

I receptor. In addition, Smad2 phosphorylation at C-terminal serine residues is required for its nuclear translocation (33). The down-regulation of Smad2 phosphorylation levels in *Fut8*^{-/-} cells was rescued by reintroducing *Fut8* (Fig. 3G). Consistently, immunohistochemical analysis of the phosphorylation levels of Smad2 in lung tissues revealed that P-Smad2 levels were greatly suppressed in *Fut8*^{-/-} mice, compared with that in *Fut8*^{+/+} mice (Fig. 3H). Taken together, these results demonstrate that core fucosylation plays an important role in the regulation of TGF- β 1 receptor function. Therefore, we assume that *Fut8*^{-/-} lungs are committed to over-expressing MMPs, probably because they escape from the TGF- β 1 suppressor mechanism, which operates in wild-type lungs, although other functions of core fucosylation of *N*-glycan-bearing glycoproteins might also be involved in the development of emphysema.

Exogenous TGF- β 1 Treatment Rescued Emphysema-Like Changes in *Fut8*^{-/-} Mice. We have performed rescue experiment with i.p. injection of exogenous TGF- β 1 to postnatal-day-18 *Fut8* knockout mice. Importantly, exogenous TGF- β 1 resulted in a significant rescue of the emphysema-like phenotype (Fig. 3I and J), stimulated the formation of elastin fiber (data not shown), and concomitantly reduced MMP-12 expression (Fig. 6H) in *Fut8*^{-/-} lung. These data strongly support our hypothesis that the TGF- β 1-mediated signaling pathway is down-regulated in *Fut8*^{-/-} lungs. We do not exclude the possibility that aberrant regulation of other receptors may contribute partly to the emphysema-like changes.

In contrast to the mild and gradual formation of emphysema in integrin β 6 knockout mice, which causes a local deficiency in active TGF- β 1, the *Fut8* deficiency as well as the induction of cytokines such as IL-13, TNF- α , and IFN- γ (25, 34, 35) results in the severe and rapidly progressive development of emphysema. Interestingly, the absence of β 6 integrin leads mainly to MMP-12 overexpression in the lungs of mutant mice, whereas in *Fut8*^{-/-} lungs, MMP-13 is also induced at even larger amounts than MMP12, as assessed by real-time PCR quantitative analysis (Fig. 6A). This fact, together with the wide substrate specificity of MMP-13, could contribute to the explanation of the differences in the severity of emphysema phenotypes between integrin β 6- and *Fut8*-deficient mice. It has been reported that disruption of the latent TGF- β -binding protein 4 (LTBP-4), which regulates TGF- β targeting to ECM and TGF- β -mediated signaling, causes abnormal lung development (36).

Using antibodies specific for surfactant protein C (SP-C), a marker of differentiated type-II alveolar epithelial cells, we found that expression levels of SP-C protein at each stage were slightly weaker in *Fut8*^{-/-} lungs than in *Fut8*^{+/+} lungs (see Fig. 7, which is published as supporting information on the PNAS web site), suggesting that lung development was also disturbed by the loss of core fucosylation. The retarded alveolar epithelial cell differentiation may also contribute partly to emphysema-like changes of *Fut8*^{-/-} lung from postnatal day 7 (Fig. 2B). Indeed, given the fact that alveolarization continues past day 7, at least part of the phenotype is related to abnormal lung development. Nevertheless, because it continues to increase after lung development, we conclude that both alveolar development and progressive (destructive) emphysema occur in the absence of *Fut8*.

TGF- β activation also leads to emphysema formation. Marfan syndrome is a human autosomal dominant disorder of connective tissue caused by mutations in fibrillin-1. Fibrillin-1 usually functions to limit the activation of TGF- β , although the precise mechanism by which fibrillin-1 controls TGF- β activation is still unknown. Studies with mutant mice have revealed that fibrillin deficiency causes a pronounced TGF- β activation that triggers the developmental inhibition of alveolarization, induces apoptosis in the developing lung, and finally results in destructive emphysema (37). Nevertheless, very recent results have demonstrated that Marfan syndrome can also be caused by loss of TGF- β signaling function due to TGF- β receptor type II mutations in a group of patients lacking mutations in fibrillin (38). These findings emphasize the idea that the TGF- β signaling pathway plays an important role in lung integrity, and consequently, there is an absolute need to maintain the precise levels of all components of this complex pathway. Our finding that defects in core fucosylation profoundly dysregulate TGF- β activation and signaling in *Fut8*^{-/-} mice adds a level of control to this pathway and opens the possibility that similar defects could be found in some cases of human emphysema.

We thank Dr. S. Koyota for excellent technical assistance on oligosaccharide structural analyses and Dr. J. Miyazaki for invaluable advice on this initial project. This work was partly supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research, the Special Coordination Funds for Promoting Science and Technology, and the 21st Century COE Program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan.

- Lubke, T., Marquardt, T., Etzioni, A., Hartmann, E., von Figura, K. & Korner, C. (2001) *Nat. Genet.* 28, 73–76.
- Luhn, K., Wild, M. K., Eckhardt, M., Gerardy-Schahn, R. & Vestweber, D. (2001) *Nat. Genet.* 28, 69–72.
- Moloney, D. J., Panin, V. M., Johnston, S. H., Chen, J., Shao, L., Wilson, R., Wang, Y., Stanley, P., Irvine, K. D., Haltiwanger, R. S. & Vogt, T. F. (2000) *Nature* 406, 369–375.
- Sturla, L., Rampal, R., Haltiwanger, R. S., Fruscione, F., Etzioni, A. & Tonetti, M. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 26727–26733.
- Sturla, L., Fruscione, F., Noda, K., Miyoshi, E., Taniguchi, N., Contini, P. & Tonetti, M. (2005) *Glycobiology*, in press.
- Wilson, J. R., Williams, D. & Schachter, H. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 72, 909–916.
- Miyoshi, E., Uozumi, N., Noda, K., Hayashi, N., Hori, M. & Taniguchi, N. (1997) *Int. J. Cancer* 72, 1117–1121.
- Miyoshi, E., Noda, K., Yamaguchi, Y., Inoue, S., Ikeda, Y., Wang, W., Ko, J. H., Uozumi, N., Li, W. & Taniguchi, N. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* 6, 9–20.
- Noda, K., Miyoshi, E., Gu, J., Gao, C. X., Nakahara, S., Kitada, T., Honke, K., Suzuki, K., Yoshihara, H., Taniguchi, N., et al. (2003) *Cancer Res.* 63, 6282–6289.
- Uozumi, N., Yanagidani, S., Miyoshi, E., Ihara, Y., Sakuma, T., Gao, C. X., Teshima, T., Fujii, S., Shiba, T. & Taniguchi, N. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 27810–27817.
- Wang, W., Li, W., Ikeda, Y., Miyagawa, J. I., Taniguchi, M., Miyoshi, E., Sheng, Y., Ekuni, A., Ko, J. H., Yamamoto, Y., et al. (2001) *Glycobiology* 11, 165–174.
- Shields, R. L., Lai, J., Keck, R., O'Connell, L. Y., Hong, K., Meng, Y. G., Weikert, S. H. & Presta, L. G. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 26733–26740.
- Shinkawa, T., Nakamura, K., Yamane, N., Shoji-Hosaka, E., Kanda, Y., Sakurada, M., Uchida, K., Anazawa, H., Satoh, M., Yamasaki, M., et al. (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 3466–3473.
- Dennis, J. W., Granovsky, M. & Warren, C. E. (1999) *BioEssays* 21, 412–421.
- Mountford, P., Zevnik, B., Duwel, A., Nichols, J., Li, M., Dani, C., Robertson, M., Chambers, I. & Smith, A. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 4303–4307.
- Yanagawa, Y., Kobayashi, T., Ohnishi, M., Tamura, S., Tsuzuki, T., Sanbo, M., Yagi, T., Tashiro, F. & Miyazaki, J. (1999) *Transgenic Res.* 8, 215–221.
- Koyota, S., Ikeda, Y., Miyagawa, S., Ihara, H., Koma, M., Honke, K., Shirakura, R. & Taniguchi, N. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 32867–32874.
- Nakamura, A., Fukuda, Y. & Kuwaki, T. (2003) *J. Appl. Physiol.* 94, 525–532.
- Lee, Y. C., Lee, B. I., Tomiya, N. & Takahashi, N. (1990) *Anal. Biochem.* 188, 259–266.
- Akama, T. O., Nakagawa, H., Sugihara, K., Narisawa, S., Ohyama, C., Nishimura, S., O'Brien, D. A., Moremen, K. W., Millan, J. L. & Fukuda, M. N. (2002) *Science* 295, 124–127.
- Oriol, R., Mollicone, R., Cailleau, A., Balanzino, L. & Breton, C. (1999) *Glycobiology* 9, 323–334.
- Roos, C., Kolmer, M., Mattila, P. & Renkonen, R. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 3168–3175.
- Smith, P. L., Myers, J. T., Rogers, C. E., Zhou, L., Petryniak, B., Becker, D. J., Hoemster, J. W. & Lowe, J. B. (2002) *J. Cell Biol.* 158, 801–815.
- D'Armiento, J., Dalal, S. S., Okada, Y., Berg, R. A. & Chada, K. (1992) *Cell* 71, 955–961.
- Zheng, T., Zhu, Z., Wang, Z., Homer, R. J., Ma, B., Riese, R. J., Jr., Chapman, H. A., Jr., Shapiro, S. D. & Elias, J. A. (2000) *J. Clin. Invest.* 106, 1081–1093.
- Senior, R. M., Griffin, G. L., Fliszar, C. J., Shapiro, S. D., Goldberg, G. I. & Welgus, H. G. (1991) *J. Biol. Chem.* 266, 7870–7875.
- Balbin, M., Fueyo, A., Knauper, V., Lopez, J. M., Alvarez, J., Sanchez, L. M., Quesada, V., Bordinjo, J., Murphy, G. & Lopez-Otin, C. (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 10253–10262.
- Morris, D. G., Huang, X., Kaminski, N., Wang, Y., Shapiro, S. D., Dolganov, G., Glick, A. & Sheppard, D. (2003) *Nature* 422, 169–173.
- Massague, J., Blain, S. W. & Lo, R. S. (2000) *Cell* 103, 295–309.
- Heldin, C. H., Miyazono, K. & ten Dijke, P. (1997) *Nature* 390, 465–471.
- Wrana, J. L., Attisano, L., Carcamo, J., Zentella, A., Doody, J., Laiho, M., Wang, X. F. & Massague, J. (1992) *Cell* 71, 1003–1014.
- Ebner, R., Chen, R. H., Lawler, S., Zioncheck, T. & Derynck, R. (1993) *Science* 262, 900–902.
- Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P. A., Pirone, R., Attisano, L. & Wrana, J. L. (1996) *Cell* 87, 1215–1224.
- Fujita, M., Shannon, J. M., Irvin, C. G., Fagan, K. A., Cool, C., Augustin, A. & Mason, R. J. (2001) *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 280, L39–L49.
- Wang, Z., Zheng, T., Zhu, Z., Homer, R. J., Riese, R. J., Chapman, H. A., Jr., Shapiro, S. D. & Elias, J. A. (2000) *J. Exp. Med.* 192, 1587–1600.
- Sternier-Kock, A., Thorey, I. S., Koli, K., Wempe, F., Otte, J., Bangsow, T., Kuhlmeier, K., Kirchner, T., Jin, S., Keski-Oja, J. & von Melchner, H. (2002) *Genes Dev.* 16, 2264–2273.
- Neptune, E. R., Frischmeyer, P. A., Arking, D. E., Myers, L., Bunton, T. E., Gayraud, B., Ramirez, F., Sakai, L. Y. & Dietz, H. C. (2003) *Nat. Genet.* 33, 407–411.
- Mizuguchi, T., Colod-Beroud, G., Akiyama, T., Abifadel, M., Harada, N., Morisaki, T., Allard, D., Varet, M., Claustres, M., Morisaki, H., et al. (2004) *Nat. Genet.* 36, 855–860.

遺伝子操作動物を通して見る受精のメカニズム

大阪大学微生物病研究所

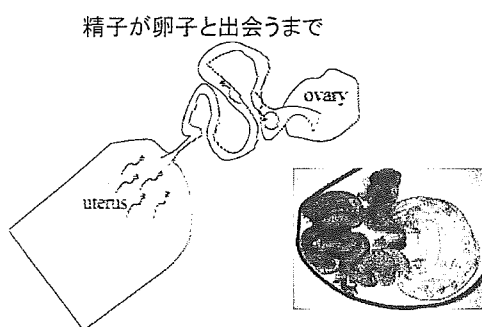
遺伝情報実験センター

岡部 勝

遺伝子改変動物を使用するとこれまでの生化学的な解析では見えなかった反応を明らかにすることができる。たとえば、われわれは全身から緑色の蛍光を発する”グリーンマウス“を作製し、その中からX染色体にトランスジーンが入ったものを利用して、これまで非常に困難であった着床前の胚の雌雄の分別を簡単に行えるような系を作製している。この系を用いて雌雄キメラを作製すると精巣内に「卵子」ができることを見出すことができた⁽¹⁾。このほか、雄性生殖細胞の研究では精子の先体内にGFPを発現するトランスジェニックマウスを作製し、これまでマウスでは観察が難しかった先体反応を可視化することに成功したので遺伝子ノックアウトマウスの生殖能力の検討に使用できるようになっている。

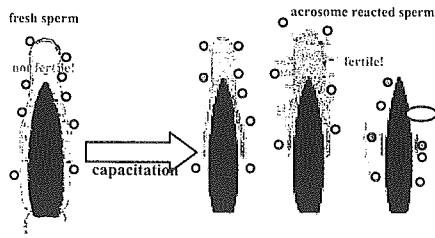
これらトランスジェニックマウス以外に遺伝子破壊動物を用いた実験が広く行われるようになり、個体レベルにおける遺伝子の機能解析がなされている。その結果、さまざまな遺伝子の役割を遺伝子欠損動物個体に現れるフェノタイプとして認識できるようになり、多くの研究成果があげられている。受精の分野においても遺伝子操作動物を用いた解析が進み、これまで受精のメカニズムに関して広く信じられてきた事柄が否定されたり、大幅な修正を加えられたりしているほか、これまでまったく知られなかった因子が新たに重要な役割を担っていることなどが明らかにされつつある。

われわれは以前、精巣特異的な分子シャペロンであるカルメジンを持たない遺伝子改変マウスを作製した。その結果、その精子は形態や運動性は正常であるが、卵子を取り囲む透明帯と結合できないことを見いだした。その後、カルメジンノックアウトマウスと同様のフェノタイプがADAM2 ノックアウトマウスにおいても報告された。われわれはカルメジン欠損マウスの精巣抽出物を用いた免疫沈降実験などから、これら2種類の遺伝子欠損マウスが非常によく似た不妊のフェノタイプを示した理由は、カルメジンがADAM2と特異的に結合し、シャペロンとしてADAM2を膜へ移行させているためであることを示した。ADAM2はもともと精子と卵子の融合に働く遺伝子であると言われてきたが、ノックアウト実験により融合には影響しないことが明らか



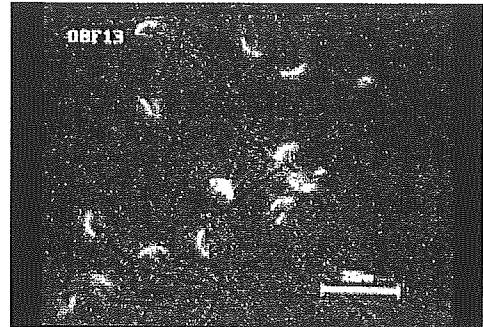
となった。同じくノックアウト実験で卵子ではCD9が精子との融合能に必須であることが報告されたが精子側の融合にかかわる因子については長らくの間、不明であった。精子が卵子と出会うまでには多くの難関が待ち受けているが、それらをクリアした精子は卵子と癒合して、遺伝情報を次世代へと伝えることができる。

Search for fertilization related antigen by

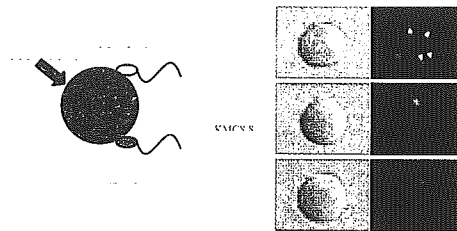


精子と卵子の融合に関与する因子はいったい何なのかは長いあいだ研究が進められてきたがよくわかっていない。われわれは精子に対するモノクローン抗体を作製して、受精能をもった精子にのみ反応して、しかも受精を阻害するものがとれれば、その抗原をあきらかにすることにより融合関連因子が明らかにできるとかんがえた。

このようにしてとられてきたモノクローン抗体の OBF13 である。この抗体は新鮮な精子とは全く反応せず、精子をインキュベーションすると初めて反応性が現れる。とくに透明帯を通過した精子では頭部全体が反応するようになる。



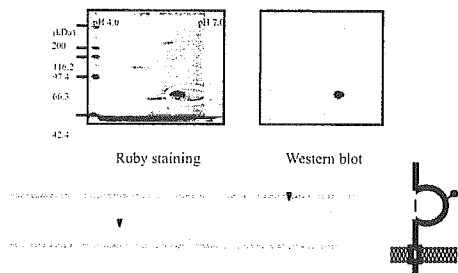
OBF13 inhibits sperm-egg fusion



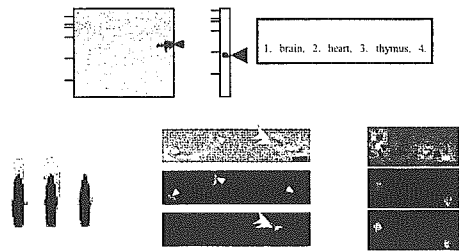
卵子に色素を入れておいてから精子をくわえると融合した精子のみが染色される。このような系を用いて、この抗体の受精に及ぼす影響を観察したところ、この抗体は精子と卵子の融合を阻害することが明らかになった。

精子を 2 次元電気泳動してウエスタンブロットによりその位置を確認すると右図の位置にスポットを同定することができた。そこでこの部分を切り取り LC/MSMS 解析を行ったところ、この遺伝子は意味のグロブリンスーパーファミリーの構造を持つことがわかった。

Izumo is a novel immunoglobulin superfamily



Expression profile and localization of



この遺伝子の発現を体の各臓器において調べたが精巣と精子以外には反応せず、精子に特異的なたんぱく質であることがわかった。

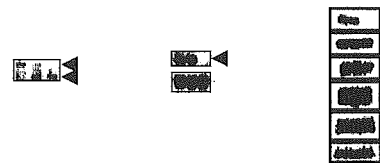
ヒトの相同遺伝子も存在したので、その配列を元に抗体を作製し、精子上の存在を確認したところ、マウスの場合と同じように新鮮な精子とは反応しないが先体反応をおこした精子の頭部全体と反応することがわかった。

そこでこの遺伝子の機能を明らかにするために、右図のようなターゲティングベクターを作製し ES 細胞を使った相同組換えをおこない、ノックアウトマウスを作製した。

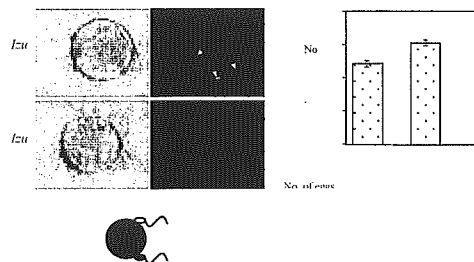
Strategy for targeted disruption of *Izumo*



このようにして作製したマウスの精子からはこの抗原がなくなっていることが確認された。



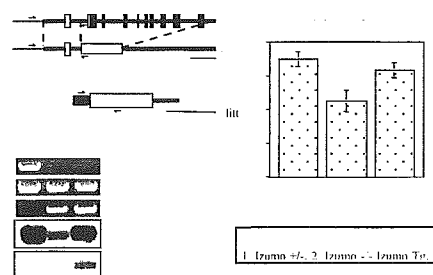
Fusion assay using *Izumo* +/-



ノックアウトマウスの雄を野生型の雌と交配することにより、精子の受精能を測定したが、この遺伝子を欠損させることにより、雄は完全に不妊となった。しかもその作用点は精子と卵子の融合のステップであることが明らかになった。

このようなフェノタイプが本当にこの遺伝子の働きを失わせたことによるものであるのかどうかを明らかにするために、ノックアウトマウスにこの遺伝子の cDNA をトランスジーンとして導入して、その受精能をみたところ、見事に受精能は回復した。したがってこの遺伝子はまちがいに受精の融合のステップに働いていることが証明された。

Rescued fertility of *Izumo* +/- male by transgene



この遺伝子はこれまで知られていなかったもので、縁結びの神様をまつた出雲大社にちなんで *Izumo* と命名した。(2)

Now the essential players were found



今回の発見により、ようやく精子と卵子の双方で受精の融合のステップに関与するものが明らかになった。このような研究は、これまでの生化学的な手法に比べてより直接的にその因子が受精に必須なものであるのかどうかを検証することができる。遺伝子組換え動物は今後ますます盛んに利用されて受精や不妊のメカニズムの解明が進んでゆくものと思われる。

(1) Proc Natl Acad Sci U S A., 102, 4039-44 (2005)

(2) Nature, 434, 234-8 (2005)

受精の膜融合必須分子 Izumo の発見

大阪大学遺伝情報実験センター 遺伝子機能解析分野

井上直和 岡部 勝†
Naokazu Inoue Masaru Okabe

† E-mail : okabe@gen-info.osaka-u.ac.jp

受精は、雌性生殖器内に射出された多くの精子（ヒトの場合1~3億匹）が卵子に到達するまでの間、様々な障害を乗り越えながら最終的に1匹の精子が1つの卵子と融合し、父親の遺伝子情報を受け渡す過程である。これらステップの中でも特に“融合”は、受精可能なごくわずかな精子が正確かつ確実に起こさなければならない現象であり、次世代へ種を保存するために必要不可欠なものである。そのため、きっとそこには種を超えて共通なみごとな仕組みが存在することが考えられるが、この重要な“融合”の仕組みについて分子生物学的な解析はほとんどな

られていないのが現状である。今回筆者らは、世界で初めて哺乳類の精子の融合に深く関与する膜タンパク質を同定することができたので紹介したい。

筆者らは、約20年前にすでに融合のステップを特異的に阻害する抗精子モノクローナル抗体（OBF13）を見いだしていたり。しかし、この抗体のサブクラスがIgMということもあって抗原の探索が困難で、長らくお蔵入りであったが、抗原の抽出法や検出法の進歩もあり、最近になってやっとウエスタンブロット解析から2次元泳動後のゲル上で抗原スポットを同定することができた。あとはLC-MS/MSからアミ

ノ酸配列分析、遺伝子の同定、ノックアウトマウスの作製と一気に解析を進めることができた。この遺伝子は新規であったので、縁結びの神様のいらっしゃる出雲大社にちなんで日本固有の名前である“Izumo”と命名した。

Izumoは、免疫グロブリンスーパーファミリーに属し、細胞外に免疫グロブリン様ドメインを1つだけ持つI型の膜貫通型タンパク質であり（図1A）、少なくともマウス、ラット、ヒトに存在していた。Izumoのリコンビナントタンパク質を抗原として、ヒト、マウスIzumoをそれぞれ特異的に認識するポリクローナル抗体を作製し、タンパ

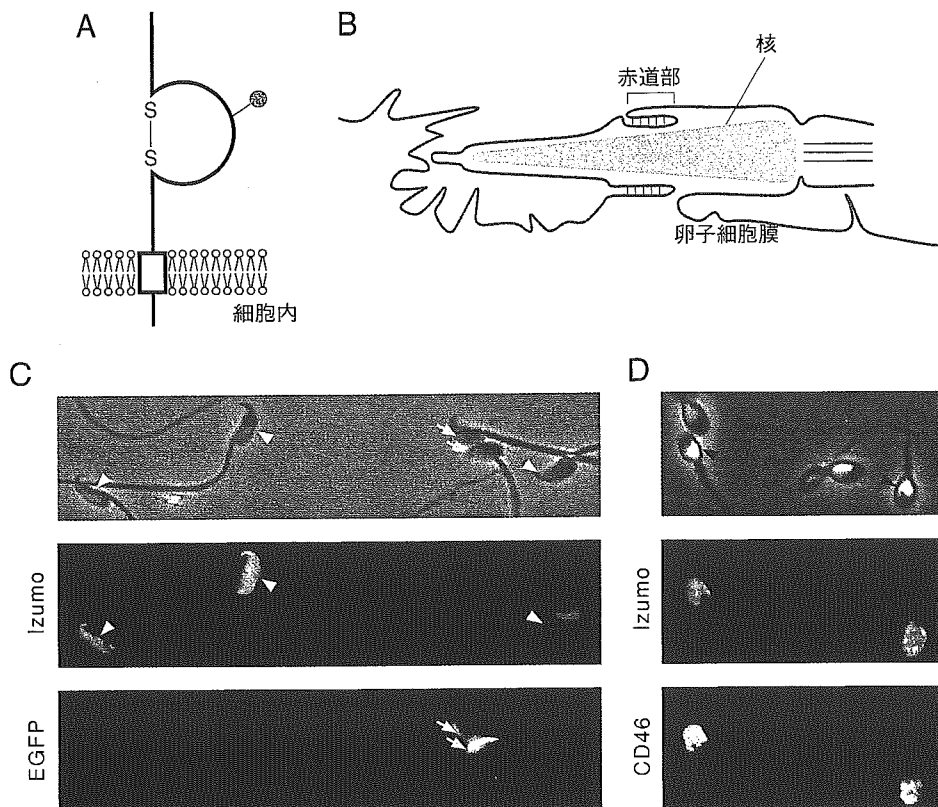


図1. 新規免疫グロブリンスーパーファミリー遺伝子 Izumo の構造と発現局在

A: Izumoは、細胞外に免疫グロブリン様ドメインを1つだけ持つI型の膜貫通型糖タンパク質である。なお⊙はN結合型糖鎖を示す。

B: 精子/卵子の膜融合は精子側の赤道部から始まる。

C: マウスIzumo（赤色）は、先体反応後の精子でのみ膜表面に現れる。なお、先体部にEGFPを保持する精子を用いることで、先体反応前の精子（緑色）と先体反応後の精子（蛍光が消失）を識別した。

D: ヒトIzumo（赤色）も同様に先体反応後の精子でのみ膜表面に現れる。また、Izumoと同じ性質を持つCD46（緑色）を先体反応後のマーカーとして観察した。

A, C, Dは、Inoue N, et al: Nature (2005) 434: 234-238より改変。Bは、Yanagimachi R: Mammalian Fertilization (Raven, New York, 1994)より改変。

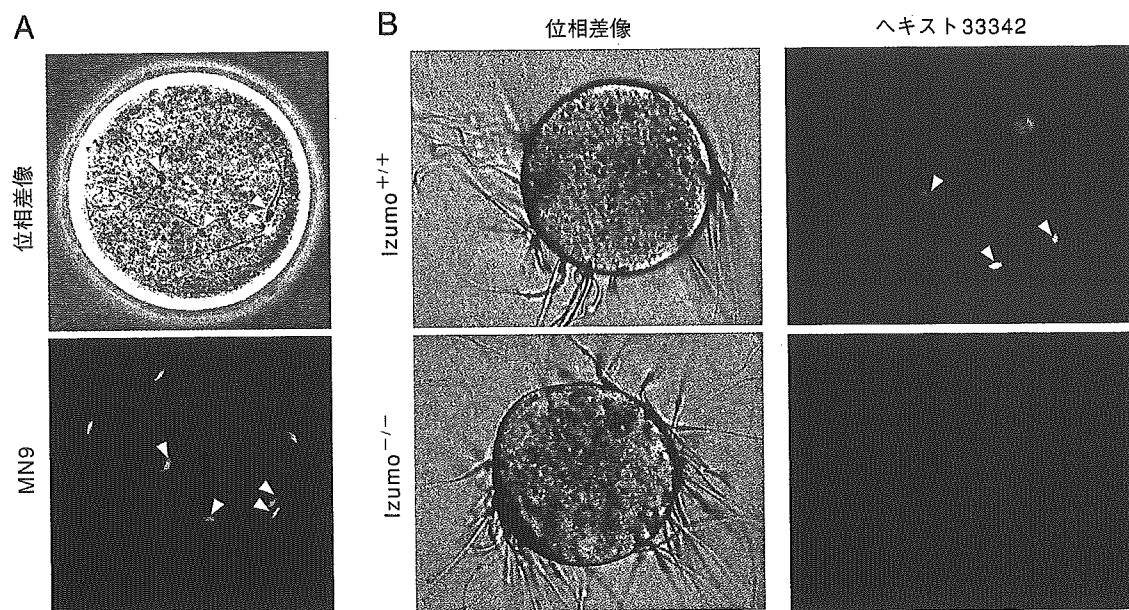


図2. Izumo ノックアウト精子の解析

A: Izumo ノックアウト精子は先体反応を引き起こし、透明帯を通過することができる。先体反応の有無は、先体反応後の精子に特異的に反応する抗体MN9 (千葉大学の年森清隆教授よりご供与頂いた) を用いて評価した。B: Izumo ノックアウト精子は完全に融合能が欠失する。精子の融合能は、媒精前の透明帯除去卵子にヘキスト 33342 を添加し、融合精子にのみヘキスト 33342 が移ることにより評価した。

Inoue N, et al: Nature (2005) 434: 234-238 より改変。

ク質レベルでの組織分布を調べてみるとマウス Izumo は精巣および、精子に特異的に存在していることが明らかになった。また、ヒト Izumo も同様に精子に存在していることがわかった。精子の蛍光染色の結果から Izumo はもともと精子の膜表面にはなく、先体反応を起こした精子の赤道部 (融合の起点と考えられている。図 1B) を含む頭部全体に分布するようになることが明らかになった (図 1C, D)。

Izumo をノックアウトすると、雌は正常であるが雄マウスは交配しても妊娠性を示さず、Izumo ノックアウト精子を用いて体外受精を行ってもまったく受精卵を得ることはできなかった。そこで受精のどの過程に機能異常があるのかを調べるために、Izumo ノックアウトマウスと交配させた雌マウスから卵子を採取して観察したところ、精子は正常に先体反応を引き起こし、透明帯を無事通過していることが確認できた (図 2A)。このステップまで Izumo ノックアウト精子に何ら問題はないことは

明らかであった。次に、精子と卵子が正常に融合すると精子側にヘキスト 33342 が移ることによって融合精子を識別することができるという系を用いて精子の融合能力を検討したところ、Izumo ノックアウト精子は、卵子と融合する能力を完全に欠失していることがわかった (図 2B)。モノクローナル抗体の作製から約 20 年後、最新の技術を用いて長年探し求めていた決定的な証拠を手に入れた瞬間であり、研究者としての至福のときでもあった。Izumo が融合の過程に特異的に作用する分子であることは、Izumo ノックアウト精子が透明帯を正常に通過し、卵子細胞膜と結合能を保持することの他に、融合のステップを顕微受精法でバイパスさせるとノックアウト精子からも産仔を得ることができることで示された。またヒトの場合も Izumo が、卵子との結合または融合に機能するタンパク質であるということ、特異的抗体を用いた受精阻害実験から明らかにすることができた²⁾。

Izumo は多くの免疫グロブリンスー

パーファミリータンパク質と同様に、卵子膜タンパク質と結合したり、精子膜上で分子複合体を形成している可能性がある。今後は卵子で発見された融合関連タンパク質である CD9^{3)~5)} を含めた卵子膜タンパク質との相互作用を解析していくことにより、受精の融合メカニズムを明らかにできるのではないかと考えている。

今回の発見により、やっと精子側と卵子側それぞれ 1 分子ずつではあるが役者が揃い、これまでまったく未知であった精子/卵子の融合メカニズムを解析するための新たな幕がまさに開かれようとしている。

文献

- 1) Okabe M, et al: J Reprod Immunol (1987) 11: 91-100
- 2) Inoue N, et al: Nature (2005) 434: 234-238
- 3) Miyado K, et al: Science (2000) 287: 321-324
- 4) Le Naour F, et al: Science (2000) 287: 319-321
- 5) Kaji K, et al: Nat Genet (2000) 24: 279-282

4 RNAiによる哺乳動物個体レベルでのノックダウン

蓮輪英毅^{*1}, 岡部 勝^{*2}

4.1 はじめに

siRNA (small interfering RNA) の発見を機に、これまで哺乳類では応用できないと考えられてきたRNAiが可能となり、遺伝子の機能解析や遺伝子治療への応用へ向け研究がなされている。本項では哺乳動物個体レベルにおけるRNAi研究のめざましい研究成果について、siRNAを直接投与する方法とベクターにより間接的に導入する方法に関して述べる。また、我々が行っているRNAiをトランスジェニックマウス作製により個体レベルで行なう方法について紹介する。

4.2 合成 siRNA の投与によるマウス個体における RNAi

siRNAは標的とした遺伝子の発現を特異的に抑制できるが、RNAであることから染色体そのものに変化を起こすことはないため非常に安全性の高い遺伝子治療法として使用できる可能性を秘めている。ただし、RNAとしての性質をもつために動物個体内で自由に利用するためには数々の問題を解決する必要がある。現在、siRNAを用いた様々な応用研究が世界中でなされており、それらの研究成果を総合すると臨床的な応用の可能性が見えてきたと思われる。本項では、最近のトピックスを交えながらsiRNAを用いた哺乳動物個体レベルでの遺伝子ノックダウンについて紹介する。

4.2.1 ハイドロダイナミクス法を用いた siRNA の導入

ハイドロダイナミクス法は血管から急速にDNAを注入することにより、肝臓をはじめ腎臓や肺などに遺伝子を導入する方法である。McCaffreyらはルシフェラーゼ発現ベクターとsiRNAやsiRNA発現ベクターを同時にハイドロダイナミクス法で導入することにより、マウスの肝臓においてRNAiが機能することを証明した¹⁾。また、Lewisらも同様な実験を行ない肝臓・腎臓・脾臓・肺・膵臓において、siRNAによりルシフェラーゼの発現を特異的に抑制できることを示している²⁾。これらの結果は動物個体レベルにおいてRNAiが機能することを証明したことに関しては非常に大きな意味をもつが、ハイドロダイナミクス法は急速に大量の溶液を注入する必要があるため、そのままでは人に対する遺伝子治療法として使用することは難しいであろう。

4.2.2 siRNA の化学修飾による安定化と高効率な導入

RNAは非常に不安定であるために、生体内にsiRNAを導入する際の問題点の1つとなっている。RNAを修飾することにより生体内での安定性と細胞導入率を向上させることで、動物個体レベルでのRNAiの効率を上げることができるとSoutschekらは報告している³⁾。彼らはapoB

*1 Hidetoshi Hasuwa 大阪大学 微生物病研究所 附属遺伝情報実験センター 助手

*2 Masaru Okabe 大阪大学 微生物病研究所 附属遺伝情報実験センター 教授

4 RNAiによる哺乳動物個体レベルでのノックダウン

蓮輪英毅^{*1}, 岡部 勝^{*2}

4.1 はじめに

siRNA (small interfering RNA) の発見を機に、これまで哺乳類では応用できないと考えられてきたRNAiが可能となり、遺伝子の機能解析や遺伝子治療への応用へ向け研究がなされている。本項では哺乳動物個体レベルにおけるRNAi研究のめざましい研究成果について、siRNAを直接投与方法とベクターにより間接的に導入する方法に関して述べる。また、我々が行っているRNAiをトランスジェニックマウス作製により個体レベルで行なう方法について紹介する。

4.2 合成 siRNA の投与によるマウス個体における RNAi

siRNAは標的とした遺伝子の発現を特異的に抑制できるが、RNAであることから染色体そのものに変化を起こすことはないため非常に安全性の高い遺伝子治療法として使用できる可能性を秘めている。ただし、RNAとしての性質をもつために動物個体内で自由に利用するためには数々の問題を解決する必要がある。現在、siRNAを用いた様々な応用研究が世界中でなされており、それらの研究成果を総合すると臨床的な応用の可能性が見えてきたと思われる。本項では、最近のトピックスを交えながらsiRNAを用いた哺乳動物個体レベルでの遺伝子ノックダウンについて紹介する。

4.2.1 ハイドロダイナミクス法を用いた siRNA の導入

ハイドロダイナミクス法は血管から急速にDNAを注入することにより、肝臓をはじめ腎臓や肺などに遺伝子を導入する方法である。McCaffreyらはルシフェラーゼ発現ベクターとsiRNAやsiRNA発現ベクターを同時にハイドロダイナミクス法で導入することにより、マウスの肝臓においてRNAiが機能することを証明した¹⁾。また、Lewisらも同様な実験を行ない肝臓・腎臓・脾臓・肺・膵臓において、siRNAによりルシフェラーゼの発現を特異的に抑制できることを示している²⁾。これらの結果は動物個体レベルにおいてRNAiが機能することを証明したことに関しては非常に大きな意味をもつが、ハイドロダイナミクス法は急速に大量の溶液を注入する必要があるため、そのままでは人に対する遺伝子治療法として使用することは難しいであろう。

4.2.2 siRNA の化学修飾による安定化と高効率な導入

RNAは非常に不安定であるために、生体内にsiRNAを導入する際の問題点の1つとなっている。RNAを修飾することにより生体内での安定性と細胞導入率を向上させることで、動物個体レベルでのRNAiの効率を上げることができるとSoutschekらは報告している³⁾。彼らはapoB

*1 Hidetoshi Hasuwa 大阪大学 微生物病研究所 附属遺伝情報実験センター 助手

*2 Masaru Okabe 大阪大学 微生物病研究所 附属遺伝情報実験センター 教授

を標的とした siRNA のセンス鎖の 3'末端にコレステロールを付加させた修飾 siRNA を合成し、マウスの尾静脈より注入することで、生体内における apoB タンパク質の量を減少させることに成功している。この研究は静脈注射による siRNA の全身投与が可能であることを示唆しており、安全面等をクリアできれば RNAi 創薬が可能になるのではないかという期待がもたれる。

4.2.3 27 塩基の 2 本鎖 RNA の可能性

Tuschl らにより最初にデザインされた siRNA は 3'側に 2 塩基のオーバーハングをもつ 21 塩基の dsRNA (double strand RNA) であり、現在の研究に用いられている siRNA の基本的な構造となっている⁴⁾。最近、21 塩基より長い 27 塩基の dsRNA や 29 塩基の short hairpin RNA (shRNA) を使用すると、より高い RNAi 活性を示すことが報告された^{5,6)}。Kim らの報告によると 27 塩基の dsRNA はこれまでの 21 塩基の siRNA にくらべて 1000 分の 1 の低濃度でも RNAi を効率よく誘導することが可能とのことである。これは動物個体レベルで RNAi を応用するためには非常に有用な方法になるかもしれない。27 塩基の dsRNA が“なぜ高い RNAi 活性を示すのか?”ということに関しては不明な点が多いが、21 塩基にくらべ Dicer や RISC (RNA-induced silencing complex) に取り込まれやすくなっているためではないかと考えられている。ただし、鎖長が長くなったことにより、配列によっては off-target などの副次的な効果が出やすくなることも考えられ、dsRNA の配列をデザインする際にはその点に注意を払う必要があるだろう。

前述のコレステロールで化学修飾した siRNA や 27 塩基の dsRNA のように合成 RNA を用いた RNAi に関する新しい技術や手法が日々開発されているが、動物個体レベルでの RNAi という観点からみると、まだまだ解決されなければならない問題が残されている。その 1 つとして目的組織への siRNA デリバリー技術の開発等が挙げられる。現在の RNAi に関する研究は急速に進展していることから、siRNA を用いた遺伝子治療が可能になる日もそれほど遠くないかもしれない。

4.3 ベクターによる siRNA (dsRNA) の発現系を用いたマウス個体における RNAi

これまでにマウス個体におけるベクター系を用いた RNAi の成功例は複数報告されており、用いるプロモーターにより大きく 2 つに分けられる。一つは RNA ポリメラーゼ III (pol III) プロモーターを用いて siRNA を発現させる系で、もう一方は RNA ポリメラーゼ II (pol II) プロモーターを用いて数百塩基の長い dsRNA を発現させる系である。ここではそれぞれの系の特徴と応用例について説明する。

4.3.1 pol III プロモーターを用いた RNAi トランスジェニックマウスの作製

H1, U6 や tRNA などの pol III プロモーターを用いた siRNA 発現ベクターが開発されたことにより⁷⁻⁹⁾、現在では哺乳動物個体で持続的な RNAi を行なうことが可能となっている。pol III プ

ロモーターの特徴は短い RNA や short hairpin などの 2 次構造をつくった RNA を効率よく発現できることや、動物個体レベルにおいて全身で siRNA を発現させることができる点にある。siRNA 発現ベクターの構成は非常にシンプルで pol III プロモーターの下流に siRNA をコードする 20 塩基前後のセンス・アンチセンス鎖、それらをつなぐ数塩基のループ配列と、4 塩基以上のチミン (T) からなるターミネーションシグナルがあるだけである。ベクターが開発された当時は、RNAi 効果の強い siRNA の配列として mRNA のどの部位を標的にするのが良いのかを予め知ることは非常に難しかったが、最近では siRNA 解析アルゴリズムの発達により比較的容易に効果のある配列情報が得られるようになってきている。

我々は EGFP を全身で発現する“グリーンマウス”をモデルとして、EGFP を標的とした RNAi トランスジェニックマウスをマイクロインジェクション法により作製した¹⁰⁾。これまでに H1 と tRNA プロモーターの下流に EGFP を標的とした siRNA をコードする配列を挿入したベクターを用いて試みており、両ベクターにおいて全身性の RNAi 効果を観察することに成功している (4.4 実験例参照)。

マイクロインジェクションによるトランスジェニックマウス作製法とは異なる手法として、ES 細胞に siRNA 発現ベクターを導入して得られたクローンの中から RNAi 効果の高い ES 細胞株を用いてキメラマウスを作製することで、確実に RNAi 効果のある RNAi トランスジェニックマウスを作製する方法についても報告されている。Kunath らは RasGAP をターゲットとした RNAi ベクターを作製し ES 細胞に導入した後、RNAi 効果のある ES 細胞株を樹立し、テトラプロイド胚とアグリゲーションさせることで ES 細胞由来の胚を作製している¹¹⁾。その結果、ほぼ完全に RasGAP の発現を抑えていた ES 細胞株から作製された胚において、ノックアウトマウスと同様の表現型を観察することに成功している。この方法は、ES 細胞の段階で効果のあるものを選択できることから確実性のある方法として有用であるが、ES 細胞を株化する過程を含むことから受精卵に直接トランスジーンを導入することよりも多くの時間を要したり、ES 細胞で発現していない遺伝子においては抑制効果を検討できないなどの欠点もある。また、テトラプロイド胚とアグリゲーションさせて 100% ES 細胞由来のマウスを発生させることのできる ES 細胞株は非常に状態のよいものに限られているので、一般的には Carmell らの報告¹²⁾ のように ES 細胞から得られるキメラマウスをもとに、次の F1 世代で表現型を解析することとなるであろう。

この他、遺伝子導入効率の高いレンチウイルスベクターを用いることで高効率に RNAi トランスジェニックマウスを作製する方法についても報告されている¹³⁾。レンチウイルスは投与方法を工夫すれば局所的な遺伝子デリバリーも可能となることから、RNAi のみならず様々な遺伝子治療に応用できるウイルスベクターとして注目を集めている。レンチウイルスを用いた RNAi 法に関して、ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis) の遺伝子治療を目的としたものが複数のグルー

プから報告されている^{14, 15)}。Ralphらは変異型 human SOD1を発現させた ALS1型モデルマウスの筋肉内に human SOD1を標的とした RNAi レンチウイルスベクターを局所的に導入することで病気の発症時期と生存期間を倍近く延すことに成功し、RNAi レンチウイルスベクターによる遺伝子治療の可能性を示した。

これまで紹介したように、pol III プロモーターを用いた RNAi 法は遺伝子組換え動物作製や遺伝子治療への応用に向けて研究されているが、全身性に RNAi が機能することによる副次的な効果などが問題になっている。現在では前述のレンチウイルスを用いることで局所的な遺伝子デリバリーが可能な系が開発されたり、既存の Cre-loxP システムと組み合わせることでコンディショナルに遺伝子をノックダウンできるシステムが開発されており¹⁶⁾、今後はこれらの系を用いた研究がさらに発展していくものと期待される。

4.3.2 pol II プロモーターを用いた RNAi トランスジェニックマウスの作製

哺乳類では非特異的な反応が起こることにより細胞毒性を示す数百塩基の長い dsRNA は使用できないと考えられてきたが、初期胚や未分化細胞などにおいては特異的に遺伝子の発現を抑制できることが報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。Svobodaらは合成した dsRNA を受精卵にマイクロインジェクションすることで Mos を標的とした RNAi が機能することを報告し、それを発展させトランスジェニックによる卵子特異的な RNAi が可能なトランスジェニックマウスの作製に成功している²⁰⁾。彼らは長い dsRNA を卵子特異的に発現させるために pol II プロモーターに属する Zp3 プロモーターを用い、Mos を標的とした RNAi を行うことでノックアウトマウスと同等の表現系が得られたことを報告している。

品川らは体細胞の細胞質において起こる長い dsRNA による非特異的な反応を回避するために、転写された dsRNA を核内に留めさせることを可能とした pDECAP ベクターを開発した²¹⁾。pDECAP ベクターから転写された RNA はキャップ構造が取り除かれ、さらにポリ A 配列が付加されないことにより、細胞質に輸送されず核内ですみやかに短い siRNA にプロセスされるという理論に基づいて設計されたベクターである。彼らは Ski を標的として CMV プロモーターで dsRNA を発現させる pDECAP ベクターを構築し RNAi トランスジェニックマウスを作製した結果、非特異的な反応を起こすことなくこのベクターをもった RNAi トランスジェニックマウスにノックアウトマウスと同様な表現型を再現することに成功している。

pol II プロモーターを用いた RNAi トランスジェニックは pol III プロモーター単独ではなしえなかった組織特異的な RNAi が可能であり、また最大の利点としては長い dsRNA を用いることができるため siRNA の標的配列を考慮しなくても効果的な RNAi が可能な点にある。ただし、off-target などの非特異的な影響が出やすいことも予想されることから、そのような問題点に関することをいかに解決していくかが今後の課題ではないかと考えられる。

4.4 実験例 (実験プロトコール)

トランスジェニックマウス作製に関しては特殊な装置や技術が必要となるため、自分で系を立ち上げるよりは業務として作製支援を行なっている施設や受託企業のサービスを利用する方が現実的かもしれない。ここではRNAiトランスジェニックマウス作製過程を理解していただく目的で、EGFPを標的としたRNAiトランスジェニックマウスの作製法に関して簡単に紹介する。さらに詳しいプロトコールに関しては羊土社から出版されている「改訂 RNAi 実験プロトコール」²²⁾ やCRC PRESS から出版されている「Gene Silencing by RNA Interference」²³⁾ 等を参考にさせていただきたい。

4.4.1 実験材料および実験機器

(1) siRNA 発現ベクターの作製

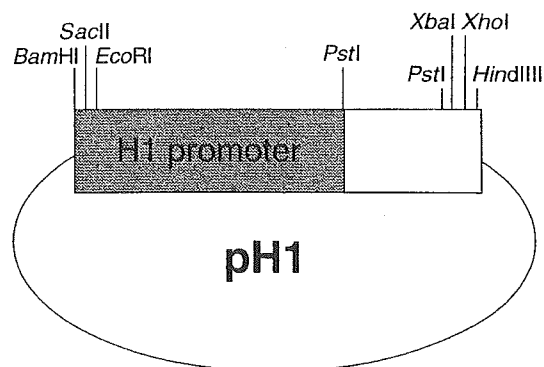
- ・ RNA ポリメラーゼ III (pol III) プロモーターを含む siRNA 発現ベクター

我々は独自に human H1 プロモーターをクローニングし、pH1 ベクターとして用いている (図1-a)。現在は多くの siRNA 発現ベクターが市販されており、iGene 社 (クロンテック社, TaKaRa 社) や Ambion 社などより購入できる。

- ・ siRNA をコードする合成オリゴ DNA

さまざまな DNA 受託合成会社で siRNA の配列デザインと合成を行なってくれるので、それを利用した方が確実である。図 1-b に pH1 ベクター用の EGFP に対する siRNA をコードしたオリゴ DNA を示す。

a



b

```
cccAACCACTACCTGAGCACCCAGttcaagagaCTGGGTGCTCAGGTAGTGGTtttttggaaa
acgtgggTTGGTGATGGACTCGTGGGTCaagtctctGACCCACGAGTCCATCACCAAaaaaacc tttgatc
```

図1 pH1ベクターと合成オリゴ DNA

a: ヒト H1 プロモーターの下流に制限酵素サイトを導入し作製した。オリゴ DNA のクローニングは *Pst*I と *Xba*I, *Hind*III, *Xho*I サイトを用いる。b: EGFP に対する siRNA をコードする合成オリゴ DNA。大文字で示したセンス・アンチセンスを 9 塩基のループでつなぎ、ターミネーション配列 (下線) を含む。

(2) トランスジェニックマウスの作製

・前核期の受精卵

前核期の受精卵は過排卵処理した雌マウスと雄マウスを交配して準備する。または過排卵処理した雌マウスから未受精卵を採取し、体外受精 (IVF) により準備する。

・胚操作器具一式

実体顕微鏡・CO² インキュベーター・胚操作ガラスピペット

・DNA 注入用器具一式

マイクロマニピュレーター付き倒立顕微鏡・エアージェクター・インジェクション針作製装置

・卵子用培地

TYH 培地 (体外受精用)・FHM 培地 (洗卵・インジェクション用)・改変 kSOM 培地 (培養用)

・妊娠 0.5 日目の偽妊娠マウス

ICR の精管切断マウスを準備し、ICR の雌と交配させ膈栓のついたマウスについて妊娠 0.5 日目の偽妊娠マウスとして用いる。

・マウス手術器具一式

眼科ばさみ・先細ピンセット・クランプ・移植用ピペット・2.5%アバーチン (麻酔薬)

(3) siRNA の検出

・RNA 精製試薬と機器

TRIzol Reagent・クロロホルム・イソプロパノール・RNase free water・組織破碎装置 (Mixer Mill MM300)

・電気泳動とトランスファーの試薬と機器

XCell SureLock™ Mini-Cell with XCell ITM Blot Module・15% TBE-Urea Gel, 1.0mm 12well・TBE-Urea Sample Buffer 2X・TBE buffer・Hybond-N+

・オリゴ DNA プローブ

siRNA のセンスとアンチセンスの合成オリゴ DNA・[γ -³²P] ATP・T4ポリヌクレオチドキナーゼ

・ハイブリダイゼーション試薬と機器

ハイブリバッファー (PerfectHyb Hybridization Solution 等)・洗浄液 (2 X SSC, 0.1% SDS)・ハイブリオープン

4.4.2 プロトコール

(1) siRNA 発現ベクターの作製

1. siRNA をコードするセンス・アンチセンスのオリゴ DNA (図1-b) を合成し、それぞれを終濃度が 10 pmol/ μ l になるように混ぜ、95 °C で 5 分間加熱後、室温で 3 時間以上放置しアニー

リングさせる。

2. 制限酵素で消化し精製した pH1 ベクターに、アニーリングしたオリゴDNAを導入する。
3. JM109 や SURE2 などの大腸菌へトランスフォームする。
4. 得られたコロニーからプラスミドを精製し、制限酵素消化やシーケンスによりインサートを確認する。

* この時点で、培養細胞の系を用いてベクターからの siRNA の発現と RNAi 効果に関して検討しておく。

(2) トランスジェニックマウスの作製

1. トランスジーンを制限酵素で消化し精製する。

* pH1 の場合は制限酵素 (*ScaI*) で1カットして直鎖状にしたベクターを精製する。

2. インジェクションするトランスジーン 1kb あたり 0.54 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に調整し、前核期の受精卵の雄性前核へマイクロインジェクションする。

3. マイクロインジェクションした受精卵を 0.5 日目の偽妊娠マウスの輸卵管膨大部に 1 匹あたり 20~30 個移植する。

4. 移植後 19 日目が出産日である。当日午後になっても自然分娩できなかったマウスについては帝王切開により胎仔を取り出す。

5. PCR やサザンハイブリダイゼーションを行ない、トランスジーンをもった個体を選別する。

* 図2に EGFP を標的とした RNAi トランスジェニックマウスを示す。

6. トランスジーンはもっていても siRNA を発現していない個体が存在するので、ノザンハイブリダイゼーションにより siRNA を発現しているマウスを選別し、以後の研究に用いる。

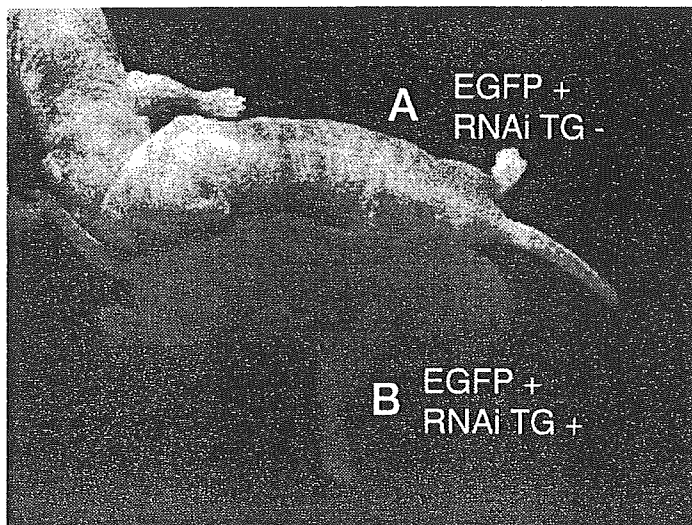


図2 RNAi トランスジェニックマウス

B の EGFP に対する siRNA を発現する RNAi トランスジェニックマウスでは、A の EGFP のみを発現するマウスにくらべ顕著に EGFP の発現が抑制されている。

(3) siRNA の検出

1. RNAi トランスジーンをもったマウスの組織をとり、2mlのエッペンドルフチューブに入れる。

*次の世代を得るために必要なファウンダーマウスやその後の解析に用いるマウスの場合、背中の皮膚を一部とる。また、RNA回収と同時に表現型の解析を行なう場合は腎臓や肝臓などから取った方がきれいなRNAが回収できる。

2. ジルコニアボール（直径5mm）とTRIzol 1mlを加え、Mixer Mill MM300で組織を破壊する。

*Mixer Millなどの破碎機を用いれば1度に数十サンプル処理でき、皮膚や筋肉等の比較的破碎しにくい組織も簡単に破碎可能である。

3. TRIzolの使用説明書に従いRNAを精製し、2~4mg/mlの濃度になるようにRNase free waterに溶かす。

4. 10~30 μ gのtotal RNAを等量のTBE-Urea Sample Buffer 2Xと混合し、95℃で2分間加熱した後、氷水中に2分間放置する。

*この熱処理を行なわないと正しい位置にシグナルが得られないので必ず行なう。

5. 15% TBE-Urea Gelにアプライし、定電圧180Vで1時間泳動する。

6. エチジウムブロマイド溶液で染色し、泳動を確認する。

7. XCell II Blot ModuleにゲルとHybond-N+をセットした後、定電圧30Vで1~2時間通電し、RNAをメンブレンに転写する。

8. 以下のように試薬を加え、37℃で2時間以上反応させプローブを標識する。

| | |
|--------------------------------------|------------|
| 合成オリゴDNA (10 pmol/ μ l) | 2 μ l |
| 10 X T4 polynucleotide kinase buffer | 1 μ l |
| [γ - ³² P] ATP | 5 μ l |
| T4 polynucleotide kinase | 1 μ l |
| Water | 1 μ l |
| Total | 10 μ l |

9. MicroSpin G-25 カラムを用い、未反応の[γ -³²P] ATPを除く。

10. 10mlのPerfectHyb Hybridization Solutionを転写したメンブレンの入ったハイブリバックに入れ、50℃で30分間プレハイブリダイゼーションを行なう。

11. プレハイブリダイゼーションの溶液中にラベルしたプローブを加え、50℃で3時間から一晩ハイブリダイゼーションを行なう。

12. 洗浄液 (2 X SSC 0.1 % SDS) 中にメンブレンを入れ、50℃で30分間洗浄する。

*必要に応じ、同じ操作を繰り返す。

13. X線フィルムやBASシステム（富士フィルム）等を用いてシグナルを検出する。

*図3にRNAiトランスジェニックマウスにおける siRNA の検出例を示す。

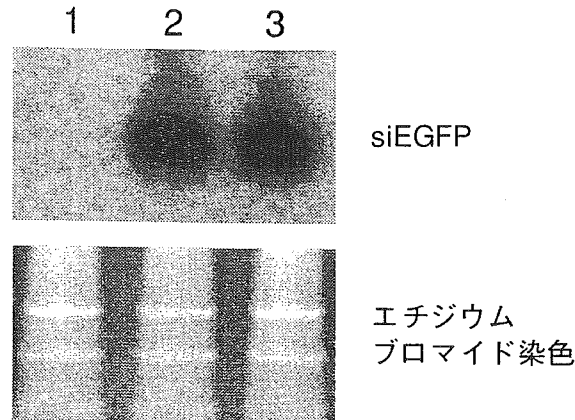


図3 siRNA の検出

8週齢のRNAiトランスジェニックマウスの皮膚からRNAを精製した後、20 μ gのtotal RNAを15% TBE-Urea Gelで電気泳動した。メンブレンに転写した後、センスプローブでノザンハイブリダイゼーションを行った。lane1: RNAi-TG(-), 2,3: RNAi-TG(+)

文 献

- 1) McCaffrey, A. P. *et al.*, *Nature*, **418**, 38-9 (2002)
- 2) Lewis, D. L. *et al.*, *Nat Genet*, **32**, 107-8 (2002)
- 3) Soutschek, J. *et al.*, *Nature*, **432**, 173-8 (2004)
- 4) Elbashir, S. M. *et al.*, *Nature*, **411**, 494-8 (2001)
- 5) Kim, D. H. *et al.*, *Nat Biotechnol*, **23**, 222-6 (2005)
- 6) Siolas, D. *et al.*, *Nat Biotechnol*, **23**, 227-31 (2005)
- 7) Brummelkamp, T. R. *et al.*, *Science*, **296**, 550-3 (2002)
- 8) Miyagishi, M. & Taira, K., *Nat Biotechnol*, **20**, 497-500 (2002)
- 9) Kawasaki, H. & Taira, K., *Nucleic Acids Res*, **31**, 700-7 (2003)
- 10) Hasuwa, H. *et al.*, *FEBS Lett*, **532**, 227-30 (2002)
- 11) Kunath, T. *et al.*, *Nat Biotechnol*, **21**, 559-61 (2003)
- 12) Carmell, M. A. *et al.*, *Nat Struct Biol*, **10**, 91-2 (2003)
- 13) Tiscornia, G. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 1844-8 (2003)
- 14) Ralph, G. S. *et al.*, *Nat Med*, **11**, 429-33 (2005)

- 15) Raoul, C. *et al.*, *Nat Med*, **11**, 423 - 8 (2005)
- 16) Ventura, A. *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 10380 - 5 (2004)
- 17) Wianny, F. & Zernicka-Goetz, M., *Nat Cell Biol*, **2**, 70 - 5 (2000)
- 18) Svoboda, P. *et al.*, *Development*, **127**, 4147 - 56 (2000)
- 19) Yang, S. *et al.*, *Mol Cell Biol*, **21**, 7807 - 16 (2001)
- 20) Stein, P. *et al.*, *Dev Biol*, **256**, 187 - 93 (2003)
- 21) Shinagawa, T. & Ishii, S., *Genes Dev*, **17**, 1340 - 5 (2003)
- 22) 蓮輪英毅, 岡部勝, 改訂 RNAi 実験プロトコール, 羊土社, 165-172, 179 - 194 (2004)
- 23) Hasuwa, H. & Okabe, M., *Gene Silencing by RNA Interference*, CRC press, 289 - 297 (2004)

Genetically Engineered

Mice Handbook



Taylor & Francis

Taylor & Francis Group

Boca Raton London New York

A CRC title, part of the Taylor & Francis imprint, a member of the Taylor & Francis Group, the academic division of T&F Informa plc.

11 Genetic Monitoring of Mice

Hideki Katoh

TABLE OF CONTENTS

| | |
|---|-----|
| Introduction: Genetic Contaminations Reported in the Past | 143 |
| Spontaneous Mutant and Genetically Engineered Mouse Phenotypes | |
| Vary with Genetic Background..... | 144 |
| Genetic Monitoring (Genetic Quality Testing) of Live Mice | 146 |
| Markers for Genetic Monitoring..... | 146 |
| Sets of Markers for Genetic Quality Testing | 147 |
| Categories of Genetic Quality Testing | 149 |
| Schedule of Genetic Monitoring..... | 149 |
| Test Frequency..... | 149 |
| Monitoring Schedule | 150 |
| Genetic Monitoring for Cell Lines, Gametes, and Embryos | 150 |
| Species Identification | 152 |
| Sex Identification | 152 |
| Strain Identification..... | 152 |
| Genotyping of Transgenes and Targeted Genes..... | 153 |
| Development of a Genetic Monitoring Kit | 155 |
| Conclusion..... | 155 |
| References | 156 |

INTRODUCTION:

GENETIC CONTAMINATIONS REPORTED IN THE PAST

There are many strains that are genetically controlled and well characterized worldwide. The number of strains of mice and rats are 436¹ and 220.² They were developed under strict genetic controls such as sister–brother mating. However, there are three primary causes that change gene (DNA) and homozygosity in inbred strains: (1) mutation, (2) residual heterozygosity, and (3) contamination (unexpected outcrossing).

Kahan et al.³ reported that commercially supplied BALB/c mice showed histocompatibility and isoenzyme differences caused by genetic contamination. The abstract from that paper is as follows.