

若手研究者による最新海外情報—2

ノックアウトマウス表現型解析の Strategies

土田 晋也

福井医科大学 小児科

はじめに

レニン・アンジオテンシン系 (Renin-Angiotensin; RA) 系は従来より血圧ならびに電解質の調節を行う内分泌系と理解され、RA 系の動態は血漿アンジオテンシン II (Ang II) 濃度と相関する血漿レニン活性 (PRA) で評価されてきた。しかし近年になり、RA 系の構成要素が血管壁、副腎、心臓などの組織局所で存在することや PRA が低値でも Ang II に依存した高血圧状態が存在する¹⁾ ことなどから、組織 RA 系の概念も確立されてきた。また、Ang II は強力な血管収縮作用を有するだけでなく、平滑筋細胞の増殖や細胞外基質の産生亢進などを含めて広く細胞の機能の調節にかかわっている。これらの作用は Ang II 受容体を介して発揮され、それらの受容体がクローニングされるに伴い、受容体毎の機能も明らかになりつつある (図 1)。

私は 1996 年 4 月から米国テネシー州バンダービルト大学小児科学教室、市川教授のもとで研究に従事している。当教室は同大学生化学教室 (稲上正教授) との共同研究も行い、私は「腎発生および血圧維持における RA 系の役割をノックアウトマウスを用いて検討する研究」に従事している。本稿では私達のこれまでの研究成果を踏まえて、ノックアウトマウス表現型解析をすすめるうえでの留意点を解説したい。

1. ノックアウトマウスとは

ノックアウトマウスの作製は、その遺伝子産物の生理的、発生学的意義を固体レベルで明らかにするための、近年で最も画期的な分子生物学的手法のひとつである。すなわち、ある特定の遺伝子について本来存在する遺伝

* 福井医科大学小児科 (〒910-11 福井県吉田郡松岡町下合月23-3)
Fukui Medical University School of Medicine Department of Pediatrics 23-3 Shimoaizuki, Matsoka-cho Yoshida-gun, Fukui-ken 910-11, Japan

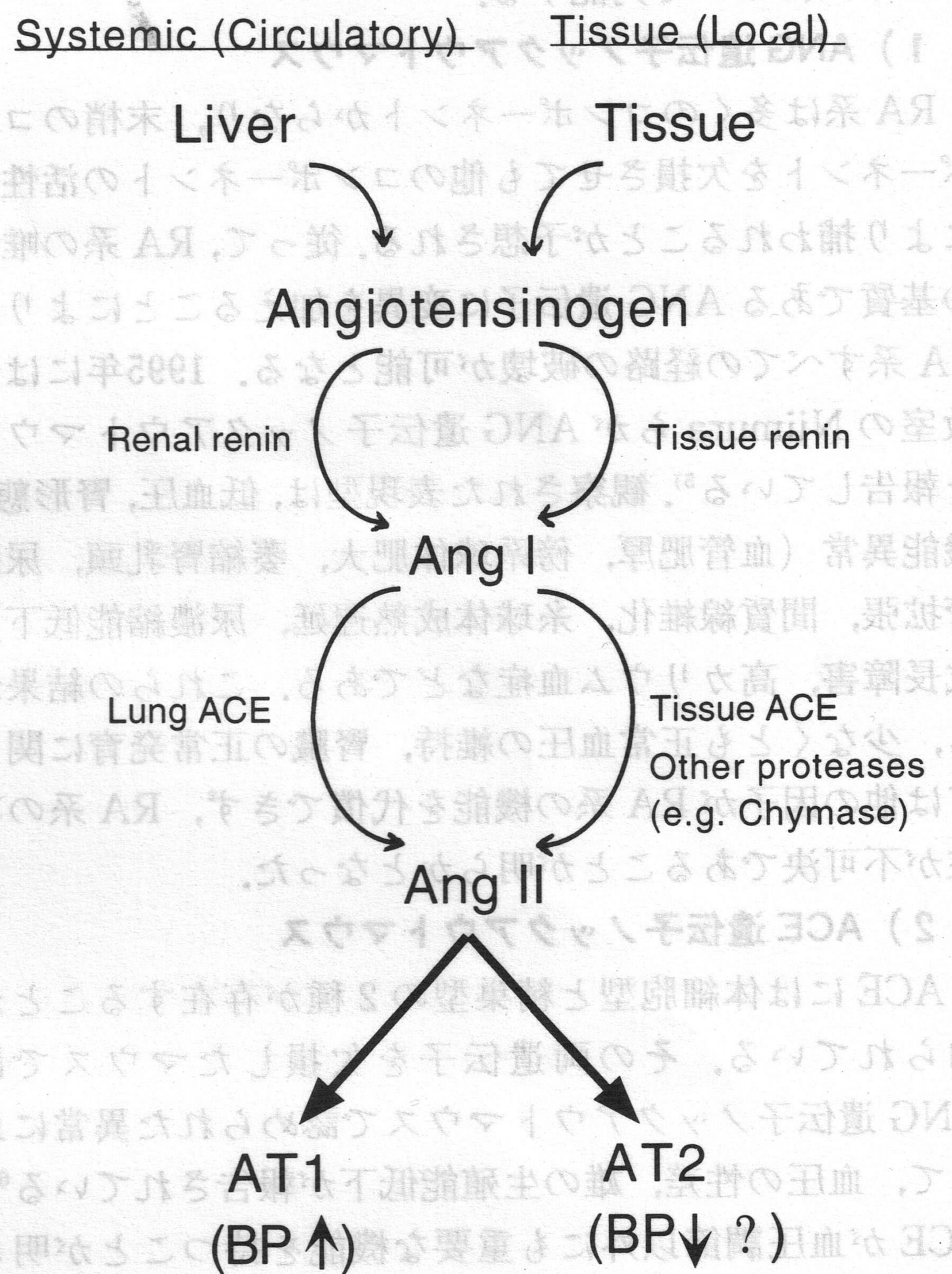


図 1 レニン・アンジオテンシン系

子の位置で相同遺伝子組換え (homologous recombination) を起こす手法を gene targeting といい、この方法で目的の遺伝子に欠失などの変異を組み込んでその蛋白発現が全く起こらないようにしたマウスをノックアウトマウスという。マウス胚幹細胞 (ES 細胞) を用いて変異遺伝子を目的の遺伝子に導入したあと、ある確立でその遺伝子座に相同組換えを起こした細胞を選択して胚に注入後母体内に戻してキメラマウスを作製し、これから一対の遺伝子の片方を欠損したヘテロ接合体が得られる。さらにヘテロ接合体同士を交配してホモ接合体を得ることにより目的の遺伝子を欠損したノックアウトマウ

スが作製できる。最近はある一定の時期や特定の臓器のみに遺伝子組換えを起こさせる方法も確立されつつある。これらの解析によりヒト疾患の原因遺伝子の解明や疾患モデルの開発も可能となっており、その詳細は成書^{2,3)}を参考にして頂きたい。また、インターネットに接続してTBASEにアクセスすれば、最新のノックアウトマウス・リストが検索可能となっているので利用されたい⁴⁾。

2. レニンアンジオテンシン系ノックアウトマウス

これまでに当教室が作製したノックアウトマウスとその他の代表的なレニンアンジオテンシン系のノックアウトマウスについて列記する。

1) ANG 遺伝子ノックアウトマウス

RA系は多くのコンポーネントからなり、末梢のコンポーネントを欠損させても他のコンポーネントの活性化により捕われることが予想される。従って、RA系の唯一の基質であるANG遺伝子に変異を加えることにより、RA系すべての経路の破壊が可能となる。1995年には当教室のNiimuraらがANG遺伝子ノックアウトマウスを報告している⁵⁾。観察された表現型は、低血圧、腎形態・機能異常(血管肥厚、傍糸球体肥大、萎縮腎乳頭、尿細管拡張、間質線維化、糸球体成熟遅延、尿濃縮能低下)、成長障害、高カリウム血症などである。これらの結果から、少なくとも正常血圧の維持、腎臓の正常発育に関しては他の因子がRA系の機能を代償できず、RA系の存在が不可欠であることが明らかとなった。

2) ACE 遺伝子ノックアウトマウス

ACEには体細胞型と精巣型の2種が存在することが知られている。その両遺伝子を欠損したマウスではANG遺伝子ノックアウトマウスで認められた異常に比して、血圧の性差、雄の生殖能低下が報告されている⁶⁾。ACEが血圧調節以外にも重要な機能を持つことが明らかとなった。今後の解明が待たれる。

3) Ang II 受容体遺伝子ノックアウトマウス

Ang II受容体は複数のタイプが存在することが知られている。AT 1受容体は非ペプチド型拮抗薬ロサルタンと特異的に結合し、DTTにより不活性化される。AT 2受容体はペプチド型拮抗薬CGP42112Aや非ペプチド型拮抗薬PD123319と特異的に結合しDTTにより不活性化されない。現在クローニングされているAng II受容体はAT 1, AT 2受容体のみであり、知られているAng IIの作用のほとんどはAT 1受容体を介することが薬理的解析によって示されている。この他にAng II代謝産物Ang(3-8), Ang(1-7)の受容体の存在が指摘されているが一定の見解を得るに至っていない。

マウスAT 1受容体には2種のサブタイプ(AT 1 a, AT 1 b)が報告されているが、これらはアミノ酸レベルで互いに90%以上の相同性を有し、両者を区別するアンタゴニストは知られていない。従って、その生理機能や正確な発現細胞の解析は今まで不可能であった。そこで、当教室のMatsusakaらは、AT 1 a受容体の翻訳領域の開始コドンにインフレームでlacZ遺伝子を導入し、レポーター遺伝子とした形でgene targetingを試みた^{7,8)}。この方法によると、遺伝子ノックアウトマウスを得られるだけでなく、AT 1 a受容体遺伝子と置き換えられて発現するlacZのシグナル(発色反応により、比較的簡単に検出できる)を解析することにより、AT 1 aの発現部位を詳細にかつ簡便に同定できる。この手法を用いて当教室のChenらは、AT 1 b受容体遺伝子ノックアウトマウスの作製も同様に試みた⁹⁾。得られた両ノックアウトマウスは予想に反して、AT 1 a受容体遺伝子ノックアウトマウスでわずかに腎形態異常(血管肥厚、傍糸球体肥大)と低血圧が認められたのみで、AT 1 b受容体遺伝子ノックアウトマウスに関しては正常マウスと同等であった。このことは、双方の受容体が機能を代償しあっている結果である可能性とともに、未知のAng II受容体の結果であることも否定できない。

一方、AT 2受容体遺伝子ノックアウトマウスは、稲上研Ichikiらが報告している¹⁰⁾。そのノックアウトマウスでは、基礎血圧が正常マウスにくらべ10mmHg以上高く、さらにAng II投与に対する昇圧反応が亢進していた。このことは、AT 2受容体がAT 1受容体に拮抗する可能性を示唆し興味深い。

3. ノックアウトマウス表現型解析にあたって

ここまで代表的レニンアンジオテンシン系ノックアウトマウスについて紹介してきたが、ここからは、できあがったノックアウトマウスを如何に解析していくかを解説する。

まず、目的とする遺伝子の発現時期(When)、発現部位(Where)、発現量(How much)、相補する類似遺伝子(Whom)をあらかじめ把握しておく。その上で、予想される表現型、そのノックアウトマウスを用いて解析できることは何かを十分に議論してノックアウトマウスの作製にかかることである。この時、マウスとラットは「似て非なるもの」であると心得ておくべきである。AT 1 b受容体遺伝子ノックアウトマウス解析に際し、ラットでは下垂体、副腎等の内分泌器官においてAT 1 b受容体がdominantであることから表現型解析を試みたが、組織学的に調べても明らかな異常は認められなかった。そこで改めて、マウスでの下垂体、副腎でのAT 1

表1 ノックアウトマウス表現型の分類と対策

	Expected	Unexpected
Observed	A さらにもう1系統のマウスで確認	B さらにもう1系統のマウスで確認
Non-observed	C 相補する因子はないか？ 負荷を与えてみる 細胞培養、器官培養で観察してみる 遺伝的バックグラウンドを変えてみる	

b 受容体発現量を検討してみたところ、マウス AT 1 b 受容体はラットと異なり、すべての臓器においてわずかに発現しているのみであったという経験がある。また、マウスの体重はラットのおよそ10分の1。従って、解析に要する労力は10倍と心得るべきである。時に特注のマウス測定機械を開発する必要もでてくる。

次にノックアウトマウスが得られてからの表現型解析について述べたい。当教室では、ノックアウトマウスの表現型を表1のように分類し検討を進めていく。

まず、予想どおりの表現型が確認できた場合(表1 A, RA系ノックアウトマウスに共通して観察される低血圧等が相当)。快心の笑みを浮かべた後、独立したもう1系統の変異マウスで同じ表現型が観察されるかを確認する

(既に報告がある場合は省略可能)。次に検討予想外の表現型がないか(表1 B)の解析にうつるが、この時は、研究者の観察力とノックアウトマウスに対する思い入れが問われる瞬間でもある。ANG 遺伝子ノックアウトマウスを始め、各 RA 系ノックアウトマウスで観察された腎血管肥厚に加えて、水腎症様の萎縮腎乳頭、尿細管拡張、間質線維化がその例である。詳細な発症機序は依然不明であるが、1) ANG 遺伝子ノックアウトマウスに ANG をトランスフェクションさせるとこれらの表現型が消失することから、ANG 欠如が直接関与している¹¹⁾、2) 胎児から取り出した尿管培養で AT 1 作用をブロックすると尿管平滑筋の成熟が遅れることから、後者の原因として尿管機能不全による水腎症が疑われる¹²⁾、3) 血管肥厚の原因としてレニン分泌亢進が疑われたが、レニン分泌血管と肥厚血管が必ずしも一致していないこと¹³⁾等が指摘されている。今後の検討が待たれる。

予想に反して表現型が確認できなかった場合(表1 C; 実はこれが一番多い!)の対応はどうするか。まず、類似の物質、あるいは、未知の経路によってその欠損が補われていることを疑う。個体にとって重要な遺伝子は、進化の過程で生じた必要な局面に合わせ、類似の作用をもつ別の遺伝子が作られているからである。例えば、現在行っている AT 1 a, AT 1 b 両受容体遺伝子ノックアウトマウスの解析結果、両受容体遺伝子ノックアウト

マウスはほぼ ANG 遺伝子ノックアウトマウスと同等の表現型を呈することが明らかとなっている¹⁴⁾。このことから、単独ノックアウトマウスでは相補して欠損を補っていたこと、AT 2 受容体に対する作用欠如は少なくとも ANG 遺伝子ノックアウトマウスで観察される表現型に寄与していないことが示された。また、ANG 遺伝子ノックアウトマウスでは予想されていた低アルドステロン血症は観察されなかった¹⁵⁾。そこで、血中カリウム値を測定したところ高値を示し、RA 系が欠如した動物では血中カリウムがあたかもホルモンかのように働いていることが明らかとなった。表1 C の場合、同時に検討すべきことは、様々な負荷・刺激をかけても表現型が現れてこないかの解析である。当初、組織学的、発生学的に異常はないと報告されていた AT 2 受容体遺伝子ノックアウトマウスにおいて、当教室の Nishimura らは胎児期の尿管分化、発育に異常が認められることを示した¹⁶⁾。AT 2 受容体はその発現時期、発現部位から器官形成に関与していることが予想されており、胎児期(これもひとつの負荷!)にまで及ぶ執拗な観察から明らかとなった事実である。

最後に、マウスによって表現型がばらつく場合の対応。この時は、独立した2系統の変異マウスで表現型を再検討するとともに、キメラマウス以下どのように交配したかをマウス遺伝的バックグラウンドを再確認する¹⁷⁾ 必要がある。表現型がある程度以上ばらつくと、何が primary defect か解析するとき困難を抱えることになる。可能なら、細胞培養、組織培養、器官培養あるいは ex uterine の胚生育系などを用い様々な条件下で解析することが有効であることがある。当教室の Miyazaki らは AT 2 受容体遺伝子ノックアウトマウスの胎児尿管を器官培養し、AT 2 受容体がアポトーシスに寄与していることを明らかとしている。

当教室では、各ノックアウトマウスは完全主治医制となっている。すなわち、ANG 遺伝子ノックアウトマウスは A さんが受け持ち、ACE 遺伝子ノックアウトマウスは B さんが受け持ちといった具合である。実験に対する思い入れ、執拗さが、最後にはものをいうことはどのような実験においても変わりがなく、マウスとの長年の付き合いの末に解ってくる点も多く、この制度は有用であると私は考えている。

おわりに

今後解明が期待されるトピックを以下に列挙すると、1) 組織 RA 系の役割を個体レベルで証明する(当教室では AT 1 受容体遺伝子局所ノックアウトマウスを用いて検討中)、2) AT 2 受容体の機能と細胞内シグナル

