OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Greenfluorescent protein(GFP)のtransgenic miceにおける発現と応用
Author(s)	伊川, 正人
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3128980
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

氏名	伊川正人（いかわまさひと）
博士の専攻分野の名称	博士（薬学）
学位記番号	第 13079 号
学位授与年月日	平成9年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科環境生物薬学専攻
学位論文名	Green fluorescent protein（GFP）のtransgenic mice における発現とその応用
論文審査委員	（主査） 教授 田中 慶一 （副査） 教授 前田 正知　教授 溝口 正　教授 西原 力

論文内容の要旨

哺乳類細胞での遺伝子発現を観察するのによく用いられているレポーターには，バクテリア由来のchloramphenicol acetyltransferase（CAT）やbeta－galactosidase（beta－gal），ホタル由来のluciferase等がある。しかしこれらはいずれも酵素であるために，その検出には酵素を抽出したり細胞を固定する必要があるだけでなく，その後さらに基質を加える必要がある。そのため，生きたままの細胞で遺伝子発現を観察するのには不向きであった。一方，オワンクラゲ由来の蛋白質であるgreen fluorescent protein（GFP）はそれ自身が蛍光を発するので，生きたままの細胞で観察できる新規レポーターとしての可能性が示唆されていた。1992年にGFP cDNAクローンの塩基配列が報告され，1994年にレポーター遺伝子・マーカー蛋白としての有用性が示されたことにより，一躍GFP は脚光を浴びるようになった。特に目的とする蛋白質との融合蛋白として発現させることでその挙動を観察したり，細胞系譜を追跡するような実験には最適であり，すでに様々な生物種で利用されている。またGFP は非常に安定で殆ど退色しないことも大きなメリットであり，多くの分野での応用が期待されている。

しかし，これまでGFP を哺乳類個体レベルで発現させたという報告はなかった。そこで著者はGFP を発現するトランスジェニックマウスを作製し，GFP が哺乳類個体レベルでの観察にも適したレポーター遺伝子・マーカー蛋白であるかどうか，またその応用について検討した。

まず最初に著者は，GFP が哺乳類細胞においても機能することを示した。当初，哺乳類細胞でGFP を発現させることは難しくwtGFP を使う場合には培養温度を低く（25－33度）した方が蛍光を観察し易いことを報告した論文もあった。しかしGFP 発現用のベクターpCX－wtGFP を作り導入した哺乳類細胞では，通常の培養条件下（37度，5％CO_2）で非常に強い蛍光を発したことから，低温で培養することは必須でないと考えられた。

次にpCX －wtGFP 遺伝子を用いてGFP を発現するトランスジェニックマウスを世界に先駆けて作製した。それはまさにgreen fluorescent miceであったが，その発現には部位特異性が認められた。しかし，コントロールとして作製したCX－hCD 4マウスにおけるhCD 4の発現パターンとの比較からも，GFP の発現がプロモーターに依存していることは明らかであった。

遺伝子発現を定量化するのにCAT やluciferaseが汎用されているが，それらは酵素であるために酵素反応産物のRI活性や光量を測定し定量化することになる。しかし，CAT やluciferase自身は安定ではなく，また酵素反応という増幅過程のために測定誤差が大きいのが問題であった。一方，GFP は熱やpHの変化に強く非常に安定な蛋白である

ことが報告されている。トランスジェニックマウスを用いた実験では，GFP は蛍光強度を測定することで，増幅することなく定量化することができることを示した。GFP は100 ng protein／ml のような組織抽出物での検出も可能で，CAT assay に匹敵する感度を有することが示唆された。またFACS解析からは生きた細胞の一つ一つにおける発現量を計測することが可能であった。

著者は改変型GFPsについても個体レベルでの解析にも使えることを明らかにした。今後は必要に応じて異なるタイプのGFP を組み合わせた実験が可能であることを実証した。

このようにトランスジェニックマウスを作製することで，GFP および改変型GFP がマウス個体レベルでも遺伝子発現の部位や量を観察するレポーター遺伝子として有用なことが示されたが，GFP を使う最大の利点は生きた細胞で観察できることにある。

そこで著者は，融合蛋白を発現させる題材として精細胞を選び，GFP を生きた精子の先体に局在させることを試みた。acrEGFP トランスジェニックマウスでは，アクロシンのシグナルペプチドを持つEGFPが先体に局在することが確認され，緑色蛍光を指標とすることで先体反応の様子をリアルタイムで観察することが可能となった。このことはGFP が遺伝子発現のレポーターとしてだけでなく，蛋白の細胞内局在を観察するマーカーとしても有用なことを示した。

さらに著者は，目的の遺伝子とGFP を発現するDNA コンストラクトを同時に受精卵に注入することでダブルトランスジェニックマウスを作製し，その緑色蛍光をもとにトランスジェニックマウスを選別できることを示した。この結果はCX-GFPsがトランスジェニック動物作製のcoinjection markerとして利用できる可能性を示している。さらに緑色蛍光をもとに着床前の胚を選別することにより，トランスジェニックマウスだけを産ませることにも成功した。pCX-GFPsはマウス以外のトランスジェニック動物作製への応用が可能であると考えられ，妊娠期間が長く産仔数の少ない大型の動物（ウシやヤギ，ブタなど）に応用できる可能性を示した。

以上をまとめると，

1）GFP および改変型GFP が哺乳類個体レベルで遺伝子発現を観察するレポーターとして有用である。

2）GFP は細胞内局在マーカーとしても機能する。

3）CX-EGFPマウスは移植実験やキメラ解析の，Acr 2 EGFPマウスは受精を研究するモデルマウスとして有用である。

4）pCX-GFPsのトランスジェニックマウス動物作製のcoinjection markerとして有効である。

論文審査の結果の要旨

オワンクラゲ由来のGreen fluorescent protein （GFP）が哺乳類細胞においても機能することを示した。すなわちGFP を発現するトランスジェニックマウスを初めて作製することに成功し，GFP が哺乳類個体レベルでも遺伝子発現のレポーターやマーカーとしてきわめて有用であることを示した。また改変型GFP についても個体レベルで有用なことを認め，特に全身の細胞が緑色蛍光を発するCX－EGFPマウスは移植実験やキメラマウス作製のドナー・ホストとしても有用であることを示唆した。またこのマウスの子孫は煩雑な操作を行わずに極めて容易にトランスジェニックマウスかどうかの判定ができ，また着床前の初期胚の選別からトランスジェニックマウスのみを出産させることにも成功した。さらに，pCX－GFP がトランスジェニック動物作製のcoinjection マーカーになることや，GFP がタンパク質の細胞内局在を観察するマーカーにもなることなども明らかにした。

以上の成果はGFP のきわめて多様な有用性を明らかにした価値あるもので，博士の学位授与に値すると認められる。