

サイエンス・プラザ

遺伝子から表現型へ，メンデルを逆立ちさせた偉人たち

米国立環境衛生科学研究所生殖発生毒性学部門 三品 裕司
分子発生学研究室室長

1. はじめに

「遺伝学的手法で高等動物を解析する際に、我々ははなはだしく無力であった。」

それまでの数年間の軌跡をふりかえり、マリオ・カベッキは1989年に出版されたエッセイをこのような出だしで始めたのであった。高等動物、ここでは特にマウスを指すが、それを「遺伝学的に解析したい、という発生学、遺伝学に携わる多くの研究者の願いが、相同的DNA組換えと胚性幹細胞を組み合わせることにより、マウスの特定遺伝子を操作する方法としてほぼ完成した年のことであった。80年代は高等動物においてさまざまな遺伝学的解析手法が開発された時代であった。20世紀中にはその完成は絶望的といわれていた本手法が、数年のうちに現実のものとなったのは、分子生物学の驚異的な発展もさることながら、2007年のノーベル医学生理学賞を受賞したマリオ・カベッキ、オリバー・スミシース、マ

ーティン・エバンスらの先駆的な発見とその後の弛まざる研究成果によるところが大きい。それを受けて90年代には遺伝学自体が大きく変わっていった。筆者自身もこの「新しい」方法をいち早く導入し、日々の研究に利用している。余談ではあるが、89年のカベッキのエッセイを翻訳して日本の研究者に広く紹介する機会にも恵まれた。本小文では、これらの発見の動機づけとなった生物学の状況、突破口となった発見、そしてそれらがどのように改良されてきたのかについて述べていく。

2. 遺伝学、遺伝学的手法とは

それでは、新しい遺伝学的解析手法とは何なのか。高校生物の教科書をひもとくまでもなく、遺伝と言われればメンデルの法則が思い浮かぶ。生き物の性質を「形質」という言葉で具体化し、それは親からの「情報」（の組み合わせ）で決まる、という発見である。ワトソン、クリックによる

◆ も く じ ◆

サイエンス・プラザ

遺伝子から表現型へ、
メンデルを逆立ちさせた偉人たち …………… 1

トピックス

能登半島環境放射能調査…………… 8

授業実践

遺伝子とDNAの眺めかた…………… 12

高校生へ私が選んだ1冊の本

物理学者、ゴミと闘う…………… 16

DNA の 2 重らせん構造の発見以来、多くの研究者たちによって、遺伝情報は DNA 上の塩基配列によって決まる、ということが繰り返し確認されてきた。したがって、今、遺伝学といった場合に、狭義には「ある形質を決める DNA 上の塩基配列を知る学問」ということになる。高校の教科書にも出てくる例からマウスの y 変異を紹介する。これは劣性遺伝でホモは致死となり、ヘテロは同じ変異がもたらす優性形質のために毛の色が黄色くなるという生徒泣かせの遺伝様式をとる。今では、DNA 上にどのような塩基配列の異常が起きているのかが分かっているため、そして、その異常のためにどのタンパク質にどのような異常が起きるのかが分かっているために、ホモは劣性致死、ヘテロは優性で黄色、という現象が分子の言葉で論理的に説明できるのである。このように、現象、形質、いいかえれば「表現型」から遺伝子の異常、すなわち「遺伝子型」を見いだすのが遺伝学的手法とよばれている。

ところが、である。遺伝学的手法で高等動物を解析する際に、80 年代前半までは、我々にはなはだしく無力だったのである。細菌や酵母など、ゲノム（遺伝子全体の一つのセット）が半数体であるものは、遺伝子がもともと 1 コピーしかないから、そこに異常が起きれば表現型の異常として検出される可能性がでてくる。しかし、マウスの場合にはゲノムは 2 倍体であるから、2 コピーある遺伝子のその両方に異常が起きないと表現型にはつながらない。一つのコピーに異常が起きたヘテロ接合体同士を掛け合わせれば 25% がホモ接合体になるので、理論的にはそれを解析すればよいわけだが、そこで、さまざまな困難にぶちあたる。劣性変異の場合にはヘテロ接合体の表現型には変化がない。100 匹のマウスを目の前にして、たとえこの中のどれかがヘテロ接合体である、といわれたとしても（通常はそれを証明するのも大変）、どれを選べばよいのかが分からない。細菌であれば、幾千万のコロニーを一つ一つチェックする事も可能であるが、数千匹のマウスを飼うというのは場所や資金面で簡単ではない。さらに、

発生過程で致死となるような変異の場合には、生まれてきたマウスを見ている限りは何も得られない。カエルのように発生の過程を肉眼で経時に追跡できるような生物ではまだしも、子宮の中で（つまり直接見る事のできない環境で）発生が進むマウスの場合には、妊娠マウスを解剖するしか方法がなく、あるのかないのか分からない表現型を見るために多くのマウスを屠殺する、というのは動物倫理も含めて方法論的に問題が多い。

一方、DNA の 2 重らせん構造の発見以来、分子生物学は長足の進歩を遂げ、多くの遺伝子がクローン化されるようになった。

「遺伝子をクローン化したら何ができますか？」この質問を受けた 80 年代前半のある日、筆者は「サザン（DNA の構造のチェック）とノザン（遺伝子の発現量のチェック）しかないですねえ。」と答えるしかなかったのであるが、その遺伝子の機能を直接的に調べる方法があれば、という思いは生物学、特に発生生物学に携わるものの切なる願いとして業界にうずまいていたのである。そして、当事者たちにとっては当然の思考の流れとして、クローン化した遺伝子をもとにして、変異マウスを作る事ができないだろうか、という発想が生まれてきたのである。すなわち、これまでの遺伝学は表現型から遺伝子型を求めたのに対し、新しい遺伝学は遺伝子型から表現型を求めよう、というものであった。今回受賞の対象となった功績は、言葉を換えればマウスで、この「逆」遺伝学的手法を可能にしたこと、ということになる。

図 1 は誤解を承知で逆遺伝学を視覚化したものである。30 万はあるといわれる高等動物の染色体上に存在する遺伝子のうち、狙ったたった一つのを破壊、あるいは変化させるという方法論である。ポイントは狙ったものだけを望んだ形に変えることであり、それ以外の染色体上の DNA には変化を与えない、というところにある。遺伝子操作が普及し始めた頃に遺伝子クローニングの話を高校の先生方にお話したところ、「そんな小さいものをピンセットで扱えるのでしょうか」「DNA をのりづけするような微量の接着剤をど



図1 ジーンターゲティング，狙った遺伝子のみを破壊する方法の概念図

う調節するのでしょうか」といった質問を受け、答えに窮したことがある。図1のような発想を具体的な技術に昇華させるためには、多くの研究者の様々な試行錯誤が必要とされたのであった。

3. では、どうやって？

実は逆遺伝学という考え方は以前から存在した。細菌や酵母では70年代、組替えDNA技術の確立によっていち早く取り入れられ、狙った遺伝子へ変異を入れることに利用されていた。それゆえ、概念としてはすでに確立されたものであり、マウスへの応用は「単に」生物種を変えただけだから、受賞対象にはならないだろうという風評は確かに存在した。しかしながら、マウスで逆遺伝学を展開するためには越えなければならない壁がいくつもあった。それを越えるために、片や相同的組換えに対するカベッキ、スミッシーズの多大な貢献があり、片や胚性幹細胞Eの利用に関するエバンスの多大な貢献があったのである。

前置きが長くなったが、ではどうやって狙った遺伝子へ望みの変異を導入するのか。その答えは相同的組換えの利用である。相同的組換えとは、二つのDNAの配列が同じときに、それらの間で組換えが起きる現象を指す。大腸菌や発芽酵母にDNAを外から導入した場合、高い頻度で染色体の中の相同的な部分との間で組換えを起こす。したがって、あらかじめクローン化してある遺伝子に試験管内で好きな変異を導入しておき、それを大腸菌に導入すれば、かなりの頻度で染色体にあ

る正常な遺伝子との間で交換反応が起き、狙った遺伝子に望みの変異が導入された大腸菌を得ることができる。発芽酵母より高等とされる分裂酵母では、この反応の頻度はかなり低くなるが、それでも実験者が個人的にがんばればなんとかなる程度ではある。ところがマウスをはじめとする高等動物細胞ではこの頻度がとんでもなく低いのである。そもそも高等動物細胞では相同的組換え反応が起きるのかどうかさえ分らなかった。導入した遺伝子は染色体のありとあらゆる場所に配列に関係なく挿入されるように見えたからである。

このような闇夜の中でカラスを探すような状況で、高等動物細胞でも確かに相同的組換えが起きることを示したのがスミッシーズだった。日本では組換えDNA技術がようやく黎明期を迎え、その厳しすぎる規制から高速道路（欧米）のとなりで青の洞門をうがつ市九郎／了海のようにどと揶揄されていた時代に、卓越したアイデアと最新の技術を駆使して、10万分の1の確率でしか起きない相同的組換えの確認に成功したのであった。

一方、カベッキは薬剤耐性遺伝子をうまく使う事によって、わずかに起こる相同的組換えを検出する方法を考案し、マウス細胞での相同的組換えの性質を手探りで調べていった。薬剤耐性になる遺伝子にあらかじめ変異を入れておき、これを細胞に導入する（図2）。

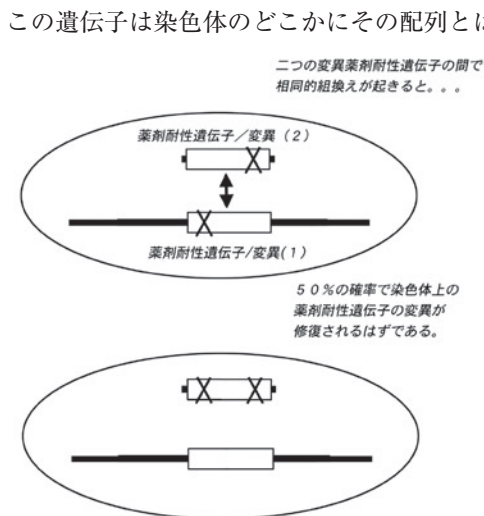


図2 初期のターゲティング実験

関係に導入される。そこで今度は同じ遺伝子に別の変異を入れて再び細胞に導入する。すでに染色体上にある変異薬剤耐性遺伝子との間で相同的組換えが起きた場合にのみ、正常な薬剤遺伝子が染色体上に登場し、そうなった細胞のみがシャーレの中で生き残る、というわけである。複雑な遺伝子操作を行わずとも、シャーレの中の細胞を数えればよいということになる。

これらの研究から、相同的組換えを行うために、どのように細胞へ導入する DNA（ベクターとよぶ）をデザインすれば良いのかが分かってきた。後述するマーティン・エバンスの弟子の一人、アラン・ブラッドレーもベクターのデザインに対して多大な貢献をしている。そして、染色体上の狙った遺伝子に望みの変異を導入する方法にジーンターゲティング法という名前がつけられた。ジーンターゲティングのためにデザインされたターゲティングベクターの概念を図3に示す。その後さまざまな工夫がほどこされてきたが、基本骨格は現在でも変わっていない。真ん中に適当な DNA 配列を置き、その両脇に染色体上の DNA と相同な配列を持った DNA をつなげる、これだけである。狙いたい遺伝子の両側の DNA と相同な配列をつけてやれば、それぞれの部分で相同的組換えが起こり、狙った遺伝子と「適当な DNA 配列」とが交換される。つまり、30 万個の遺伝子のうち、一つだけが破壊されたことになる。だが、前述したように、このベクターは他の場所にもランダム

に挿入されてしまう。そしてそれは狙った場所に入る頻度にくらべて 1,000 倍も高い。

そこで、工夫その 1。「適当な DNA」の部分に薬剤耐性遺伝子を使う。ベクターが狙った場所に入れば、その細胞は薬剤に耐性になるから、培養液に相当する薬剤を入れておけば、生き残るはずである。ところが、これは必要条件でしかない。ランダムに入ったものも生き残るからである。そこでさらに工夫その 2。相同的な DNA 部分の外側に、細胞を殺してしまうような「自殺」遺伝子をつけてやる。ベクターがランダムに染色体のどこかに挿入されるのであれば、自殺遺伝子も一緒に入り込んで、その細胞を殺してしまうが、相同組換えで狙ったところにベクターが入るのであれば、自殺遺伝子は染色体には入らず、やがて消えてしまう。この方法はカベッキにより考案され、ポジティブネガティブ選択法と名付けられた。なお、最初の報告では、この方法によって 2,000 倍の濃縮がかかるとされたが、様々な応用例をもにすると、せいぜい数倍といったところである。実際には、二つの選択を経たあとも、まだ必要条件しかクリアしておらず、最終的には一つ一つの細胞で DNA の構造を確認しなければならない。だが、運が良ければ数十個の一つ当たりがでてくる。これは研究者が特にがんばらなくてもなんとかなる頻度である。カベッキらのアイデアに業界の研究者たちがどれほど勇気づけられたか想像できようというものである。

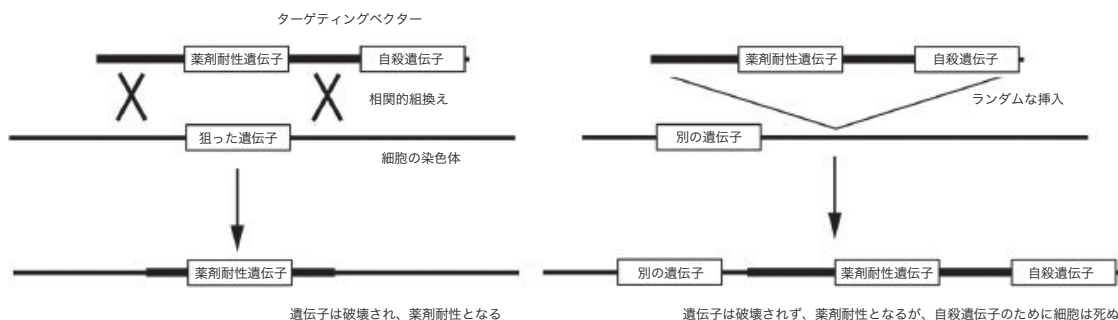


図3 ジーンターゲティングベクターの基本形

二つの相同的部分（太線）で薬剤耐性遺伝子を囲む。片方に自殺遺伝子をつなげる。染色体上の遺伝子と相同的組換えが起きれば、狙った遺伝子は破壊され、細胞は薬剤耐性となって生き残る。ランダムに入った場合には、共存する自殺遺伝子のために細胞は死滅する。

4. 細胞から個体へ

高等動物「細胞」で、狙った遺伝子のみを改変できるようになった。だが、生きた個体で遺伝子を改変するためにはさらなる発想の飛躍が必要であった。数十個に1個当たりがでるといっても2種類の方法で多くの細胞を殺してからの話である。10万分の1という確率はそのまま厳然としてそこにあるのである。受精卵にDNAを導入して、いわゆるトランスジェニックマウスを作るという技術は80年代前半に確立していた。筆者の科学上の祖父にあたるラルフ・プリンスターは、トランスジェニック技術の確立に多大な貢献をした一人であり、数年前にカベッキとともにラスカー賞を受賞している。しかしながら、10万個のマウスの卵を扱うというのは現実的ではない。そのためには1万匹のマウスが必要で、そのためには100坪の飼育室が必要で、それも1回の実験で消費してしまう。熟練した技術者であれば一日に数百の卵にDNAを導入できるが、10万個となると数ヶ月かかる。さらに、実験がうまくいったかどうか分かるのは、マウスが生まれてからになる。このような問題を結果として一気に解決したのが、胚性幹細胞の発見（発見というよりは創出といったほうがぴったりくる）なのである。

癌の中でも奇形種といわれるものは、その中に様々な組織に分化した細胞が混在し、「がんとは、未分化な細胞の無制御な増殖である」という定義からややみだした奇妙なものである。それゆえ、発生生物学の材料として注目を集めていた。奇形種の中に幹細胞に相当するものがある、そのためにいろいろな組織が分化してくるのだろう、との考えのもと、実際に幹細胞様の細胞が単離され、胚性癌腫細胞（EC細胞）と名付けられた。実際、EC細胞は皮下やシャーレ内でいろいろな組織に分化する能力を示したのであるが、同時に癌も引き起こした。そこでエバンスは、初期胚から細胞をとってくれば、様々な組織に分化する能力を保ち、かつ癌にはならないようなものができるのではないだろうかと考え、着床直前のマウスの3日

目胚から細胞株を樹立し、これを胚性幹細胞（ES細胞）と名付けたのである。実際、ES細胞はシャーレの中でいろいろな刺激に反応し、様々な組織に分化する。再生医療の重要な材料として現在注目されている所以である。さらに初期胚と混ぜ合わせると胚の細胞と一緒に様々な組織、臓器に分化し、一つの個体を形成する（図4）。こうしてできた個体はギリシャ神話の怪物の名前をとってキメラとよばれる。ES細胞は生殖細胞にも分化するので、キメラの子供は全身の細胞がES細胞由来のDNAを持つ事になる。

こう書くとも簡単なように聞こえるかもしれないが、現在でも全く経験のない研究室がこの方法を導入しようとするのはかなり大変である。まずES細胞はさまざまな組織に分化する力を持っているがために、ちょっと油断するとシャーレの中で分化してしまう。未分化な状態を保つために様々な工夫がなされ、最近では便利な試薬が販売されるようになった。それでも毎朝、細胞の顔をみてご機嫌をうかがう必要がなくなったわけではない。また、マウスの3日目胚をとりだし、胚をできるだけ傷つけないようにES細胞と混ぜ合わせる手技、混ざり合った胚を擬妊娠させた仮親に戻

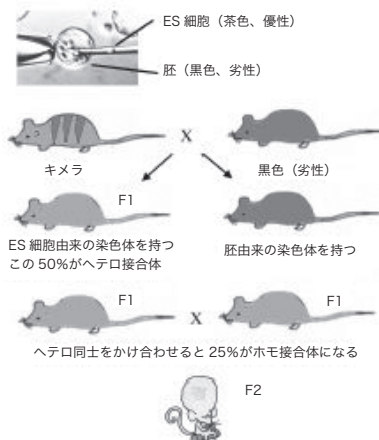


図4 ES細胞からキメラマウスを経て変異マウスまで
ES細胞は初期胚と混ぜると胚の細胞と一緒に様々な臓器に分化し、キメラマウスとなる。ES細胞と胚とでそれぞれ毛色の異なる系統のマウスを使うと、キメラ率の程度が分かって便利である。ES細胞が生殖細胞に分化すれば、キメラの子供（F1）は破壊した遺伝子のヘテロ接合体となる。これらをかけ合わせると、F2のうち25%がホモ接合体となり、表現型が現れることが期待される。

す手技も要求される。予定日にキメラが生まれなかったらどうするか、生まれたキメラがひ弱であったらどうするか、などなど、マウスを扱う手腕も必要である。最近はいずれもすべてを請け負う会社も現われてきた。お値段は残念ながら普通の大学の研究室にとってはちょっと高めである。

片や培養細胞を使って狙った遺伝子に望みの改変を施す方法ができあがってきた。片や培養細胞からマウスそのものを作る技術ができあがってきた。かつて四大文明がほぼ同時期に誕生したように、二つの技術が80年代半ばに時を同じくして完成した。この二つを結びつければ遺伝子改変マウスができるはずだと研究者が考えるようになったのも自然の流れである。こうして、遺伝子を改変されたES細胞からもマウスができるということが1987年、スミッシーズにより示され、これによってES細胞を使ったマウスの逆遺伝学的手法の基本が確立したのであった(図4)。

翌1988年に筆者はスミッシーズ博士の講演を聴く機会に恵まれた。共同研究者でもある夫人の前田のぶよ博士と供に会場に現われ、ES細胞での遺伝子破壊、生まれたマウスの様子など温厚な笑みを絶やさずに淡々と語られた。「ES細胞の培養は実はそれほど難しいものではないのですよ」とレセプションのときにこちらの矢継ぎ早やの質問に丁寧に答えていただいたことが忘れられない。同じ学会でエバンスの弟子である新進気鋭のアラン・ブラッドレーがベクターのデザインについて非常に詳細な報告をしていたことも印象に残っている。その後、筆者はテキサス州ヒューストンで何年かを過ごす事になるのだが、ブラッドレーはとなりの研究棟に研究室を構えており、毎週合同でミーティングをすることになった。ES細胞の染色体操作に関して斬新なアイデアを出し続け、今では母国イギリスのサンガー研究所の所長となり染色体生物学の世界的権威となっている。余談ではあるが、彼はサンダーバード3号を操縦するアラン・トレイシーにそっくりであり、彼の研究室のメンバーとはその話題で盛り上がったことがあるが、本人にその話をする機会がないまま

現在に至っている。

現在筆者は、スミッシーズ博士が研究室を持つノースカロライナ大学までは車で20分くらいのところにいる。スミッシーズ博士は80歳を越えるお年であるが、のぶよ夫人の主宰する研究室となりどうして、いまだに現役でばりばり仕事をされている。逆遺伝学の技術を高血圧に関連する遺伝子の機能解析に応用し、大きな成果を上げている。また、狙ったように遺伝子が改変されたかどうかの確認に、当時発表されたばかりのPCR(ポリメラーゼ鎖状反応)法をいち早く応用した一人がスミッシーズ博士であった。いまではPCRを行うコンパクトな機械が売り出されているが、博士は3台の水槽をポンプでつなぎ、温度の異なる水を一定時間で入れ替えるという装置を自作した。数年前に研究室を見学に行ったときにはまだこの機械が現役で動いており、小さな部屋一つを占領していた。市販の機械の方が時間がかからないのですがね、とはあるメンバーの言であったが。

5. いま、そしてこれから

これまで述べた手法は第一世代のジーンターゲティングともいえるものであり、マウスは受精したその瞬間から全ての細胞で、狙った遺伝子が改変された状態になっている。しかしながら、発生に重要な遺伝子を破壊した場合、それは致死となってしまう、誕生後にどのような働きをしているのかを知る事はできない。このような要請に応えるために90年代はさらに改良が加えられた。

第二世代の最初の突破口は配列特異的DNA組換え酵素の応用であった。Cre(クレ)という酵素はloxP(ロックスピー)とよばれる34塩基のあるDNA配列どうしを組換えることが知られていた。クレ酵素もロックスピー配列も高等動物には存在しない。そこで、狙った遺伝子を破壊するかわりに、その遺伝子の両側にロックスピー配列を一つずつターゲティングベクターを利用して導入する(図5)。

この時点ではまだ遺伝子の機能は正常なままで

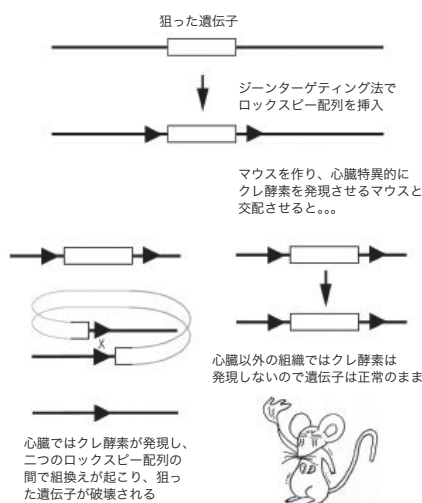


図5 クレ酵素とロックスビー配列を利用した組織特異的ジーンターゲティング

遺伝子の両側にジーンターゲティングを利用してロックスビー配列（横向きの三角形）を挿入する。こうして作ったマウスを心臓でのみクレ酵素を発現するトランスジェニックマウスとかけ合わせると、その子供では心臓でのみ遺伝子が破壊され、ほかの組織では正常のままである。

ある。そこへクレ酵素を発現させると、二つのロックスビー配列の間で組換えが起き、その間にある遺伝子が消えてしまう。クレ酵素をたとえば心臓特異的に働かせることができれば、心臓でのみ狙った遺伝子が破壊されたマウスをつくることができる。第一世代に比べてベクターの作成はやや複雑になる。しかしながら、すでにいろいろ異なる臓器にクレ酵素を発現するマウスが世界中でつくられ、お互いに利用できるようなシステムがあるので、一旦そういうマウスを作ってしまうと、さまざまなクレ酵素発現マウスと交配をするだけで、狙った遺伝子を好きな臓器で望んだように改変できることになる。

また、最近ではクレ酵素の活性を薬剤で調整する方法も開発された。すなわち、「好きな臓器で」に加えて、「好きなときに」狙った遺伝子を改変することができるようになったのである。同じ遺伝子でも、臓器が異なれば働きが異なる（こともある）ように、同じ臓器でも発生の段階が異なれば、あるいは子供のときと大人になってから働きが異なる場合もある。好きな臓器で好きなときに遺伝子を改変することにより、その遺伝子

の機能が立体的に理解できるようになったのである。

多くの先進的な技術がそうであるように、ここで述べてきた手法も様々な画期的な技術を派生させている。胚性幹細胞の再生医療への応用がその一つである。これはシャーレ内でES細胞を効率良く特定の組織へ分化させる因子を見つけてそれを治療に役立てようという流れと、より積極的に、そうやって分化させた細胞を臓器移植に使おうという流れに分けられる。後者が狭義での再生医療になるのであるが、この方法で問題になるのが移植片に対する拒否反応である。クローン羊ドリーの成功以来、自分のクローンを作っておけば必要な時に自分の臓器が、すなわち拒否反応を起こさない臓器が手に入るということで、巷では同巧のプロットの小説や映画が多く世に出た。要するに人工的に作り出した年齢の異なる一卵性双生児の片方から臓器を取ってくる、ということになる。倫理的にはお話の中で楽しむにとどめた方がよさそうな方法である。現在ヒトからES細胞を樹立するためには、胚まるごとを使う必要があるが、もし胚のごく一部の細胞のみからES細胞が作り出せるようになれば、受胎とその胎児由来のES細胞の樹立とが両立できることになる。ES細胞樹立のためにヒトの胚（国や価値観によってはヒトの胚は生きて歩き回っている人間と同じ存在になる）を破壊しなければならないという倫理的問題は回避できる。ところが将来臓器移植が必要になるかどうか分らない段階で、全ての胎児についてES細胞を用意しておく、というのは費用の点からは全く現実的ではない。それならば大人のヒトの細胞からなんとかしてES細胞を作り出せないか、という方向に発想が進むのも自然な流れである。四つの遺伝子を働かせれば、皮膚の細胞がES細胞としての性質を示すという山中伸弥博士の発見が世界中の注目を集めたのも耳新しいが、この発見も再生医療へ向けての大きな金字塔であるといえよう。