

平成21年5月31日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19591489  
 研究課題名（和文） ミニブタモデル動物作出用の遺伝子改変核ドナー細胞作製に関する基礎的研究  
 研究課題名（英文） Basic studies to produce genetically modified swine cells as the donor for nuclear-transfer  
 研究代表者  
 松原 修一郎（MATSUBARA SHYUICHIRO）  
 鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推進センター・准教授  
 研究者番号：60199841

研究成果の概要：鹿児島大学で開発されたクラウン系ミニブタ（近交系）の遺伝子改変（ジーン・ターゲティング）を行うために、ゲノム DNA より候補遺伝子を単離し、ターゲティング・コンストラクトを作製、ミニブタ胎児細胞に導入して検討した。遺伝子導入後、PCR 産物のサザンブロットでは候補細胞が存在したが、ジェノミックサザンでさらに確認したところ目的とする細胞はないと判断された。この結果に基づいて、コンストラクトおよびターゲティングアリアル検出方法の再検討をおこなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度			
2005年度			
2006年度			
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：医用ミニブタ 大型実験動物 移植外科学

## 1. 研究開始当初の背景

移植を含めた外科領域や医療器具の開発においては、げっ歯類とヒトを結ぶ中大型実験動物の必要性が強調されている。鹿児島大学で開発されたクラウン系ミニブタは、近交系であり、新たな実験動物として高い可能性を秘めているが、遺伝子改変などによってより付加価値の高いものとする必要性が高まっている。

## 2. 研究の目的

本研究課題ではミニブタモデル動物作出のため、新しいタイプの遺伝子改変核ドナー細胞作製をめざして研究を開始し、そのために必要な基礎的研究を、主に細胞レベルでおこなう。

## 3. 研究の方法

## 1) targeting コンストラクトの作製

糖転移酵素 $\alpha$ GalT ノックアウト細胞作出のために targeting コンストラクトを作製した。作製に必要なミニブタの遺伝子領域（ホモロジーアーム）はクラウン系ミニブタゲノムより PCR によって単離し、塩基配列を確認した。

表 1. クラウン系ミニブタと産業用ブタ遺伝子の一次構造の比較

遺伝子領域	エクソン（翻訳領域）	イントロン
相同性 塩基配列	100%	98.6%
アミノ酸配列	100%	-

今回解析した領域(エクソン8-エクソン9)において、アミノ酸をコードする部分(翻訳領域)については Koike ら(2000)によって報告された産業用ブタの配列に完全に一致したが、イントロン部分については1.5%程度の違いが認められた。

糖転移酵素の活性中心(エクソン9の5'側にコードされている)が破壊されるように基本設計をおこない、同じホモロジーアームをもつ2種類の targeting コンストラクトの作製を進めた。ひとつは薬剤耐性マーカー(neo)をもつプロモータートラップ型で、いまひとつは2種の蛍光マーカーをもつポジティブ・ネガティブ選択型のコンストラクトである(図1)。

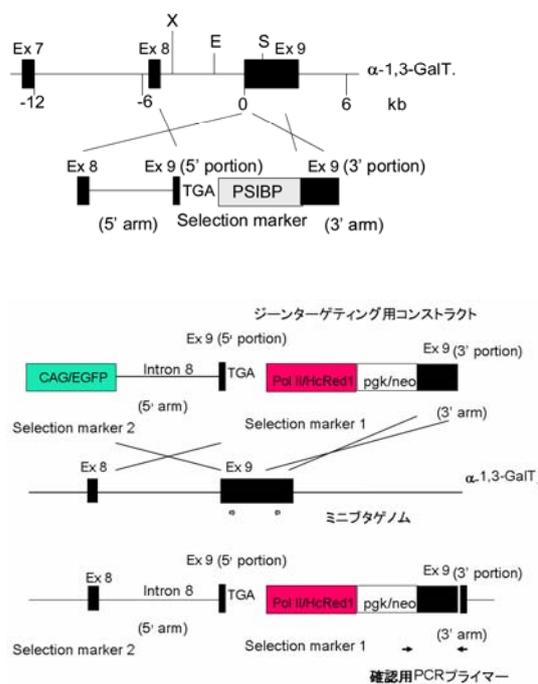


図1. 糖転移酵素( $\alpha$ GalT) ジーンターゲティング用コンストラクト (上)プロモータートラップ型 (下)2種の蛍光マーカーをもつポジティブ・ネガティブ選択型と確認用PCRプライマー(黒矢印)の位置

Hatada ら(2005)は、マウス ES 細胞の gene targeting を行う際に、蛍光マーカーを利用しセルソーターにかけることによって、効率よく candidate cells を分離する方法を考案している。彼らはポジティブ選択マーカーおよびネガティブ選択マーカーの両方に蛍光マーカーを用い、ポジティブ選択マーカー(+)かつネガティブ選択マーカー(-)の細胞を集めることによって candidate 細胞を得ている。この方法が使えれば手作業で細胞のクローニングをする手間がおおいに軽減される可能性がある。同様の方法をミニブタの細胞に利用することを考えて2種類の蛍光マ

カーをもった targeting コンストラクト(図1)を作製した。このコンストラクトはポジティブ選択マーカーとして赤色蛍光タンパク(HcRed1)発現カセットを、また、ネガティブ選択マーカーとして緑色蛍光タンパク(EGFP)発現カセットを持っており、targeted 細胞(相同組み換え細胞)では赤色蛍光のみを発現する。いっぽう、ランダムインテグレーションによって遺伝子導入された細胞では EGFP 発現カセットが残り、緑色および赤色蛍光の両方を発現する。

### (2) 新しい遺伝子導入法としての Nucleofection 法の検討

遺伝子導入に用いるミニブタ繊維芽細胞は line 化されていない細胞で、遺伝子導入の効率の低いことが予想された。このため、効率のよい新たな遺伝子導入法が必要と考えられたので、最近開発された Nucleofection 法に注目した。この方法では電気穿孔法によって細胞内に遺伝子が導入された後、各細胞に適した導入試薬によって DNA は核内に運び込まれる。初代培養繊維芽細胞用の試薬(Basic kit for primary fibroblast)を用いたところ、生存細胞の75%がマーカー遺伝子(GFP)を発現しており、electroporation 法(40-50%)や lipofection 法(3-5%)と比べて高い効率で遺伝子導入が可能であることがわかった。

### (3) コンストラクトの導入と candidate 細胞の選択

コンストラクトを作製後、先に完成した2種の蛍光マーカーをもつポジティブ・ネガティブ選択型のコンストラクトを中心に、実際にミニブタ繊維芽細胞に導入してマーカー遺伝子の発現などを確認した。Nucleofection による遺伝子導入後、まず蛍光マーカーの発現(transient expression)をみたところ、緑色蛍光(EGFP)については相当数の細胞で発現が確認された。これに対して赤色蛍光(HcRed1)はごく少数の細胞でのみ確認された。2つの蛍光タンパクは同一プラスミド上の遺伝子として導入されており、両者の発現の差は細胞への導入効率の違いによるものではない。



図2. ミニブタ細胞での蛍光マーカーの発現. (左) EGFP (中) HcRed1 (右) 位相差. 赤色蛍光の確認された細胞はごく少数であった。

今回用いた赤色蛍光タンパク発現カセット(Pol II/HcRed1)がミニブタ細胞での赤色

蛍光発現には不適であった可能性が考えられる。同じ研究室の他の実験でも、赤色蛍光タンパク (HcRed1 および DsRed) のミニブタ細胞への導入では発現の効率が低く、また、安定導入 (stable transfection) 後も蛍光の発現が不安定であることが認められている。赤色蛍光検出に必要な量の蛍光タンパクはミニブタ細胞に毒性をもつかもしれない。

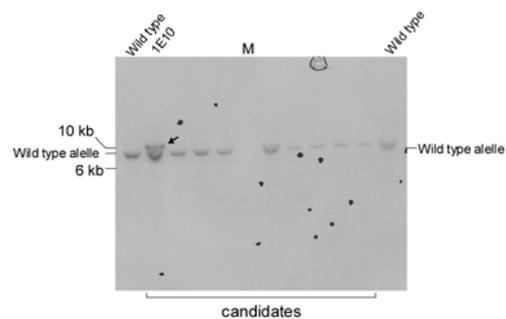
targeted allele の脱落を防ぐために用いた薬剤耐性マーカー (pgk/neo) については、導入細胞を G418 選択にかけた結果十分な数の耐性コロニーが得られたのでミニブタ細胞でも機能していることが確認された。

上記のように赤色蛍光タンパクの発現が悪く、このコンストラクトを蛍光マーカーによるポジティブ・ネガティブ選択に用いることは困難であると判断された。しかしながら、薬剤耐性マーカー (pgk/neo) をポジティブ選択に、また、緑色蛍光タンパク (EGFP) をネガティブ選択マーカーとして利用することにより gene targeting が可能であると考えられたのでこれについて検討した。

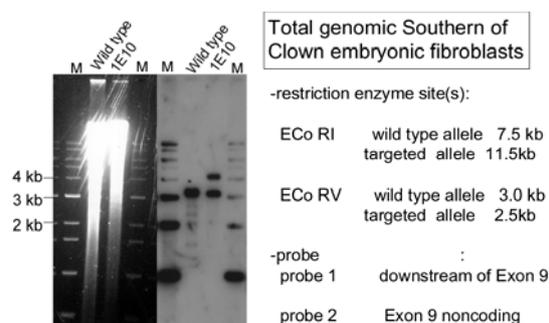
2 x 10<sup>6</sup> 個のミニブタ胎児繊維芽細胞に Nucleofection によって遺伝子導入を行い 96 well dish に播種した。2 日後より G418 選択にかけ、耐性細胞の出現した well のうち緑色蛍光細胞をもたないものを選択細胞とした。これらを 24 well dish に植え継ぎ、増殖した細胞を凍結保存するとともにゲノム DNA を調整して PCR による解析を行った。解析用のプライマーは targeting コンストラクトの薬剤耐性マーカー (neo 遺伝子) と 3' アームの下流 (targeting コンストラクトの含まれていないゲノム配列) に設定されており、(理論上) targeting された細胞でのみ働くようになっている。58 個の candidate 細胞クローンを調べたが、エチジウムブロマイド染色で増幅 DNA のバンドが検出されるクローンはなかった。この段階では、コントロールプライマーによる PCR で増幅バンドの検出されない DNA サンプルがあり、すなわち DNA の濃度や純度に問題がある可能性が残されていた。そこで、検出感度をあげるために PCR 産物の Southern blot をおこなったところ、想定されるサイズ (2.5 kb) のシグナルが検出されるクローンが存在した。

陽性シグナルの検出されたクローンの中に targeted 細胞が存在することが考えられたので、これを確認するために genomic Southern blot をおこなった。これらの細胞を 60 mm dish 1-2 枚まで増殖させ、ゲノム DNA を抽出した。

Eco RI 分解産物の blot では 1 クローンで targeted 細胞である可能性を示す、高分子側にシフトしたバンドが認められた (図 3 (I))。しかし、この細胞について Eco RV 分解産物の blot を行ってさらに詳細に検討した結果、



(i) Eco RI 分解産物 (probe 1)



(ii) Eco RV 分解産物 (probe 2)

図 3. Candidate 細胞の genomic Southern blot

想定される targeted 細胞の遺伝子構造とは一致しないことが明らかになった (図 3 (ii))。

表 2. ミニブタ胎児繊維芽細胞への targeting コンストラクト導入実験のまとめ

96 well dish での増殖およびマーカー遺伝子の発現	
	(wells)
G418 耐性細胞	197
EGFP 発現細胞	88
EGFP 陰性細胞	80 (選択細胞)
EGFP 発現細胞陰性細胞混在	29
24 well dish 以降の増殖と遺伝子解析	
24 well dish での増殖とゲノム DNA 調整	58
PCR (エチジウムブロマイド染色) 陽性	0
PCR/Southern blot 陽性	8
60 mm dish への増殖とゲノム DNA 調製	7
Genomic Southern (Eco RI)	1
Genomic Southern (Eco RV)	0

2 x 10<sup>6</sup> 個のミニブタ胎児繊維芽細胞に遺伝子導入を行った。

2種の蛍光マーカーおよび薬剤耐性遺伝子をもった targeting コンストラクトを作製し、ミニブタ細胞に導入して検討した。当初考えていた蛍光マーカーのみによるポジティブ・ネガティブ選択を行うにはミニブタの細胞で十分な発現をする新たな蛍光マーカー(緑色蛍光以外)の検索開発が必要であると判断された。

また、ポジティブ・ネガティブ選択後のPCRによる解析については今回 PCR/Southern blot で陽性と判断されたクローンの中から最終的に targeted 細胞クローンを得ることができなかった。産業用ブタで同様の選択法をおこなった Dai ら(2002)の論文では、最初PCRで陽性とされたコロニー90個のうち最終的に genomic Southern blot で相同組み換えが確認されたものは17コロニーであったとされている(ただし、Southern blot 解析に必要な細胞数まで増えないコロニーがあり、これを除くと約30%の比率となる)。マウス ES細胞では24 well 培養1 well 分の細胞から Southern blot 解析が可能であるが、ミニブタ繊維芽細胞では60 mm dish のレベルまで増やさないと必要な量のゲノムDNAが得られない。したがって、すべてのスクリーニングを Southern blot でおこなうことは実際上不可能であり、PCRによる選別の精度が重要である。

この点、今回用いた方法にはさらに検討の余地があり、ゲノムDNAの抽出法、PCRの条件、プライマーの配列および位置など再検討が必要であると判断された。

文献的には、(上記の3'アームを挟む形のPCRではなく)5'および3'両アームに用いた遺伝子領域のさらに外側にプライマーを設定し、遺伝子改変領域全体を含んだPCRによって選別する方法が報告されている。これらの報告ではこの方法を用いると genomic Southern blot に近い確率で選別ができることが示されている。したがって、この方法を用いることを想定して、targeted allele 検出法の再検討をおこない、実験をすすめている。

#### 4. 研究成果

ブタのジーン・ターゲティングについては、国内では産業用ブタ(日本動物王学研究所)の1例があるのみで、実験用モデル動物に適すると考えられるミニブタについては試みられていない。また、海外でもMGHミニブタの1例のみである。

鹿児島大学で開発されたクラウン系ミニブタは、近交系であり、また、すでに生産体制が整っていることもあって、新たな実験動物として期待されている。しかし、これまでこのブタの遺伝子改変について実際に検討されたことはなかった。本研究課題ではクラウン系ミニブタの核移植クローン個体を

作ることによって遺伝子改変モデル動物を作出することをめざし、遺伝子改変核ドナー細胞作製のために必要な一連の操作を実際におこなった。

これらの実験をとおして、効率の高い遺伝子導入法をはじめ、胎児繊維芽細胞の培養法、必要な遺伝子のクローニング法、ゲノムDNAの調整から genomic Southern blot 解析などクラウン系ミニブタ胎児繊維芽細胞の遺伝子改変に必要な操作の多くについて、標準的な方法を確立することができた。これらの中には、マウスなど他の実験動物や産業用ブタとは異なるものがあるので、今回実際にクラウン系ミニブタについて明らかにできたことは本研究の成果である。

一方で targeted allele の検出法など、まだ残され問題もあり、これらについては現在再検討中である。

新たな方法として検討した2種類の蛍光マーカーをポジティブ選択マーカーおよびネガティブ選択マーカーに用いる方法については赤色蛍光マーカーがこの細胞では発現せず、新たな蛍光マーカー(緑色蛍光以外)が必要であると判断された。使用した赤色蛍光マーカーはマウスやヒトの細胞では発現するとされており、これもミニブタにおいてとくに問題になることなのかもしれない。ミニブタで有効な蛍光マーカーを検索するとともに、融合タンパクを用いるなどの方法で解決できないか検討している。

今回の研究で作製した遺伝子操作細胞(ジーン・ターゲティングではない)の一部はすでに核移植による発生の検討をはじめしており、上記の問題点が解決すれば、クラウン系ミニブタの遺伝子改変について技術的な目処がたつと判断される。

最近ヒトiPS細胞を用いてブタなどの動物体内で臓器をつくるのが構想されている。この場合にも遺伝子改変(ジーン・ターゲティング)は必須である。クラウン系ミニブタは国内で唯一遺伝的背景の明確なミニブタであることを考えると、このミニブタの遺伝子操作はさら重要性を増すであろう。今回の研究結果はその基礎をなすものである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計1件)

Nakayama A, Sato M, Shinohara M, Matsubara S, Yokomine T, Akasaka E, Yoshida M, Takao S. (2007) Efficient transfection of primarily cultured porcine embryonic fibroblast using the Amaxa Nucleofection System™. Cloning and stem cells 9; 523-534. (査読有り)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 藤吉 利信、松原 修一郎、丁 強、小原 徹、  
鳥取 潤一、高尾 尊身 クラウン系ミニブタの  
PERV のヒト細胞への感染性の検討、第 12 回日本  
異種移植研究会 (平成 21 年 3 月 7 日、鹿児島大学)

2. 藤吉 利信、松原 修一郎、高尾 尊身他  
クラウン系ミニブタの PERV の感染性の評価、  
第 11 回日本異種移植研究会 (平成 20 年 2 月 23  
日、国立循環器病センター)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松原 修一郎 (MATSUBARA SHYUICHIRO)  
鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推  
進センター・准教授  
研究者番号：60199841

### (2) 研究分担者

藤吉 利信 (FUJIYOSHI TOSHINOBU)  
鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推  
進センター・准教授  
研究者番号：50173480

(平成 19 年度)

高尾 尊身 (TAKAO SONSHIN)  
鹿児島大学・フロンティアサイエンス研究推  
進センター・教授  
研究者番号：80171411

### (3) 連携研究者