

1. 始めに

1980年代に入って、発生工学及び分子生物学の進歩に伴い遺伝子を人為的に操作し動物個体へ導入することが可能となってから、トランスジェニック動物を利用した研究は急激に進展した。特に、遺伝子の生体レベルでの生理的機能を直接解析する方法として、このトランスジェニック動物は発生学や生理学のみならず医学的分野で広範囲に利用されている。また、最近ではアメリカにおいて癌遺伝子を導入した癌に成り易いオンコマウス、病態モデルとして高脂血症マウス、また毒性試験用として変異原に対して敏感に反応する変異原物質スクリーニング用マウスが市販化されるまでに至っている。

当社では、実験動物の改良を目的にトランスジェニック動物の作製を中心に一連の研究を行なっているが、今回は、内在性遺伝子の発現を抑制する方法の一つであるアンチセンスDNAの導入によって、成長ホルモン遺伝子の発現を人為的に抑制して小型化させたトランスジェニック動物の生産に関する研究について紹介する。

2. 生体内での特定遺伝子の機能の抑制

トランスジェニック動物を利用した研究では、主に特定の遺伝子を動物個体で過剰に発現させることで従来その個体に備わっていない外来性の遺伝形質を人為的に付加する方法が取られているが、一方で外来から遺伝子を導入する方法を使いながらその生物が従来持っている内在性の遺伝形質の発現を抑制する方法論も幾つか報告されている。つまり、ES細胞を利用し相同組み換えによって標的遺伝子に変異を導入しその機能を不活化する方法（ジーンターゲットティング；gene targeting）、特定遺伝子の点突然変異体遺伝子を過剰発現させることで、内在性遺伝子の産物と競合させてその機能を抑制させる方法、及びアンチセンスDNAを用いる方法である。

最後に示したアンチセンスDNAを使った生体内の特定遺伝子発現の抑制方法は、標的とする内在性遺伝子のmRNAに対して相補的な配列をもつアンチセンスRNAの転写が可能なアンチセンスDNAを動物個体に導入して標的遺伝子の発現を選択的に抑制する方法である。これは、アンチセンスRNAが標的遺伝子の発現する過程、つまり転写、RNAのプロセッシング、核から細胞質への移行、そして翻訳のいずれかの段階を阻害することを基本原理としている。このアンチセンスDNAあるいはRNAを利用し、内在性遺伝子の発現抑制を行った研究は、培養細胞のみならず昆虫の胚盤葉でも行なわれているが、個体レベルでは植物や動物においても成功例が数例報告されているにすぎない。そのため、動物個体内における遺伝子発現の抑制機構は十分に解明されておらず、さらに遺伝子発現を完

全に抑制できないことから、その標的となりうる内在性遺伝子など未だ明かでない点が多い。

そこで、我々はフィードバック機構によってその発現及び分泌が支配されているペプチドホルモンの一つである成長ホルモン（GH）遺伝子を標的にして、アンチセンスDNAを導入したトランスジェニックマウス及びトランスジェニックラットを作製し、GH遺伝子に対するアンチセンスRNAの発現抑制効果に関して検討し、さらに作製した小型化トランスジェニックラットの特徴についても検討を加えた（図1）。

3. GH遺伝子を標的としたアンチセンス遺伝子の構築とトランスジェニック動物の作製

アンチセンスDNA導入による内在性遺伝子発現抑制を行なうためには、導入用アンチセンス遺伝子の構造が重要になってくる。そのため、遺伝子の構築するうえで通常以下の点について注意する必要がある。つまり、アンチセンスRNAの時期特異的及び組織特異的発現を司るプロモーター転写調節領域の選択とアンチセンスとして用いる内在性遺伝子の領域及び長さに関する検討である。前述のようにアンチセンスRNAによる遺伝子発現抑制の原理から、標的遺伝子のmRNAが発現している細胞中でアンチセンスRNAが共存する必要があるため、アンチセンス遺伝子の時期特異的及び組織特異的発現を司るプロモーター転写調節領域には、標的遺伝子と同じ転写調節領域あるいは標的遺伝子と同じ組織特異的発現をする遺伝子の転写調節領域が通常選択されている。また、一般にアンチセンスRNAとして用いる遺伝子は、標的の遺伝子の5'側の非翻訳領域と開始コドンを含む遺伝子断片であり、さらにそのアンチセンス部分を含め全長で1kbp程度のRNAであることが重要であると言われている。そこで、我々は内在性のGH遺伝子と同様に下垂体前葉細胞で特異的に発現するように企図して導入遺伝子の転写調節領域にはラットGHのプロモーター調節領域（約310bp）を利用し、ラットGHの5'側非翻訳領域から5つのエクソンを含み3'側非翻訳領域のpolyA付加シグナルをカバーするほぼ全領域（795bp）をアンチセンスとしてヒトB-グロブリンのゲノミック遺伝子の第2エクソンに組み込みんだアンチセンス遺伝子を構築した。

ラットGHのcDNAとマウスGHのそれとは約94%と高い相同性を持っていることやラットGHプロモーター転写調節領域はマウス下垂体前葉で機能することが明らかになっていることから、まずこのGH遺伝子を標的とするアンチセンス遺伝子をマウス前核期卵に顕微注入してトランスジェニックマウスの作製を試み、構築したアンチセンス遺伝子の発現とその標的となるGH遺伝子に対する発現抑制効果を調べた。その結果、計4回の実験で212個の前核期受精卵に顕微注入操作を行ない、最終的にサザンプロテイング解析により5匹のトランスジェニックマウスが得られた。さらに、子孫への導入遺伝子の伝達が認められる2匹のファウンダーを使って順次子孫を獲得し、解析を進めたところ、RT-PCR法によってアンチセンス遺伝子はトランスジェニックマウスの脳下垂体前葉で発現している

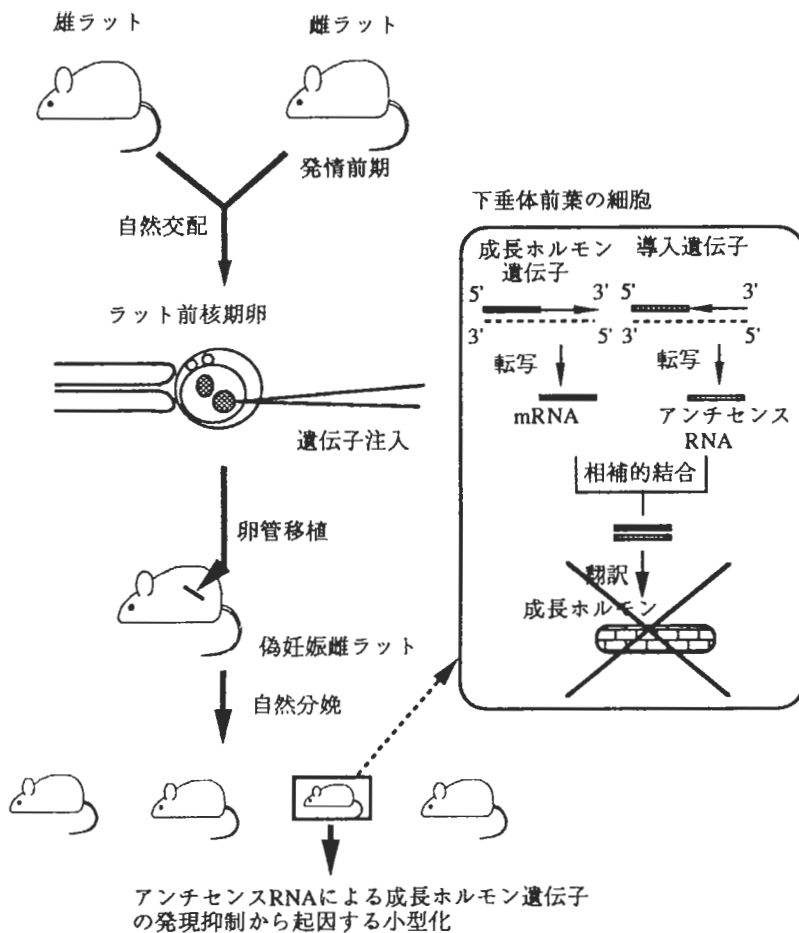


図1. アンチセンスDNA導入による小型動物の生産

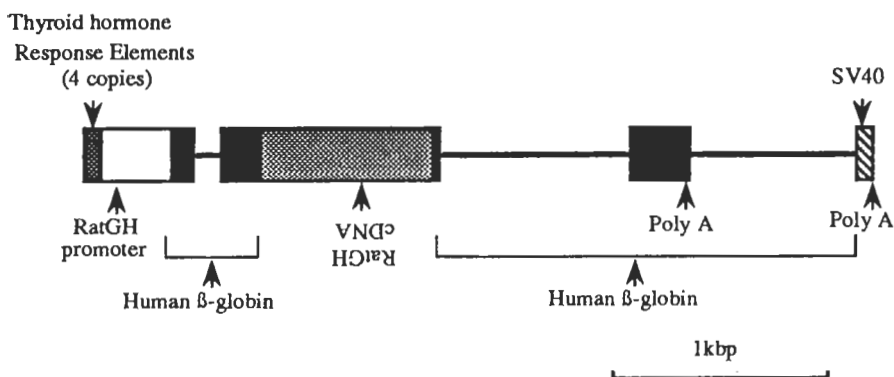


図2. トランスジェニックラット作製のための導入遺伝子の構造

ことは確認されたものの、その表現型つまり観察される成長の抑制は個体によってばらついていることが認められた。この原因として、アンチセンスとして用いたGH遺伝子がラットGHcDNA由来でありマウスGHcDNAと完全に一致していないことがまず考えられるが、アンチセンスRNAの量と表現型との間に相関関係が認められるとの報告もあることから、マウス個体が小型化を呈するほどにマウスGH遺伝子の発現を抑制させる充分量のアンチセンスRNAが発現されなかった可能性も考えられた。これまでの研究で、ラットGHのプロモーター転写制御領域には、甲状腺ホルモン感受性領域 (TRE) の存在が知られており、このモチーフは甲状腺ホルモン (T3) の存在下で高いエンハンサー活性を有していることが認められている。実際に、我々も下垂体前葉腫瘍細胞でのCATアッセイにより転写活性を比較検討して、アンチセンスRNAの発現量を高めさせるため導入遺伝子を図2に示すごとく改変し、ラットへの遺伝子導入を試みた。

既に我々はラット初期胚は物理的傷害や操作に弱いとの知見を得ているため、ラット前核期卵への遺伝子の顕微注入操作を行なうに当り過排卵卵ではなく自然排卵卵を選択した (図1)。214個の前核期卵に遺伝子注入操作後移植した結果、51匹の産児が得られ、ササンプロット解析から最終的に4匹のラットに導入遺伝子の染色体への組み込みが認められた。

4. アンチセンス遺伝子によるラットGH遺伝子発現の抑制

4匹トランスジェニックラットのうち2匹のファウンダーラット由来 (TRE4 910320-14, TRE4 910329-32) の子孫において、ヘテロ接合のトランスジェニックラットは生後3~4週目から同腹の正常個体より統計的に有意に小さいことが認められた。この体重差は成熟 (10週令) 以降週令を重ね2年を経過しても変わらなかった。次に、RT-PCR法を使い各組織での導入遺伝子の発現を解析したところ、いずれのトランスジェニックラットの系でも脳下垂体でアンチセンスRNAの発現が確認された。また、RIAにより血漿中のGH量を測定したところ、正常個体と比較して低い値が検出された。さらに、トランスジェニックラットの生体内でT3が導入遺伝子の転写活性に及ぼす影響を調べることでアンチセンスRNA量とGH遺伝子の発現抑制の関係について検討したところ、甲状腺を摘出したトランスジェニック雄ラットでは投与したT3濃度に依存しての血漿中のGH量が減少する傾向が認められた。以上の結果より、独立した2系統のトランスジェニックラットにおいて、アンチセンスRNAの脳下垂体で発現が認められ、GH量も低下し個体の小型化を呈する表現型が示され、さらにT3の投与実験で、アンチセンスRNAの転写量の増加とGH遺伝子の発現抑制に正の相関があることが示唆されたことから、これらのトランスジェニックラットでは、導入遺伝子由来のアンチセンスRNAにより内在性のラットGH遺伝子の特異的制御がなされていると結論された。つまり、アンチセンスDNAを動物個体に導入し特定の組織でアンチセンスRNAを発現させることによって、種々のカスケードを介したフィードバック機構によってその発現や分泌が制御されているペプチドホルモンの遺伝子発現を抑制可能であることが初めて示された。そして、アンチセンスDNA導入

によって標的とする内在性遺伝子の発現を抑制する方法が、マウス以外の動物種でも応用可能であることが明かになった。

5. ホモ接合化した小型化トランスジェニックラットの特徴

以上の実験から作製された2系統のトランスジェニックラットは、ヘテロ接合体同志の交配によりホモ接合体を得ることが可能であった。さらに、このホモ接合体の雌雄双方の個体においても生殖能力を有していることが認められ、ホモ接合体の繁殖維持にも成功している。これらについて解析を進めたところ、正常個体と比較してヘテロ接合体で観察された体重の違いや血漿中GH濃度の低下がさらに顕著に認められ、遺伝的に安定化された表現型としてホモ接合のトランスジェニックラットに固定化していることが明かになった。

したがって、これらのトランスジェニックラットは、まずヒトのGH単独欠損症を対象とした好適なモデル動物となりうるであろうし、あるいは身体的発育障害や脳発育に対する成長因子の影響の研究モデルになる可能性が考えられる。次に、安全性試験等に広く現在使われているラットが大型化に進んでいる中で、小型化したトランスジェニックラットの体重は、通常ウイスター系ラットの1/2から2/3程度であり、さらに体重の軽さから注目されているF344(フィッシャー)系統より雄で小さく雌で同等の大きさである特徴を有している。これは、毒性試験・一般薬理試験、生理実験及び行動実験などの場合、安全性試験が長期に渡っても既存のケージで充分使用可能であり、飼料の消費量の削減また糞尿や床敷等の処分に使われる浄化槽や焼却炉の負担の軽減が期待できる特徴であろう。あるいは、体重測定、注射や経口投与の薬物投与の際や解剖、採血等の検査材料の採取時に、小型化のため動物の取り扱いが容易になることも考えられる。また、より期待できることは、使用する貴重な試験サンプルを節減することによって生れる利益が大きいことであろう。つまり、小型化したラットを使うことにより期待されるこれらの点に加えて、バックグランドデータが豊富にあるウイスター系ラットと遺伝子背景が同じである点を考慮すると、この小型化したトランスジェニックラットは将来的に新しい実験動物となりうるのではないかと考えている。現在のところ、我々は毒性試験など安全性試験一般への応用も踏まえトランスジェニックラットの一般生理学ならびに生化学的な性状の検索を行なっている。

6. おわりに

アンチセンスDNAによる生体内の特定遺伝子の発現抑制の方法は、完全な発現抑制は期待できないものの、適切なプロモーター転写調節領域を選択し、組織特異的及び時期特異的にアンチセンスRNAを生体の各組織で転写させることによって、内在する標的遺伝子の発現を多様なレベルに制御できる方法の一つとなっている。そして、結果として生理生化学的に幅の広い状態の突然変異を有する実験動物個体を作り出す手段となろう。最近では、アンチセンス分子を利用した遺伝子治療やアンチセンス分子そのものを薬剤として使用する開発研究が、盛んに行なわれている。これから、アンチセンス遺伝子を導入して特定遺伝子の発現

を抑制させたトランスジェニック動物は、アンチセンス分子による遺伝子発現の抑制機構の解明やそれらを利用した基礎研究に貢献していくものと期待される。

7. 参考文献

- 1) Simons, R.W. et. al. *Gene*, 72: 35-44, 1988.
- 2) Eguchi, Y. *Annu. Rev. Biochem.*, 60: 631-652, 1991.
- 3) Katsuki, M. et. al. *Science*, 241: 593-595, 1988.
- 4) Pepin, M-C. et. al. *Nature*, 355: 725-728, 1992.
- 5) 松本 他. *日本畜産学会報*, 63: 1168-1174, 1992.
- 6) Matsumoto, K. et al. *Mol. Biol. Develop.* 36: 53-58, 1993.
- 7) 松本. *BIOMedica* (北隆館)、8 (14): 55-59, 1993.