

## 第6回麻布大学 生殖・発生工学セミナー

## 遺伝子導入ラット作製系の現状およびその利用と展望

高橋 利一

株式会社 ワイエス研究所

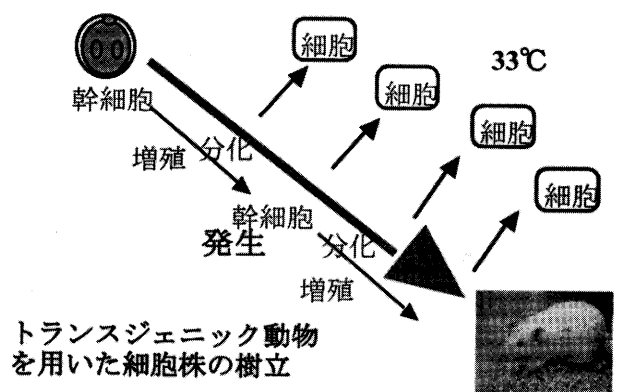
## 1. はじめに (なぜラットなのか?)

小型実験動物であるマウス及びラットはヒトと同じ哺乳動物であること、さらに遺伝学的、微生物学的に統御を受けいることから再現性の高い実験研究ができることから、古くから実験モデルとして利用されてきた。特に本演題の焦点であるラットは、マウスに比べると約10倍という適当な大きさをもつこと、学習能力がマウスより高いことなどが挙げられ、医学、薬学、生物学、心理学等の分野で多用されてきた(1)。この利点を生かしてラットならではの実験手技や実験データが豊富に蓄積されている。さらに近年、ラットのゲノムドラフトシーケンスが公開され、塩基配列情報が表現型情報として整備され、表現形質との関連を実証するための遺伝子導入実験へと発展させる事が容易となっている。ラットでは既に、病態モデルとして数多くの自然発症ミュータント樹立されており、ポジショナル候補遺伝子探索法により、表現型と遺伝子に結びつけることができることから、遺伝子導入によるレスキュー実験などが実施される。他方、ラットの体サイズや遺伝特性を活かして、ラットだからこそ実現する事の出来る遺伝子導入モデルラットの作製に、さらに拍車がかかると考えられる。本演題は、遺伝子導入ラット作製系に関わる現状、とその利用と展望について報告する。

## 2. ラットの特徴を活かした遺伝子導入ラット

## i) 温度感受性T抗原Tgラットの作製と利用

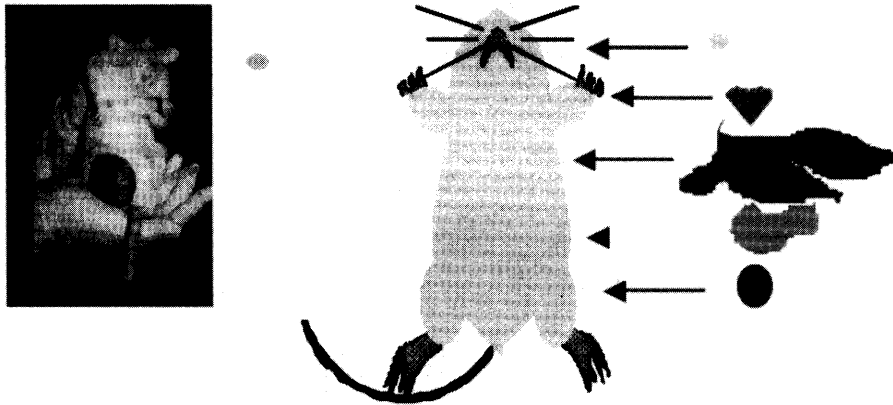
in vivoの実験系である実験動物やin vitroの実験系である培養細胞はともに生物学的基礎研究や、医薬品開発研究において重要な研究手段であることは言



うまでもない。しかし、研究費削減、時間短縮、さらには動物福祉の観点から動物実験の代替の重要性が増している。我々の体を構成する様々な細胞を本来持つ細胞の機能をそのまま維持した細胞が単離出来れば、in vitroの実験系においても、細胞の相互関係が解析でき細胞分化や組織の再構築などがin vitroで再現することが可能となると考えられる。本課題に対して、採取可能な再母数について優位で、且つ医薬品開発研究において一般に用いられているラットを用いて不死化遺伝子を導入したTg動物系統確立を試みた(2)。Tgには個体を構成するすべての細胞に不死化遺伝子を持つことから、発生途上の任意のステージで効率よく細胞株を樹立できる(図参照)。SV40 ラージT抗原には、温度感受性変異株が存在し、不死化タンパク質の活性化が温度依存的に制御出来た。本ラットは様々な細胞株の取得で役立っている。

## ii) 臓器移植のマーカーとしてCAGEGFP Tgラットの利用

遺伝子導入による細胞の標識は広く利用される技術であるが、近年の再生医療分野では細胞移植ある



Tg 作成効率の系統差 (データ)

系統	移植胚数	産子数 (率)	Tg数	Tg作製効率 (Tg数/移植胚数)
<u>&lt;クロースドコロニー系&gt;</u>				
Wistar	5321	1016 (19.1)	142	2.7
Spragu-Dowley	945	140 (14.8)	23	2.4
<u>&lt;近交系&gt;</u>				
DA	427	73 (17.1)	9	1.9
LEW	458	115 (25.1)	7	1.5

いは臓器移植研究において、移植後の生着、分化、移動を知る上で「細胞あるいは組織の標識」は最も重要なツールとなってきている。他方、細胞・臓器移植研究分野においては、外科的処置に対して十分な体サイズを持ち、さらに移植後の拒絶・生着の動物系統の組み合わせパネルが確立しているラットにおける細胞標識動物の樹立が望まれていた。本課題ではGFP マーカーを導入したTg ラットの樹立を試み、全身発現特性を示すCAG 遺伝子を用いる事で、様々な細胞や組織に対して移植実験を行えるモデルラットの樹立を試みた(3, 4)。本ラットは様々な移植実験で用いられてる。

### 3. Tg 作製の現状と問題点

ラットのTg 作製に関する発生工学については、マウスに比べて未整備な状態で、特に系統差による実験成績のバラツキが大きな問題となる。また、ゲノム情報へのアクセスを考えると近交系を視野に入れた発生工学的手法の開発が望まれている。本課題ではYS 研究所においてTg 作製を行ってきた実績をもとに、「Tg ラットの作製の材料となる前核期受精卵

の確保」という視点から過剰排卵の成績、およびTg ラット作製効率を調査した(5)。

### 4. Tg 作製の展望について(まとめ)

ラットの発生工学については日夜進展していると言う事は言うまでもない。クローンラットの成功例が報告され(*ScienceExpress*; 25 September 2003), いままでマウスでしかなかった遺伝子機能を欠失させる事(ノックアウト)の可能性も現実味を帯びてきたと言える。さらには機能を低下させる事(ノックダウン)がラットにおいて取り入れられることで、生体機能を解析するための「機能亢進モデル」と「機能減退モデル」がラットにおいても自由に作製できる時代が到来する。また整理されるゲノム情報をベースに実験モデルとしてラットの利用は増えることが予測できる。この時代に適合した視点からのラットの発生工学の整備拡充が今後の重要な課題である。

### 文献

- 1) Charreau B, Tesson L, Soullillou JP, Pourcel C, Anegon

- I. Transgenesis in rats: technical aspects and models. *Transgenic Res.* 1996 ; 5(4): 223-34.
- 2) Takahashi R, Hirabayashi M, Yanai N, Obinata M, Ueda M. Establishment of SV40-tsA58 transgenic rats as a source of conditionally immortalized cell lines. *Exp Anim.* 1999; 48(4):255-61.
- 3) Hirabayash M, Kato M, Aoto T, Sekimoto A, Ueda M, Miyoshi I, Kasai N, Hochi S. Offspring derived from intracytoplasmic injection of transgenic rat sperm. *Transgenic Res.* 2002; 11(2): 221-8.
- 4) Hakamata Y, Tahara K, Uchida H, Sakuma Y, Nakamura M, Kume A, Murakami T, Takahashi M, Takahashi R, Hirabayashi M, Ueda M, Miyoshi I, Kasai N, Kobayashi E. Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 286(4):779-85.
- 5) 高橋利一, 上田正次 「トランスジェニックラット」 細胞 35(1): 30-33.