
総 説

DNPI ノックアウトマウスの作製

中西 祐子¹⁾, 山田祐一郎²⁾, 木戸 詔子¹⁾

Generation of DNPI knockout mouse

Yuko Nakanishi, Yuichiro Yamada and Shoko Kido

A gene-knockout mouse is a mouse in which a particular gene has been artificially destroyed and made dysfunctional. By analyzing symptoms which appear in the gene-knockout mouse's body, we are able to learn the essential function of the knocked-out gene *in vivo*. Utilizing a gene-knockout mouse, we can analyze the differences between the mouse and a normal mouse of their growth, activity, or abnormalities of their tissues including brains, livers, kidneys and bones. These information from analyzing of a gene-knockout mouse is quite important. For instance, unknown gene functions or connections between genes and diseases can be clarified.

Differentiation-associated Na⁺-dependent inorganic phosphate (Pi) cotransporter (DNPI) is protein that is reported to be associated with transdifferentiation of insulin-secreting cells and regulation of blood glucose levels. We tried to generate DNPI-knockout mouse. The analysis of this mouse clarifies the mechanism of DNPI and leads to development of future diabetes medical treatment. This review article explained the background of this study and generation of knockout mouse.

はじめに

近年、糖尿病有病者の数は急速に増加し、2002 年に行われた糖尿病実態調査では、わが国で「糖尿病が強く疑われる人（現在治療中の人を含む）」は約 740 万人、「糖尿病の可能性を否定できない人」を合わせると約 1,620 万人であり、前回の調査（1997 年）より著しい増加傾向を示していることが報告された¹⁾。その原因としては食習慣の欧米化、特に脂肪摂取量の増加と消費エネルギーの減少（運動不足）があげられる。わが国では 1 型糖尿病に比べ圧倒的に 2 型糖尿病が多い。2 型糖尿病の発症には遺伝素因と環境因子がともに重要な役割を演じ、インスリン分泌の低下とインスリン感受性の低下が種々の程度に組み合わさってインスリン作用不足が起こる。

日本人のインスリン分泌代償能は欧米人に比べて低く、高血糖状態に陥った際、早期からこの代償能が破綻してしまい、インスリン作用不足に陥って糖尿病を発症する。

隣ランゲルハンス島の β 細胞からインスリンが分泌されるメカニズムは、図 1 のように考えられている。血液中のブドウ糖は、糖輸送担体 (Glucose transporter 2: GLUT2) を通って β 細胞に取り込まれ、グルコキナーゼによるリン酸化を受けてグルコース 6 リン酸 (G-6-P) になる。G-6-P は解糖系で分解されてピルビン酸となり、さらに代謝を受けて ATP が産生される。ATP の濃度が上昇すると ATP 感受性カリウムチャネルが閉鎖され、細胞内のカリウムイオン濃度が上昇することによって細胞が脱分極を起こし、電位依存性カルシウムチャネルが活性化される。この結果、カルシウムイオンが細胞内に流入し、細胞内カルシウム濃度の上昇が引き金となってインスリンの分泌が起こる。このようなインスリン分泌のメカニズムをはじめ、血糖調節に関わる様々なタン

1) 京都女子大学家政学部食物栄養学科第一調理学研究室
2) 京都大学大学院医学研究科糖尿病・栄養内科学

パク質の機能はマウスなどのモデル動物を使った分子生物学的手法によって、次々に明らかにされてきた。しかし、まだ機能解析の行われていないものも数多く存在し、それらの解明が待ち望まれている。

今回、我々は、インスリン産生細胞への分化転換や血糖調節機構に関与するという報告のある Differentiation-associated Na^+ -dependent inorganic phosphate (Pi) cotransporter (DNPI) に注目し、この遺伝子を欠損させたノックアウトマウスの作製を計画した。このマウスを様々な角度から解析することによって、DNPI の機序を明らかにするとともに、今後の糖尿病治療の一端に貢献することを目的として研究に取り組んでいる。本総説では、この研究の背景やノックアウトマウスの作製方法を中心として以下に解説することにする。

1. ノックアウトマウス

ノックアウトマウスとは、遺伝子操作によってゲノム DNA のある特定の遺伝子領域を破壊し、全身の細胞においてその機能を喪失させたマウスのことであり、標的遺伝子欠損マウスとも呼ばれる。ゲノム DNA は生物の体を構築するタンパク質や酵素な

どの生命維持に必須のタンパク質を作るのに必要なすべての情報をもつ設計図に相当する。ヒトの体は約 60 兆個の細胞から構成されており、その一つ一つの核の中に同じゲノム DNA をもっている。それは、「受精卵」という一つの細胞が分裂を繰り返して生物の体を構成していることを考えれば容易に理解できる。しかし、どの細胞も同じゲノム DNA をもっているにも関わらず、体内には神経細胞や皮膚細胞といった、約 200 種類に及ぶ実に様々な細胞が存在する。これは、すべての細胞に関する情報が書かれているゲノム DNA の中で、例えば神経細胞なら神経細胞をつくるための遺伝子領域だけが、皮膚細胞なら皮膚細胞をつくるための遺伝子領域だけが利用されて、その遺伝子群にコードされているタンパク質が発現して神経細胞や皮膚細胞を形成しているからである。ノックアウトマウスの体内では破壊された遺伝子領域の情報をもとにして作られるはずのタンパク質のみが作り出されないか、または不完全なものとなる。すなわち、破壊された遺伝子領域が利用されるはずだった組織・臓器においてのみ異常が出現し、体の他の部分は遺伝子操作を行っていない野生型のマウスとなんら代わりがない。したがって、

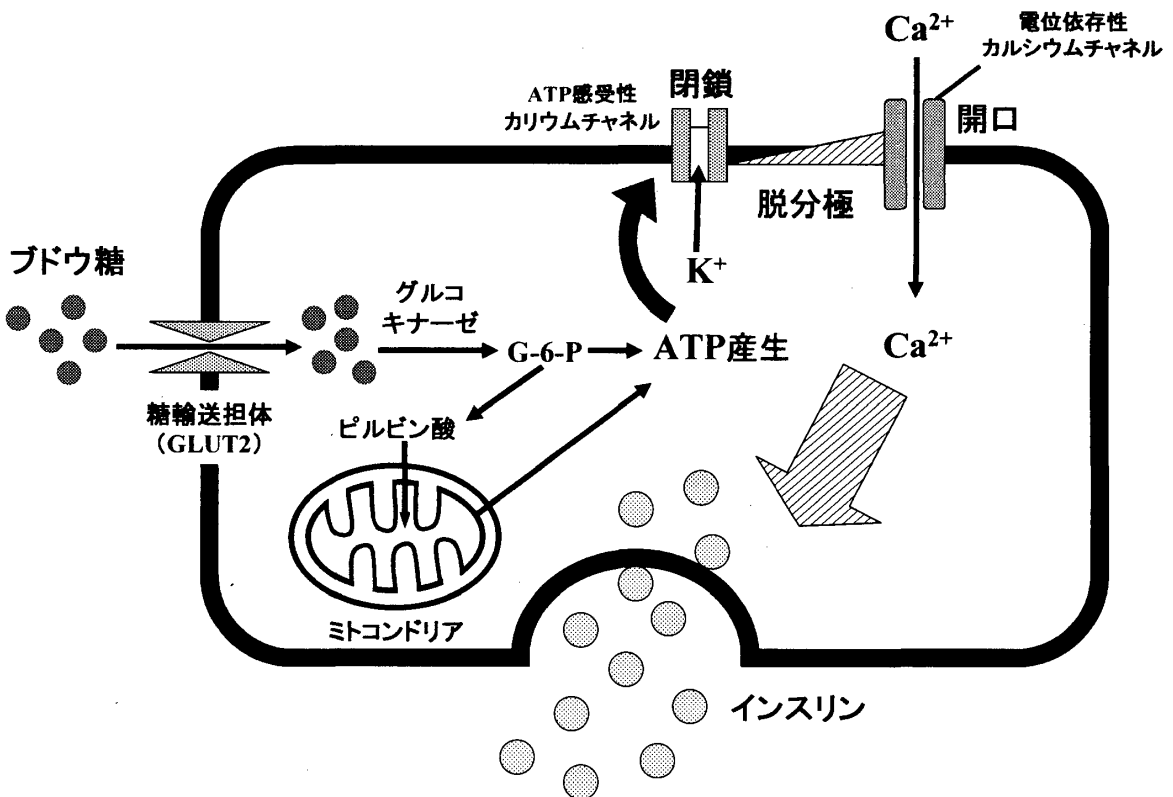


図1 膵臓ランゲルハンス島・β細胞からのインスリン分泌機構

ノックアウトマウスと野生型のマウスを比較することによって、破壊した遺伝子から作り出されるタンパク質がマウスの体内でどのような機能を果たしているかを推定することができる。

II. DNPI (VGLUT2) の発見と機能

1. インスリン産生細胞の分化に関与する無機リン酸トランスポーター (DNPI)

当初、DNPI の遺伝子は、膵臓の外分泌細胞に由来する細胞株 AR42J がアクチビン A とベータセルリンという物質の作用によってインスリン産生細胞に分化する過程で発現する未知の遺伝子として発見された²⁾。その後、この遺伝子が脳特異的なナトリウム依存性無機リン酸トランスポーター (Brain-specific Na⁺-dependent inorganic phosphate (Pi) cotransporter: BNPI) 遺伝子と高い相同性をもつことが判明し、実際にアフリカツメガエルの卵母細胞に DNPI の mRNA を発現させると、BNPI と同様に細胞膜上で細胞内外のナトリウムイオン濃度勾配に依存してナトリウムイオンと一緒に無機リン酸イオンを細胞内に輸送するトランスポーターとして機能することが明らかになった³⁾。これらのことから、インスリン

産生細胞の分化に関与するナトリウム依存性無機リン酸トランスポーターという意味で DNPI と名付けられた。

2. 小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) としての機能

2001 年になると、DNPI が BNPI と同様に中枢神経系のシナプス小胞でグルタミン酸のトランスポーターとして機能していることが明らかになった⁴⁾。また、DNPI 遺伝子の脳内での発現が、BNPI の発現している部位 (大脳皮質、海馬、小脳など) では見られず、それ以外の視床下部や視床などで多く見られ、BNPI と DNPI の発現は相補的であることも報告された⁴⁾。それゆえ、BNPI が VGLUT1 (小胞性グルタミン酸トランスポーター 1: Vesicular glutamate transporter 1) と呼ばれるようになっていたのに続き、DNPI は VGLUT2 と呼ばれるようになった。以後、DNPI (VGLUT2) に関する研究はグルタミン酸トランスポーターとしての機能を中心として行われるようになった。

図 2 は神経系でのグルタミン酸の化学伝達における小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) の役割を示したものである。グルタミン酸は哺乳類

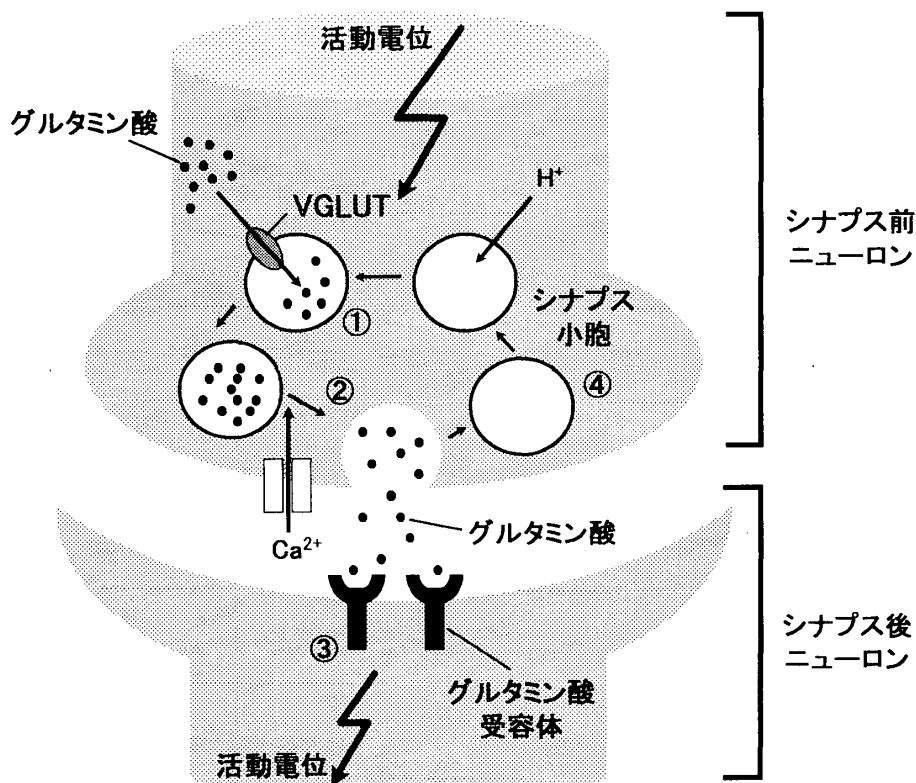


図 2 神経系でのグルタミン酸の化学伝達における小胞性グルタミン酸トランスポーター (VGLUT) の役割

の脳内に多量に存在し、記憶・思考・行動といった精神活動を支える興奮性の神経伝達物質である。神経終末において、グルタミン酸はVGLUTによってシナプス小胞へ輸送・濃縮され、神経終末に活動電位が到達すると、細胞質内のカルシウムイオン濃度の上昇に伴って、開口分泌により放出される。放出されたグルタミン酸は隣接した標的細胞表面に存在するグルタミン酸受容体に結合してシグナルを伝達する⁵⁾。最近では、このような中枢神経系だけでなく、内分泌細胞でもVGLUTがグルタミン酸トランスポーターとしての機能を果たしていることがわかってきた⁶⁾。さらに、松果体細胞のシナプス小胞様オルガネラ (Synaptic-like microvesicle: SLMV) と膵臓ランゲルハンス島の α 細胞 (グルカゴン分泌顆粒) およびF細胞 (膵ポリペプチド分泌顆粒) にVGLUT1 (BNPI) とVGLUT2 (DNPI) の両方が存在し、胃粘膜に存在するペプチドYY含有細胞の分泌顆粒や精子のアクロソームにVGLUT2が存在することも確認された⁷⁾。

3. ランゲルハンス島におけるVGLUT2 (DNPI) の機能

VGLUT2が内分泌細胞である膵臓の α 細胞に発現

していることは2001年に報告され⁶⁾、続いて2003年には α 細胞に発現したVGLUT2が、図3に示すようなグルタミン酸による血糖調節ホルモンの分泌制御に関与するというデータが報告された⁸⁾。この報告によると、 α 細胞のVGLUT2はグルカゴン分泌顆粒の膜上に局在し、ATPの加水分解エネルギーにより形成された膜電位 (内側正) を利用してグルタミン酸を分泌顆粒内に輸送・濃縮している。血糖の低下によって、グルタミン酸はグルカゴンとともに分泌され、分泌されたグルタミン酸は β 細胞表面に存在するグルタミン酸受容体に結合すると β 細胞を刺激し、シナプス様小胞 (SLMV) に蓄積されている γ -アミノ酪酸 (GABA) を放出させる。放出されたGABAは α 細胞表面のGABA受容体を介してグルカゴンとグルタミン酸の分泌を抑制する。したがって、ランゲルハンス島におけるVGLUTの発現は、グルタミン酸を介したグルカゴン分泌の抑制系に関与することで血糖調節に重要な役割を果たしていると考えられる。

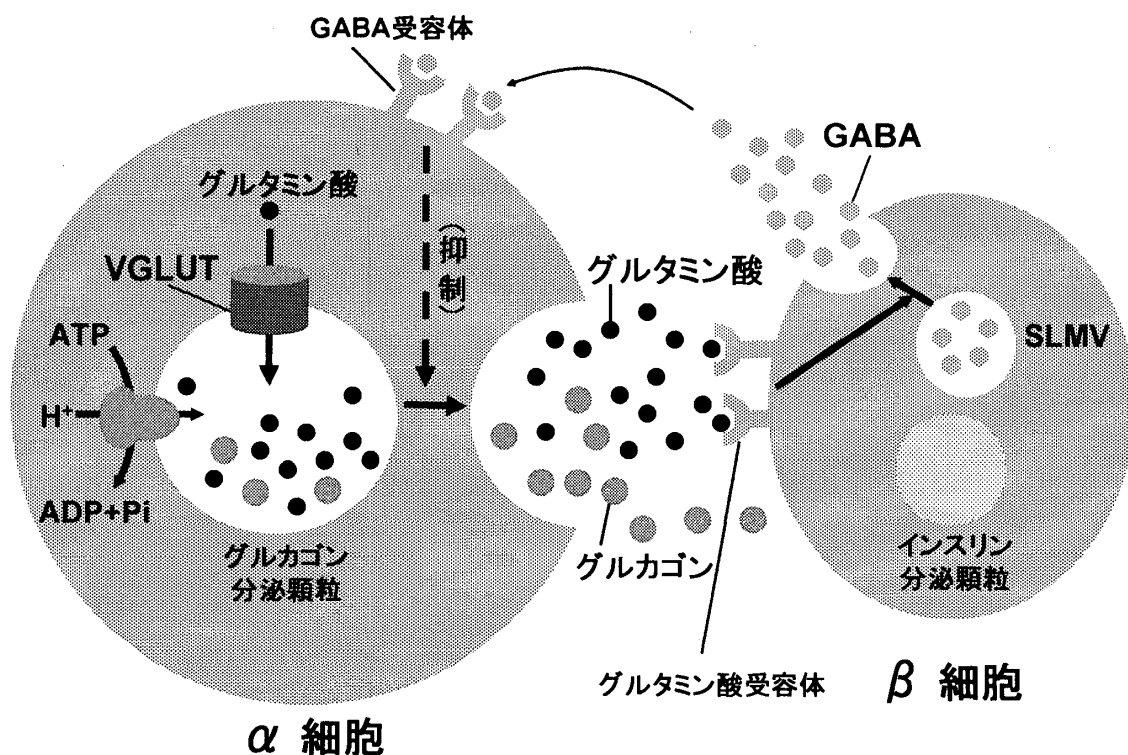


図3 膵臓ランゲルハンス島における小胞性グルタミン酸トランスポーターのグルカゴン分泌抑制機構
 VGLUT: 小胞性グルタミン酸トランスポーター (Vesicular glutamate transporter)
 SLMV: シナプス様小胞 (Synaptic-like microvesicle)
 GABA: γ -アミノ酪酸 (γ -amino butyric acid)

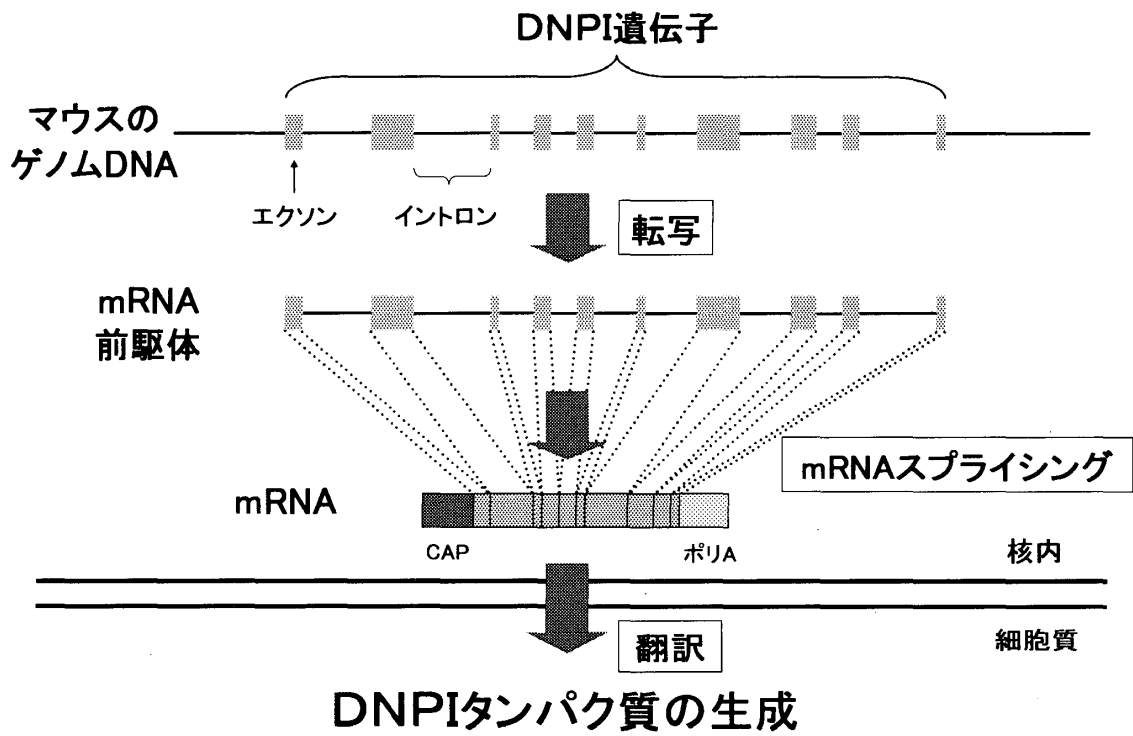


図 4-1 野生型マウスでの DNPI タンパク質の生成

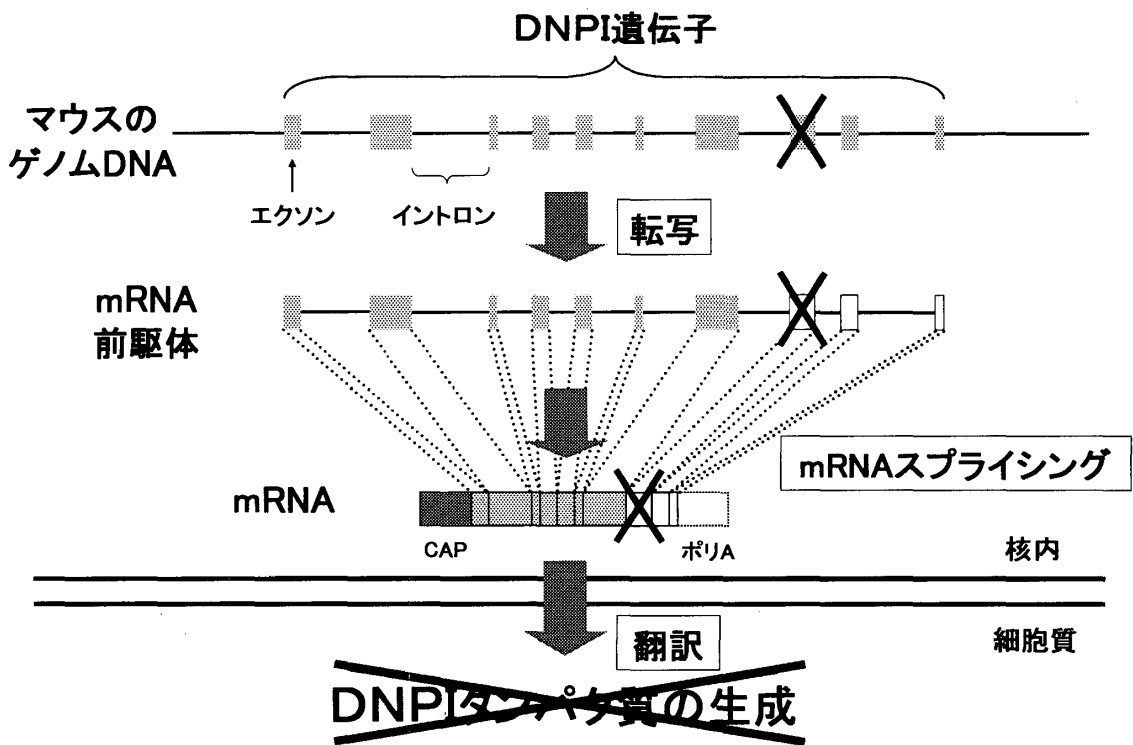


図 4-2 DNPI ノックアウトマウスでの DNPI タンパク質の生成

III. DNPI ノックアウトマウス作製の概要

1. DNPI 遺伝子のノックアウト

DNPI 遺伝子は、遺伝情報を含む 10 個のエクソンと遺伝情報を含まない 9 個のイントロンから構成されており、このゲノム DNA から mRNA が転写され、スプライシング、翻訳というステップを経て DNPI というタンパク質が作り出される (図 4-1)。DNPI のノックアウトマウスでは図 4-2 に示すように、この DNPI 遺伝子のエクソンの一部を破壊することによって DNPI タンパク質が作り出されなくなるか、不完全なものが作られて DNPI としての機能を失っていると考えられる。このような DNPI ノックアウトマウスを作製し、そのマウスの解析を行うことによって、① DNPI (VGLUT2) は膵臓の外分泌細胞がインスリン産生細胞へと分化する過程で発現するという報告から、DNPI が膵臓の内分泌細胞の発生や分化転換にどのように関わっているかということ、② 膵臓の α 細胞に発現する VGLUT2 (DNPI) が血糖調節にどのような役割を果たすかということを明らかにできると期待される。

2. ES 細胞 (胚性幹細胞: Embryonic stem cell)

ノックアウトマウス作製の手順を図 5 に示した。ノックアウトマウスの作製にはマウスの ES 細胞 (胚性幹細胞: Embryonic stem cell) が必要である。ES 細胞とは、マウス受精卵 3.5 日目の胚盤胞の内部細胞塊から単離・株化した未分化かつ多分化能を有する細胞のことである。図 6 に示したように、受精後 3.5 日目にあたる胚盤胞期の胚は外側に胎盤を形成する栄養芽細胞、内側に胎児本体を形成する内部細胞塊をもっている。この内部細胞塊は、肺や肝臓、心臓などの臓器から表皮、生殖巣に至るまで、あらゆる性質をもった細胞に分化することができる多分化能を有する細胞であり、この時点ではまだ最終的にどのような細胞になるかは決定されていない。この内部細胞塊を多分化能をもった状態で体外に取り出し株化したものが ES 細胞で、LIF (Leukocyte inhibitory factor) を添加して培養することによって未分化状態を保ちながら増殖させることができる。

3. DNA コンストラクトの作製

ノックアウトマウスを作製するには、上述の ES 細胞にコンストラクトを導入しなければならない。そのため、最初にコンストラクトを作製する。コンストラクトとは短い DNA の断片で、その塩基配列のほとんどは目的とする遺伝子と同じだが、ノックアウトしたい部分だけが他の遺伝子に置き換えてあ

るものである。図 7 に示すように、DNPI ノックアウトマウス作製のコンストラクトでは、目的とする DNPI 遺伝子をマウスゲノムライブラリーよりクローニングし、標的の遺伝子部位にあたる場所にネオマイシン耐性遺伝子を挿入してある。このネオマイシン耐性遺伝子と末尾に付けた単純ヘルペスウイルス (Herpes simplex virus: HSV) のチミジンキナーゼ遺伝子は、後述するように目的の遺伝子がノックアウトされているかどうかを確認するための目印となる。

4. エレクトロポレーション

このようにして作製したコンストラクトをエレクトロポレーション法によって ES 細胞に打ち込む。エレクトロポレーションでは、図 8 に示すようにキュベットにコンストラクトと ES 細胞の懸濁液を入れ、電気刺激を与えることによって、ES 細胞の細胞膜に小さな穴を開け、そこから溶液中のコンストラクトを細胞内に取り込ませる。

5. 相同組換え

細胞内に取り込まれたコンストラクトは、ES 細胞のゲノム DNA のうち、同じ塩基配列をもつ部分と対をつくり、ここで相同組換えが起こる。これまでノックアウトすることを「破壊する」と表現してきたが、正確には目的の遺伝子部分を全く別の遺伝子に「置き換える」ことでその遺伝子の機能を喪失させることであり、この際の方法が相同組換えである。相同組換えそのものは人為的なものではなく、減数分裂の際に自然に生じる現象である。コンストラクトと ES 細胞のゲノム DNA の間に相同組換えが起こると、ES 細胞にある DNPI 遺伝子の標的部分が欠落し、代わりにコンストラクト由来のネオマイシン耐性遺伝子が挿入される (図 9)。その結果、DNPI 遺伝子本来の機能は喪失し、その代わりに薬剤ネオマイシンに対して耐性をもった細胞となる。しかし、このような相同組換えは哺乳類など高等動物の細胞ではごく稀にしか起こらず、実際に導入されたコンストラクトのほとんどは場所を問わずランダムに挿入されてしまうため、エレクトロポレーションを行った細胞の中から本当に相同組換えが起こった ES 細胞だけを選び出すため、薬剤による選択を行う必要がある。

6. 薬剤選択

一般的に、相同組換えが起こった ES 細胞だけを選び出すマーカーとしてよく用いられるのは、ネオマイシン耐性遺伝子である。前述のように、我々もこの遺伝子をマーカーとして用いているため、エレクト

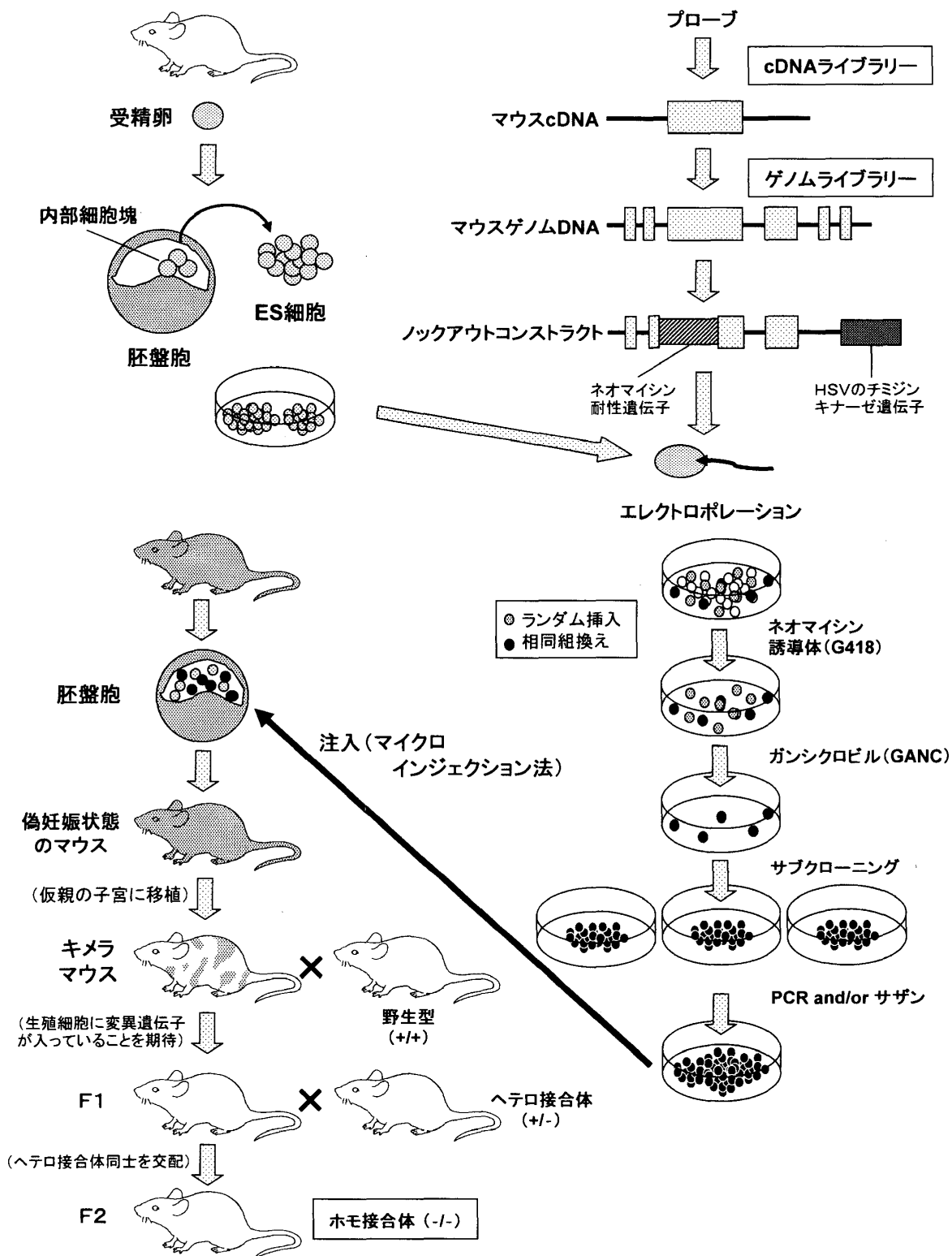


図5 ノックアウトマウスの作製過程

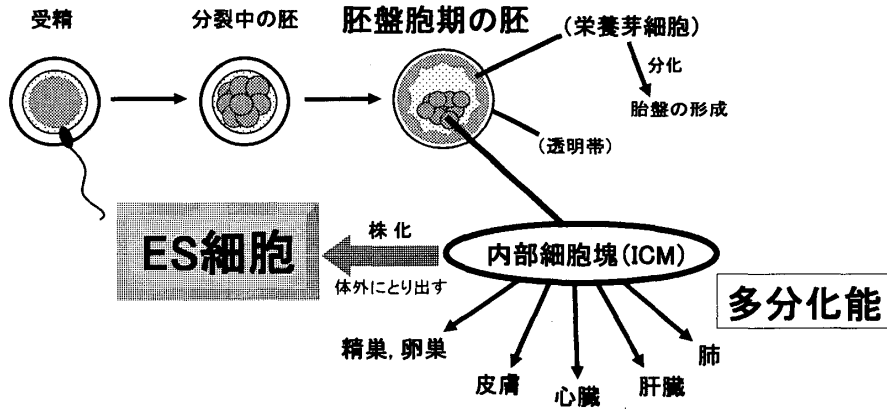


図 6 多分化能をもつマウス ES 細胞

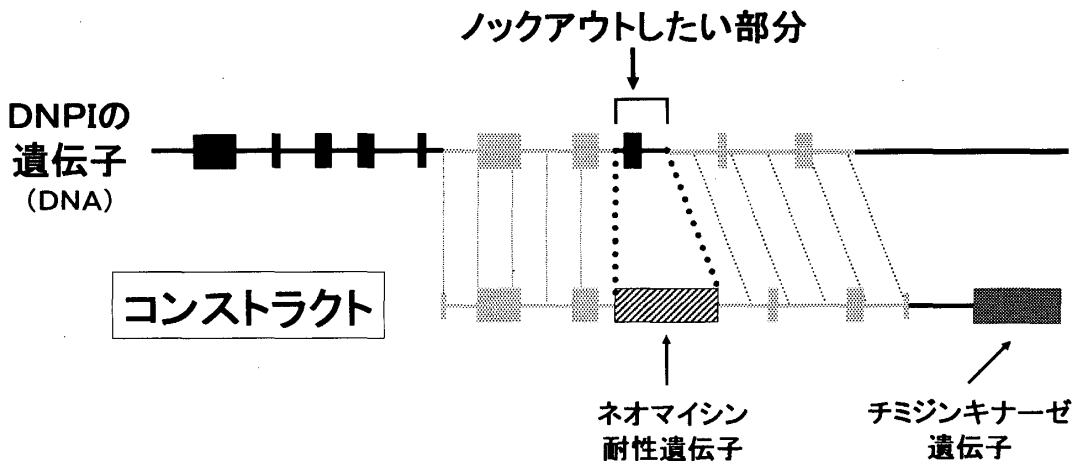


図 7 DNPI ノックアウトマウス作製のための構築物の構造
破線部分が相同遺伝子領域を示している。

トロボレーション後の ES 細胞は抗生物質ネオマイシンの誘導体 (G418) を添加した培地で培養した。この処置により、通常の ES 細胞は抗生物質によって死滅するが、相同組換えの起こった ES 細胞は、上記 III-5 で述べたようにネオマイシン耐性遺伝子を導入しているため生き残ることができる (positive selection)。また、ガンシクロビル (Ganciclovir: GANC) という薬剤を同時に添加することで、相同組換えが起こらず構築物全体が取り込まれてしまった ES 細胞などを除外することができる (negative selection)。これは、構築物の末尾に GANC と反応して細胞を死滅させてしまうチミジンキナーゼの遺伝子が挿入してあるからである。つまり、正しく相同組換えが起こった細胞では、ネオマイシン耐性遺伝子は入っているがチミジンキナーゼの遺伝

子は入らないので、細胞は GANC に反応することなく生存する。しかし、相同組換えが起こらず不適切な場所に構築物全体が取り込まれてしまった場合には、末尾のチミジンキナーゼの遺伝子も一緒に取り込まれてしまうため、GANC と反応して細胞は死滅してしまうのである (図 10)。negative selection によく用いられるマーカーとしては、我々の用いた単純ヘルペスウイルス (HSV) のチミジンキナーゼ遺伝子の他に、特別な薬剤を必要としないジフテリア毒素の A 鎖 (DT-A) などがある。

7. サザンプロット解析

理論的には、薬剤選択によって生き残るのは相同組換えが起こった ES 細胞のみであるが、最終的な確認は PCR 法やサザンプロット法により行われる。本実験で採用したサザンプロット法は、電気泳動の

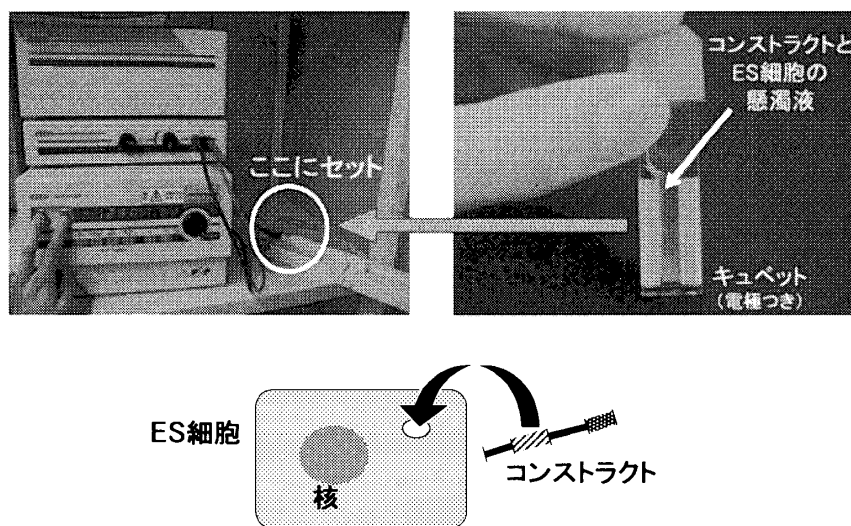


図 8 エレクトロポレーション
 右図のように専用の電極付きキューベットにコンストラクトと ES 細胞の懸濁液を入れ、左図のようにセットして通電する。これによって ES 細胞膜に穴があき、コンストラクトが細胞内に取り込まれる。

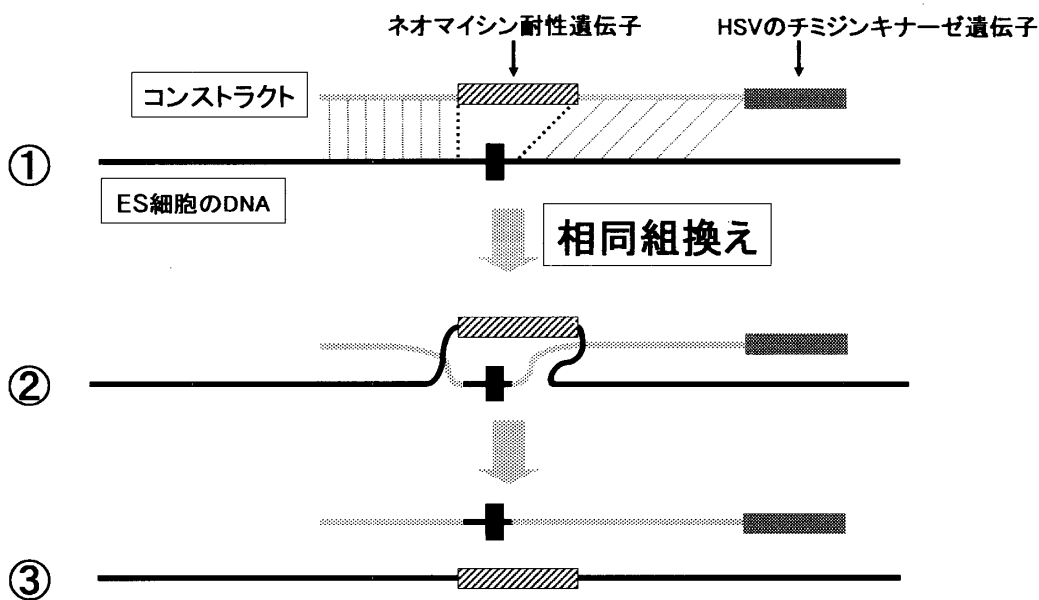


図 9 相同組換えの概略図
 ①エレクトロポレーションによって ES 細胞内に導入されたコンストラクトは核に移行し、ES 細胞の DNA の内、同じ塩基対をもつ部分と対をつくる。破線は相同遺伝子領域を示している。
 ②相同組換えが起こると、ES 細胞の DNA 上にある標的遺伝子とコンストラクトのネオマイシン耐性遺伝子が置き換えられる。
 ③相同組換えの起こった ES 細胞の DNA では、標的遺伝子の代わりにネオマイシン耐性遺伝子が挿入され、DNPI の遺伝子機能を喪失するかわりにネオマイシンに耐性をもつようになる。

高い分離能とハイブリダイゼーションの高感度検出を組み合わせて特異的に DNA を検出する方法である。薬剤選択によって生き残った ES 細胞から DNA

を抽出し、これと相同組換えの起こっていない野生型ゲノム DNA とを区別することができる制限酵素部位で酵素を使って処理する。相同組換体では、標

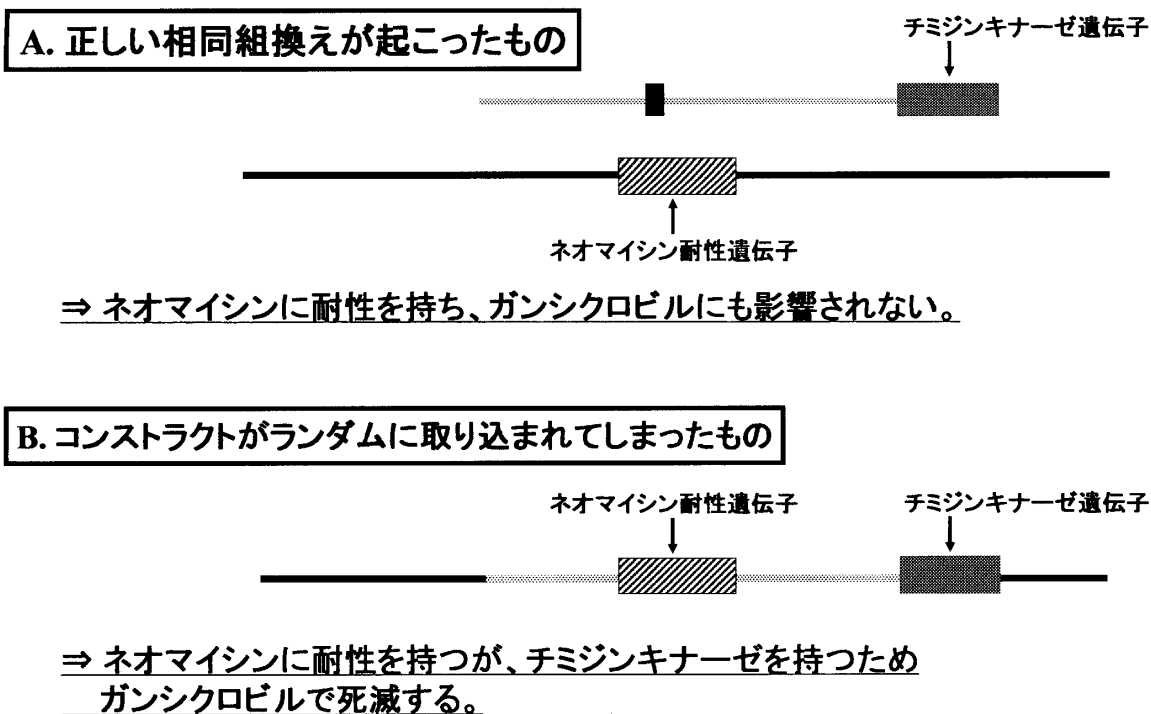


図 10 相同組換え遺伝子 (A) とランダム挿入された遺伝子 (B) の薬剤による選択

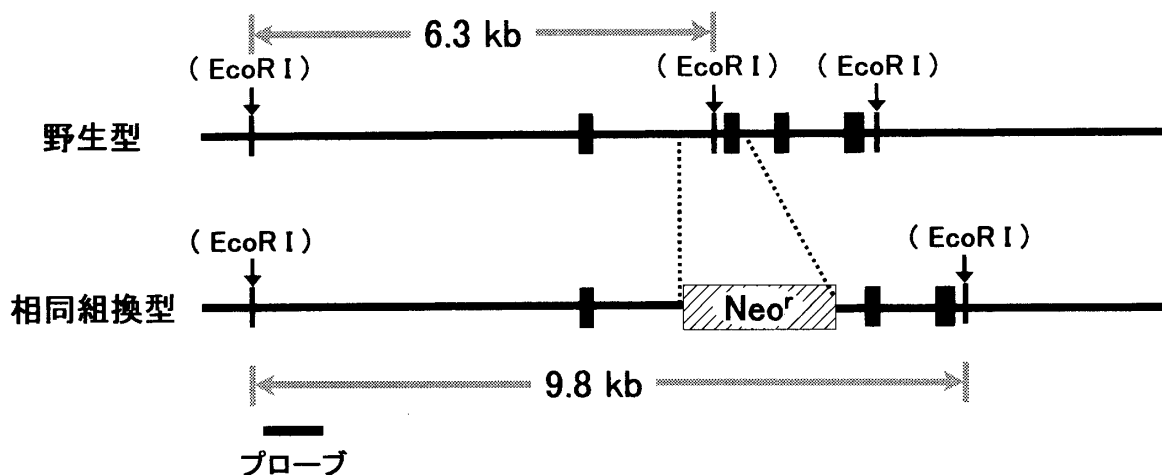


図 11 サザンブロット法による野生型と相同組換型ゲノム DNA の判別
野生型の標的遺伝子中には、矢印 (↓) で示した位置に制限酵素・EcoRI の認識部位が存在する。一方、ネオマイシン耐性遺伝子 (斜線で示す) の塩基配列中には EcoRI の認識部位が存在しない。EcoRI で DNA を処理し、あらかじめ設定したプローブとハイブリダイズさせてサザンブロット法で解析すると、野生型 DNA では 6.3 kb、相同組換えの起こった DNA では 9.8 kb に DNA フラグメントが検出される。

的遺伝子部分の代わりにネオマイシン耐性遺伝子が挿入されることにより、その部分の塩基配列がもとの配列と異なったものとなっている。したがって、図 11 に示すように、相同組換えの起こっていない野生型のゲノム DNA 中には制限酵素 (EcoRI) の認

識部位が存在するが、相同組換体のネオマイシン耐性遺伝子の塩基配列中には EcoRI 認識部位が存在しないため、これらを EcoRI で処理し、あらかじめ設定したプローブとハイブリダイズさせると、相同組換体と野生型ゲノム DNA のそれぞれに特異的な長

さの DNA フラグメントが検出され、相同組換えが起こったか否かを確認することができる。

8. キメラマウスからノックアウトマウスの誕生

サザンプロット解析による確認を行った後、相同組換えが起こった ES 細胞を胚盤胞の腔内にマイクロインジェクション法で注入し、これを偽妊娠状態にした仮親の子宮に戻す。生まれてくるマウスの 40～70%は、もとの胚盤胞由来の細胞と胚に注入した ES 細胞由来の細胞の両方が混在したキメラマウスになる (図 5)。この際、ES 細胞が白色マウス由来であれば、黒色マウス由来の胚盤胞を用いると、生まれてくるキメラマウスは ES 細胞由来の白い毛色と胚盤胞由来の黒い毛色が混在するため、体毛の色で容易に識別することが可能となる。次に、キメラマウスの生殖系列にも ES 細胞由来の細胞があることを期待して、このマウスと野生型マウスとの交配により交雑第一世代 (F1) を得る。ES 細胞由来 DNA の胚細胞への移行は F1 の毛色によって判定でき、その 50%が変異遺伝子を受け継いだヘテロ接合体 (ヘテロノックアウトマウス) であることが期待できる。さらに、ヘテロノックアウトマウス同士を交配すると 1/4 の確率でホモ接合体 (ホモノックアウトマウス) を得ることが期待できる (図 5)。

IV. ノックアウトマウスを用いた解析

こうして作製した DNPI ホモノックアウトマウスと遺伝子操作を行っていない野生型マウスを比較解析することによって、DNPI というタンパク質が生体内でどのような機能を果たしているかを推定することができる。しかし、DNPI の mRNA は胎生期から脳内に発現し、成熟マウスでは生命の維持に重要な脳幹に高発現していることがわかっており、作製したノックアウトマウスは胎生期のうちに死亡してしまう可能性もある。もし、DNPI ノックアウトマウスが胎生期に死亡してしまうような場合、胎児を用いて DNPI の胎生期における膵内分泌細胞発生への影響を免疫組織化学的に検討していきたい。無事にノックアウトマウスが生まれた場合には、耐糖能試験や膵ランゲルハンス島における細胞レベルでの検討を予定しており、DNPI (VGLUT2) の血糖調節機構への関与を解明していきたい。

V. おわりに

今回の DNPI ノックアウトマウスの作製では、これまで ES 細胞へのコンストラクトの打ち込みを、条件を変えて 3 回繰り返したが、サザンプロット解析の結果、いずれも相同組換えが起こっていないことが確認されている。その原因としては、ノックアウト部位の設定やコンストラクトの相同遺伝子領域の長さなど、様々な要素が考えられる。今のところ、ノックアウトマウスの解析によって DNPI の生理作用を明らかにするには至っていないが、今後の研究に期待したい。

VI. 謝 辞

本研究を行うにあたり、お世話になりました京都大学医学研究科糖尿病・栄養内科学、豊田健太郎先生をはじめ、教室員の皆様に心から感謝いたします。

VII. 引用文献

- 1) 厚生労働省健康局総務課生活習慣病対策室：平成 14 年糖尿病実態調査報告書 (2003)
- 2) H. Mashima, S. Yamada, T. Tajima, M. Seno, H. Yamada, J. Takeda and I. Kojima: *Diabetes*, **48**, 304–309 (1999)
- 3) Y. Aihara, H. Mashima, H. Onda, S. Hisano, H. Kasuya, T. Hori, S. Yamada, H. Tomura, Y. Yamada, I. Inoue, I. Kojima and J. Takada: *J. Neurochem.*, **74**, 2622–2625 (2000)
- 4) S. Takamori, J. S. Rhee, C. Rosenmund and R. Jahn: *J. Neurosci.*, **21**, RC182 (2001)
- 5) 高森茂雄, 森山芳則：蛋白質・核酸・酵素, **48**, 1816–1823 (2003)
- 6) M. Hayashi, M. Otsuka, R. Morimoto, S. Hirota, S. Yatsushiro, J. Takeda, A. Yamamoto and Y. Moriyama: *J. Biol. Chem.*, **276**, 43400–43406 (2001)
- 7) M. Hayashi, R. Morimoto, A. Yamamoto and Y. Moriyama: *J. Histochem. Cytochem.*, **51**, 1375–1390 (2003)
- 8) M. Hayashi, H. Yamada, S. Uehara, R. Morimoto, A. Muroyama, S. Yatsushiro, J. Takeda, A. Yamamoto and Y. Moriyama: *J. Biol. Chem.*, **278**, 1966–1974 (2003)