと全長ゲノム構造

図2-3. ターゲティングベクターの作製

ターゲットベクターの作製には、ゲノムクローン 2431 を用いた。

白矢印は制限酵素や末端平滑化反応を示し、黒矢印はライゲーション反応を示す。

各DNA断片の末端の制限酵素部位は水平に示し、斜め上向きに示した断片内部の制限酵素部位と区別した。破壊された制限酵素サイトは、線を上書きして示した。



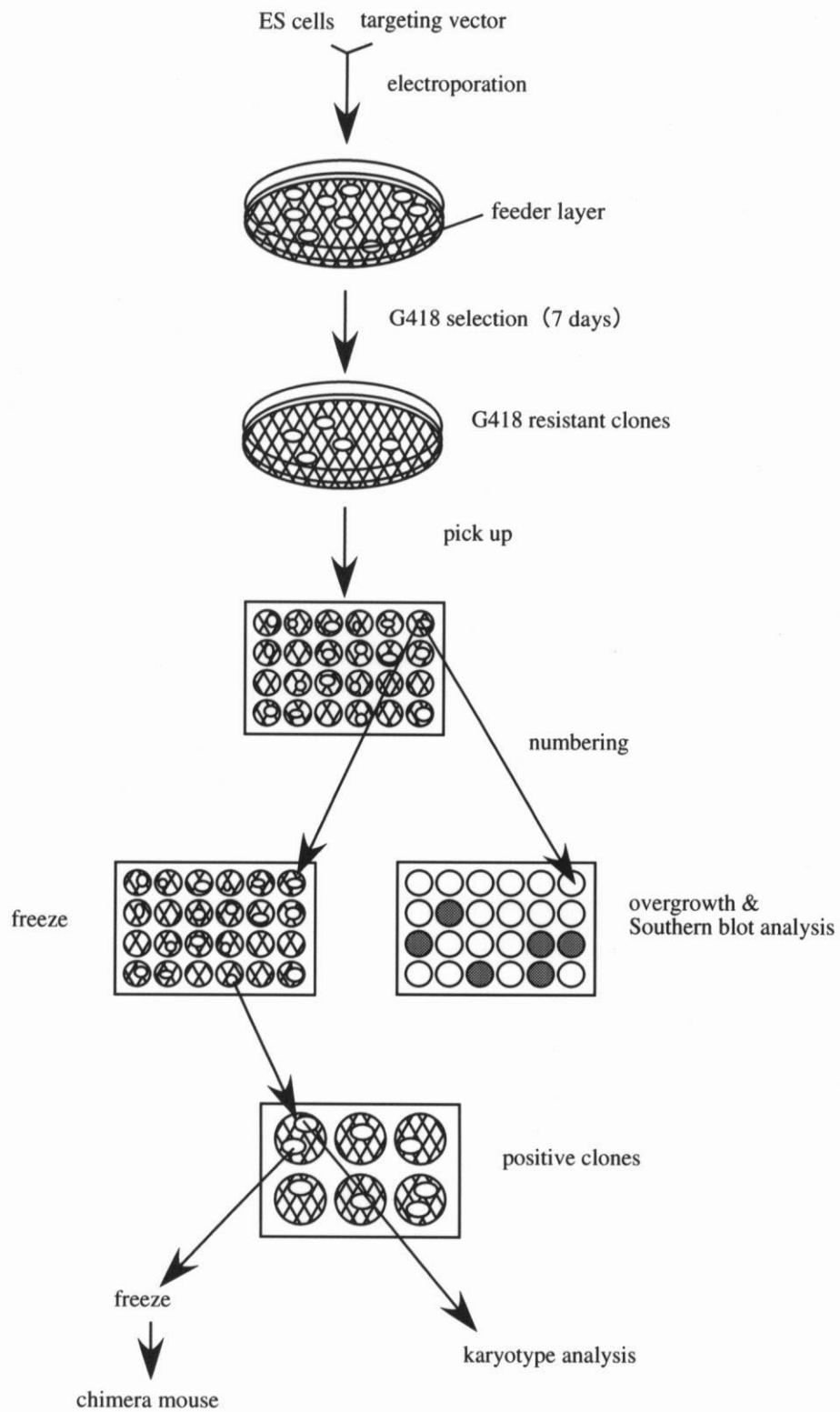


図2-4. エレクトロポレーションからポジティブESクローンの単離までの流れ

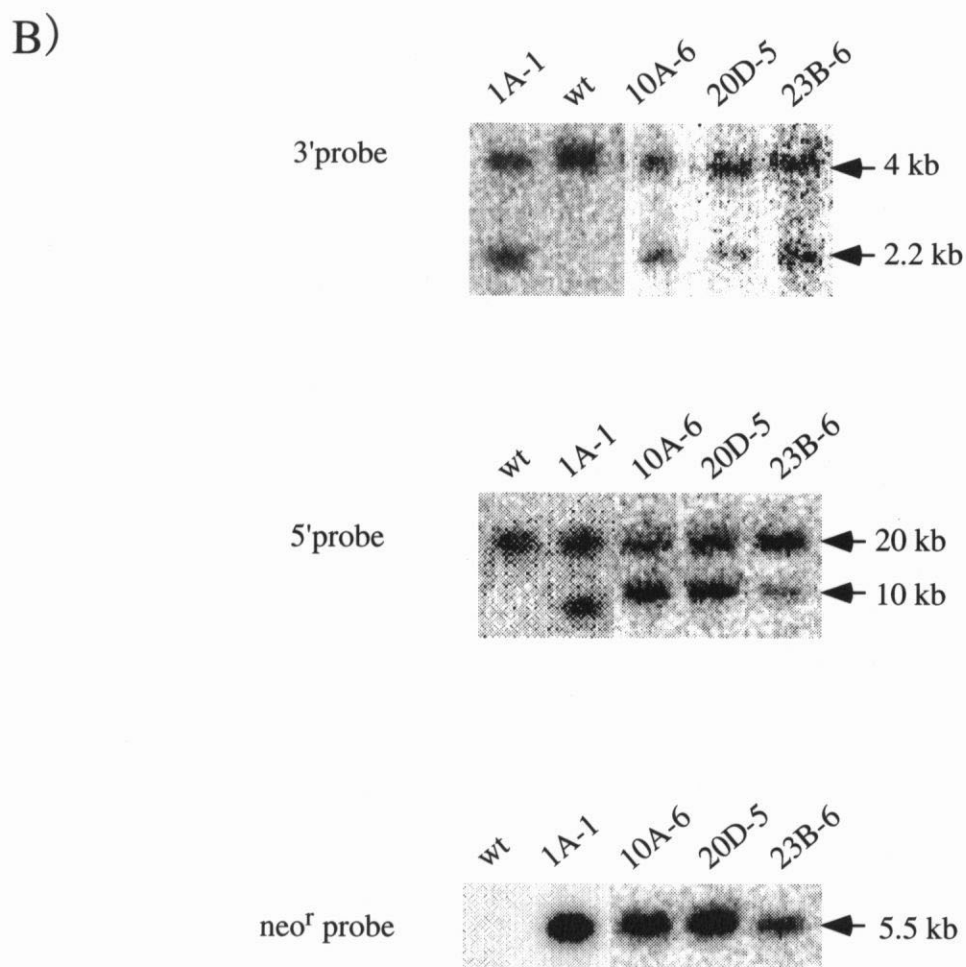
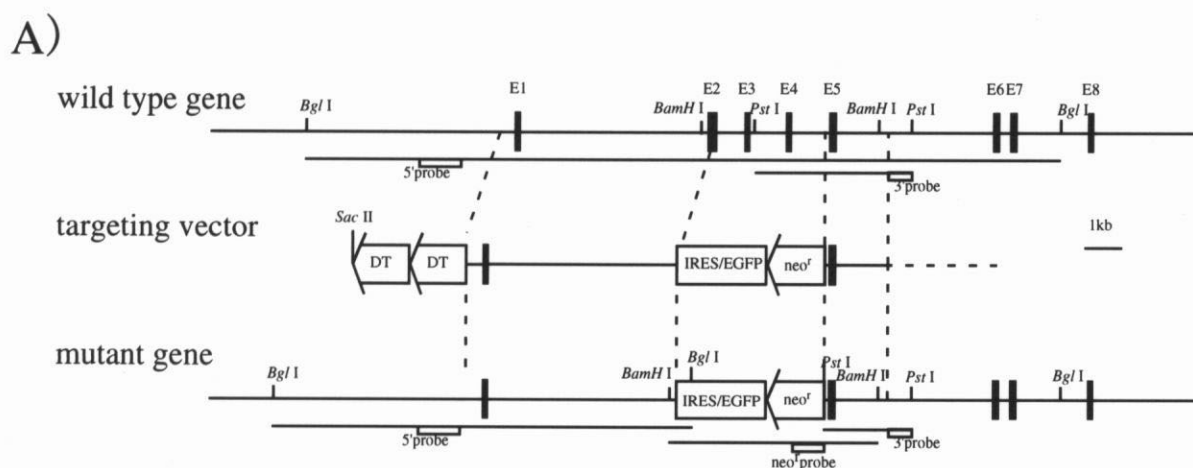


図2-5. ターゲティングストラテジーと，Southern blottingによるES細胞のscreening.

A) ターゲティングベクターpTV-DT2と，予想される相同組み換え後の20α-HSDゲノム.

B) ESゲノムを用いたSouthern blotting.

4つのESクローンで，3' probeと5' probeによりヘテロなバンドが検出されたことから，相同組み換えが起こったことがわかる.

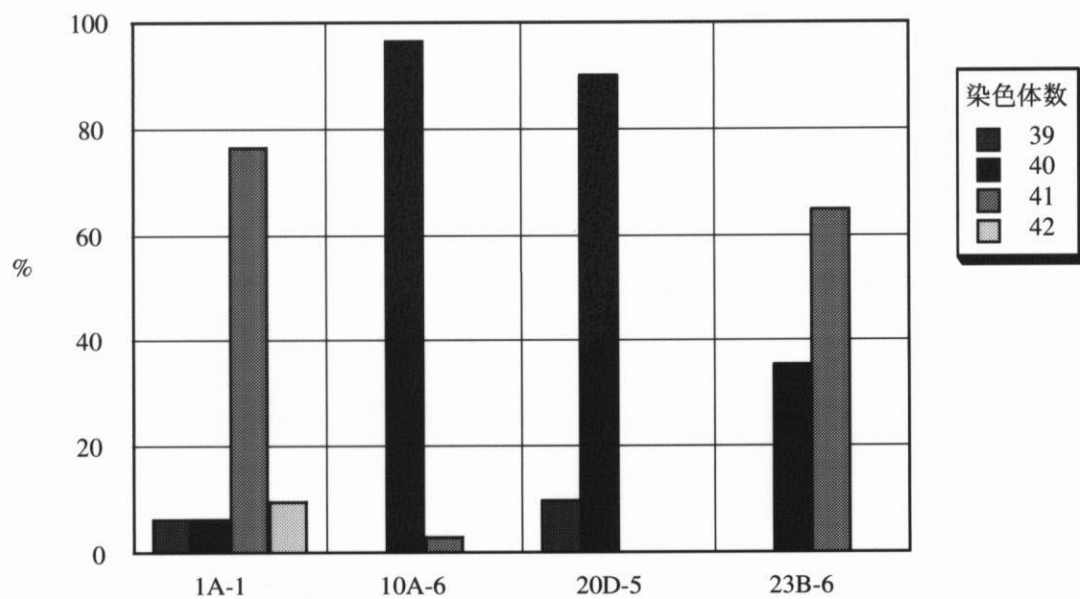


図2-6. 相同組み換え体の染色体分析結果.

Southern blottingで相同組み換えを確認したESクローン1A-1, 10A-6, 20D-5, 23B-6の各々について, 30細胞が示した染色体数各々の割合を示した. 正常な染色体数 (40本) が90 %以上を占めるクローン10A-6と20D-5ををキメラマウス作製に用いた.

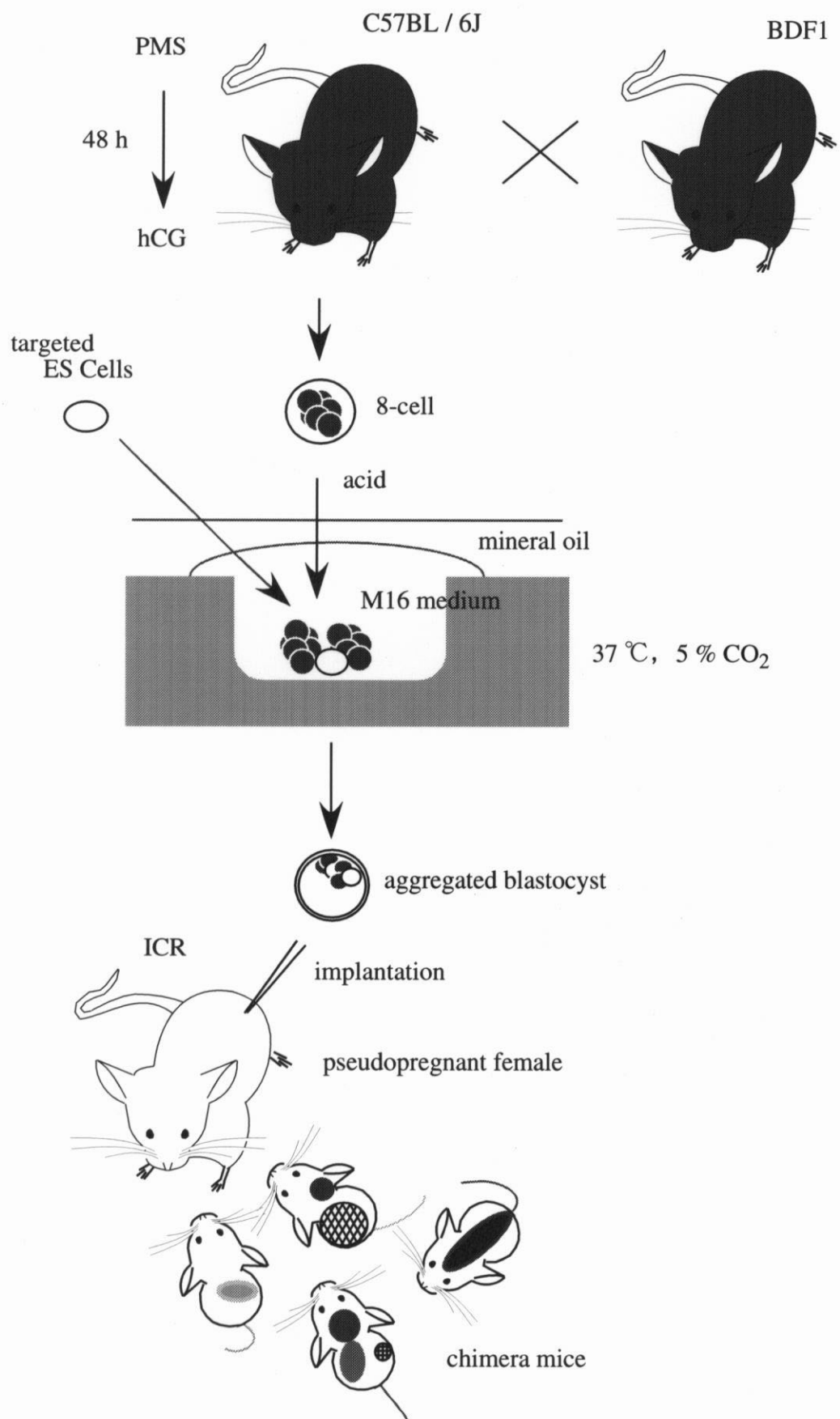
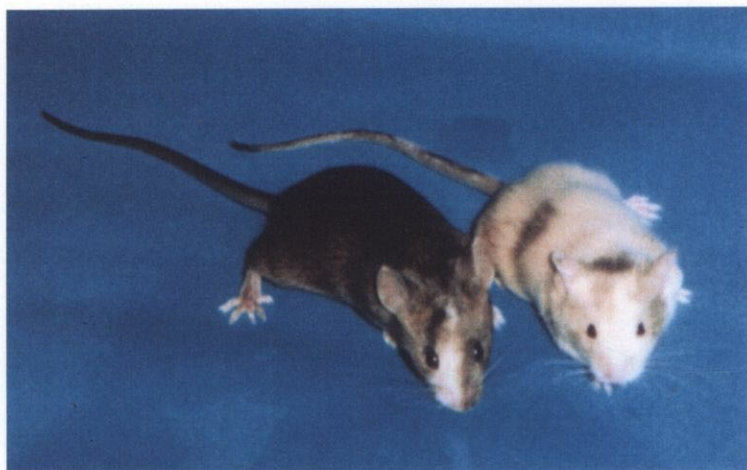


図2-7. 集合キメラ法によるキメラマウス作製の流れ.

PMS ; pregnant mare serum

hCG ; human chorionic gonadotropin

A)



B)



図2-8. キメラマウスとF1 agouti マウスの写真.

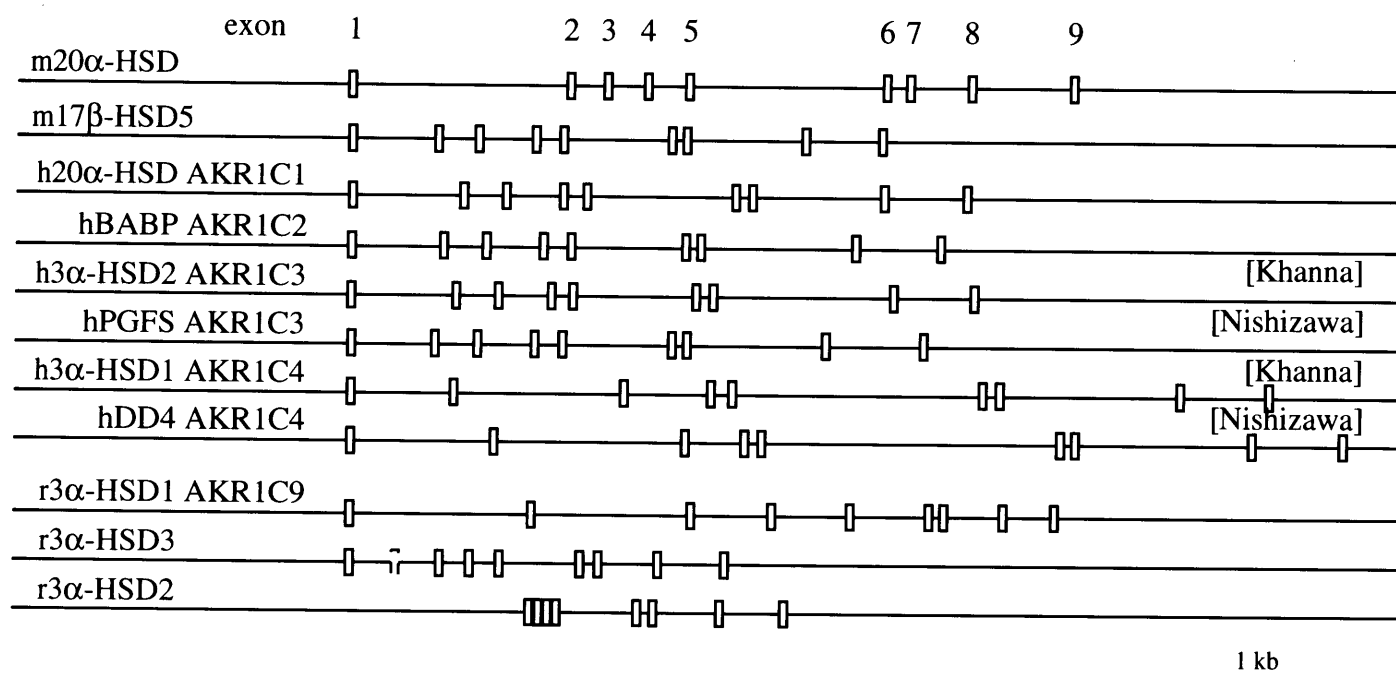
A) ESクローン10A-6由来のNo. 11 (左) とNo. 3 (右) キメラマウス.

No. 11のマウスは背部が黒く, No. 3のマウスの方がキメラ率が高い.

B) E 14.1 ES細胞が生殖系列に分化して誕生したキメラマウス (No. 10)

では, C57BL/6Jとの掛け合わせにより生まれる子マウス (F1)

は野生色 (agouti) となる.



AKR1C1 ; h20α-HSD / hDD1 [Nishizawa et al. 2000]

AKR1C2 ; hBABP / hDD2 / 3α-HSD3 [Nishizawa et al. 2000]

AKR1C3 ; hPGFS / h3α-HSD2 [Nishizawa et al. 2000, Khanna et al. 1995]

AKR1C4 ; hDD4 / h3α-HSD1 [Nishizawa et al. 2000, Khanna et al. 1995]

m ; mouse, h ; human, r ; rat

図2-9. AKR1Cのゲノム構造比較.

ラット3α-HSD1はE 5とE 6の長さが他と異なり、コードするアミノ酸も322と停止コドン
 が他より1アミノ酸早く現れる. AKR1C3とAKR1C4のゲノム構造は報告により若干異なるが、
 Nishizawaら [2000] はKhannaら [1995] のゲノム構造とほぼ同じであると報告している.
 ラット3α-HSD3のE 2の位置は不明であり、点線で示した.
 ラット3α-HSD2はE 1が不明であり、E 2から示してある.