OUKA
Osaka University 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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

Green fluorescent protein (GFP)の transgenic mice における発現と応用

伊川　正人

3079

Green fluorescent protein (GFP)の transgenic mice における発現と応用

伊川　正人

目次

第一編　緒　　論.....1

第二編　本　　論.....2
第一章　GFP のトランスジェニックマウスにおけるレポーターとしての有用性.....2
第一節　哺乳類細胞における GFP の発現.....2
第二節　GFP を発現するトランスジェニックマウスの作製.....3
第三節　トランスジェニックマウスにおける GFP の発現と観察.....4
第四節　小括.....7

第二章　改変型 GFP の比較と応用.....8
第一節　改変型 GFP を発現するトランスジェニックマウスの作製.....8
第二節　全身の細胞が緑色蛍光を発するトランスジェニックマウス.....11
第三節　小括.....12

第三章　GFP の細胞内局在マーカーとしての応用.....13
第一節　精子培養上清が精子受精能に及ぼす影響.....13
第二節　acrosin/EGFP 融合蛋白の精子先体の局在.....15
第三節　acrosin/EGFP の蛍光を指標とした精子先体反応の観察.....17
第四節　小括.....17

第四章　トランスジェニック動物作製の coinjection marker としての応用.....19
第一節　ダブルトランスジェニックマウスの作製.....19
第二節　トランスジェニックマウスの非侵襲的な判定.....20
第三節　トランスジェニック動物の着床前選別.....21
第四節　小括.....22

第三編　考　　察.....23

第四編　結　　論.....25

第五編　謝　　辞.....26

第六編　参考文献.....27

第一編　緒論

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[1,2]。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（**Fig. 1**）、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[3]。

GFP は 238 個のアミノ酸から成る 27kD のポリペプチドであり[4]、その内 65-67 番目のアミノ酸である Ser-Tyr-Gly が環状化した後、酸化されて *p*-hydroxybenzylidene-imidazolidinone という発色団を形成する[5]。さらにその発色団を１１枚の beta-sheet が取り囲む樽型構造をしていることがＸ線解析により明らかにされている[6]。GFP が機能するためにはこの高次構造の形成が必要であるが、そこには酸素の他には何ら基質や補因子を必要としないらしい。つまり GFP をトランスジーンとして導入して発現させれば、バクテリアから植物・哺乳類にいたるまで嫌気的条件下でないかぎり環状化がおこり、青色光を吸収し緑色光を放出するようになる。

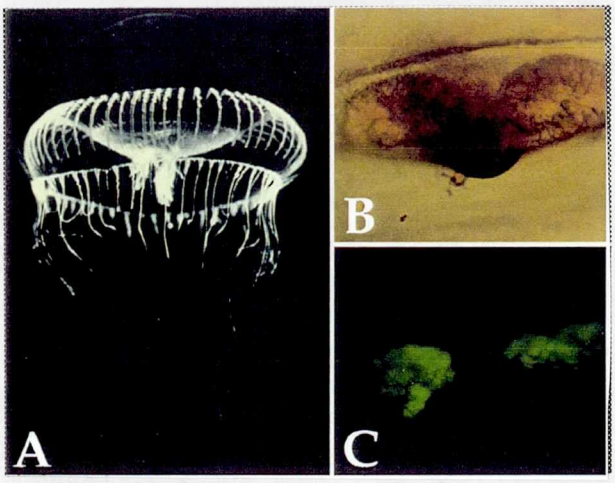

Figure 1 *Aequorea victoria*
A Pacific Northwest jellyfish, *Aequorea victoria* (A). *Aequorea* bioluminescence originates from a light organ called a photocyte, many of which are located in the circumoral nerve ring at the base of the cell (B and C). Photograph courtesy of Dr. C. Mills (A) and Dr. D. Prasher (B and C).

1992 年に GFP cDNA クローンの塩基配列が報告され[4]、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[7]、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[8,9]。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ているかどうか、また細胞内局在を観察したり、遺伝子導入動物を判定するマーカーとしての応用について検討した。

第二編　本論

第一章　GFPのトランスジェニックマウスにおけるレポーターとしての有用性

GFP を発現するトランスジェニックマウスを作製し、緑色蛍光を指標とした発現部位の特定や発現量の定量化、また GFP の毒性について解析することで、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であるかどうかを検討した。

第一節　哺乳類細胞における GFP の発現

まず最初に GFP を発現させるための導入遺伝子を構築し、培養細胞を用いて GFP が哺乳類細胞においても機能するか検討した。

実験方法

GFP 発現ベクターの調製

発現ベクターpCAGGS に wild-type (wt) GFP の cDNA を挿入し pCX-wtGFP（**Fig. 2**）を作製した。pCAGGS は普遍的な発現が期待される chicken cytoplasmic beta-actin promoter を元に宮崎らが改良したベクターで、強力な発現パターンを示す[10]。wtGFP の cDNA は primer-1 (5′-CCG GAA TTC GCC ACC **ATG** AGT AAA GGA GAA GA-3′), primer-2 (5′-CCG GAA TTC ATT ATT TGT ATA GTT CAT CC-3′)を用いて PCR により増幅したもので翻訳開始点(**ATG**)の上流に Kozak 配列(GCC ACC)[11]を挿入してある。

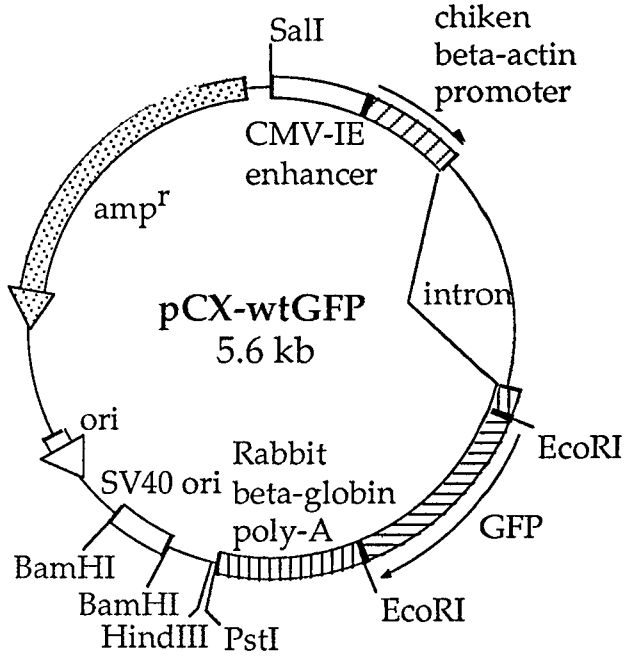

Figure 2　Construction of pCX-GFP　We introduced the Kozak sequence into the cDNA of GFP and inserted it into the pCAGGS expression vector to make pCX-GFP.　The pCAGGS expression vector possesses chicken beta-actin promoter and cytomegalovirus enhancer (CMV-IE enhancer).

培養細胞への遺伝子導入

pCX-wtGFP (20 μg)をエレクトロポレーション（Bio Rad, 4 mm cuvette, 1.0 x 10^7 cells/ml x 0.8 ml, 300V, 960μF,）により哺乳類の培養細胞（CHO, L929, NIH3T3, PC12）に導入した。

緑色蛍光の観察

エレクトロポレーション後、細胞を 10% Fetal Calf Serum (FCS; Bio sreum)を含む Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; GIBCO BRL) 中、37 度 5%CO_2で培養した。７２時間後に蛍光顕微鏡下、V 励起（BP405 nm for excitation, LP495 nm for emmison）により観察した。

実験結果

pCX-wtGFP を導入したいずれの培養細胞も青色の励起光で緑色蛍光を発した。このことは GFP が哺乳類細胞においても機能することを示している。

第二節　GFP を発現するトランスジェニックマウスの作製

次に個体レベルでの有用性について検討するため、GFP を発現するように pCX-wtGFP を導入したトランスジェニックマウスを作製した。

実験方法

導入遺伝子の調製[12]

pCX-wtGFP を制限酵素 SalI と BamHI により消化した後、0.8%アガロース電気泳動した。3.2 kb, 2.1 kb, 0.3 kb のバンドに別れていることを確認し、3.2 kb のフラグメントを回収した。QIAEX (QIAGEN)によりアガロースを取り除き、さらにフェノール・クロロホルム抽出 3 回、エタノール沈殿により精製した。得られた DNA フラグメントを $T_{10}E_{0.1}$ (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.1mM EDTA pH 7.5)に溶解し(1.6 ng/μl)、注入 DNA 溶液とした。

トランスジェニックマウスの作製[12]

8 週令の B6C3F1 雌(静岡実験動物; SLC)を equine chorionic gonadotropin (eCG; TEIKOKU ZOUKI, 5 unit/mouse)、human chorionic gonadotropin (hCG; TEIKOKU ZOUKI, 5 unit/mouse)により過排卵処理し、B6C3F1 雄と交配した。得られた受精卵の雄性前核に DNA 溶液を注入し、擬妊娠雌マウス（ICR）の輸卵管へ移植した。約 3 週間後に生まれたファウンダー（F0）マウスから DNA を抽出し、PCR によりトランスジェニックマウスかどうかを判定した。得られたトランスジェニックマウス（正式名称は TgN(act-GFP)Osb transgenic mice であるが以下 CX-wtGFP マウスと略す）は B6C3F1 マウスと交配し以下の実験にはすべて F1 マウスを供した。コントロールとしてヒト CD4[13] を pCAGGS ベクターに挿入したコンストラクトからもトランスジェニックマウス(正式名称は TgN(act-hCD4)Osb transgenic mice であるが以下 CX-hCD4 マウスと略す）を作製した。

GFP の毒性について調べるため、CX-wtGFP マウスの各種臓器をブアン固定後[14]、薄切片を作成し観察した。

交配実験

ファウンダーの子供である F1 マウスはトランスジーンを一方の染色体にのみ取り込んでおり（ヘミザイガストランスジェニックマウス）、野生型のマウスと交配した場合にはメンデルの法則に従って約１：１の割合でトランスジーンが子孫に伝わるはずである。そこで GFP の発現が妊孕性や発生能に及ぼす影響を調べるため、F1 マウスと野生型のマウスを交配し、子孫の遺伝子型・表現型を検討した。

実験結果

CX-wtGFP マウスは哺乳類の個体レベルで GFP を発現させた最初の例であるが、GFP はトランスジェニックマウスの作製成績に悪影響を与えなかった（**Table 1**）。また得られた 3 ライン（TG02, TG10, TG14）のすべてが GFP を発現した(それぞれ、約 2, 5, 50 コピーの遺伝子が取り込まれていた)が、これらのトランスジェニックマウスは緑色蛍光を発する点を除いて野生型マウスと区別がつかず、GFP に毒性は認められなかった。組織切片の観察でも異常は認められなかった。

Table 1　Production frequency of CX-wtGFP mice

construct	no. of eggs injected	no. of mice born	no. of transgenic
CX-wtGFP	166	16 (9.6%)	3 (1.8%)
CX-hCD4	172	14 (8.1%)	2 (1.2%)

ヘミザイガストランスジェニックマウスと野生型マウスを交配した結果、GFP を発現するマウスも野生型と変わらない妊孕性を示した。さらにトランスジーンの子孫への伝達率はメンデルの法則に従っており影響はなかった（**Table 2**）。

Table 2　Transgene transmission frequency in CX-wtGFP mice

	no. of F_2 mice		
line	transgenic	wild-type	total
CX-wtGFP02	6	7	13
CX-wtGFP10	23	27	50
CX-wtGFP14	19	16	35
	48 (49.0%)	50 (51.0%)	98

第三節　トランスジェニックマウスにおける GFP の発現と観察

CX-wtGFP マウスの細胞において発現している GFP が機能しているかどうかを調べるため、**(I)** 生きた組織での観察、**(II)** 各種固定法の検討、**(III)** 発現の定量化を試みた。

(I) 生きた組織での緑色蛍光の観察

実験方法

生きた組織での観察

6 週令の CX-wtGFP マウスと同腹の野生型マウスの個体から、各種組織を切り取り、その一部を何の前処理もなく蛍光顕微鏡下（V 励起；BP405 nm for excitation, LP495 nm for emmison）で観察した。

間接蛍光抗体法による組織染色[14]

6 週令の CX-hCD4 マウスと同腹の野生型マウスの各種組織を TISSUE-TEK O.C.T. compound (MILES)に包埋し、凍結切片を作製した。マウス anti-hCD4 抗体[15] と FITC ラベルした anti-mouse IgG (Cappel)を用いて切片を免疫染色し、蛍光顕微鏡下（B 励起；BP490 nm for excitation, BP510 nm for emmison）に観察した。

実験結果

各種組織で緑色蛍光が認められたが、特に筋肉・膵臓が強い蛍光を発した（**Fig. 3 A, B**）。腎臓では糸球体に局在する発現を観察しており、微視的観察にも適したマーカーであることを確認した(**Fig. 3 C**)。同じ pCAGGS ベクターの制御下にヒト CD4 を発現する CX-hCD4 マウスにおける hCD4 の発現パターンとの比較では、それぞれのマウスで GFP, hCD4 共に同じ組織に発現しており、腎臓では糸球体に局在するなど同一組織内における発現部位に至るまで差はみられなかった（**Fig. 3 C, D**）。

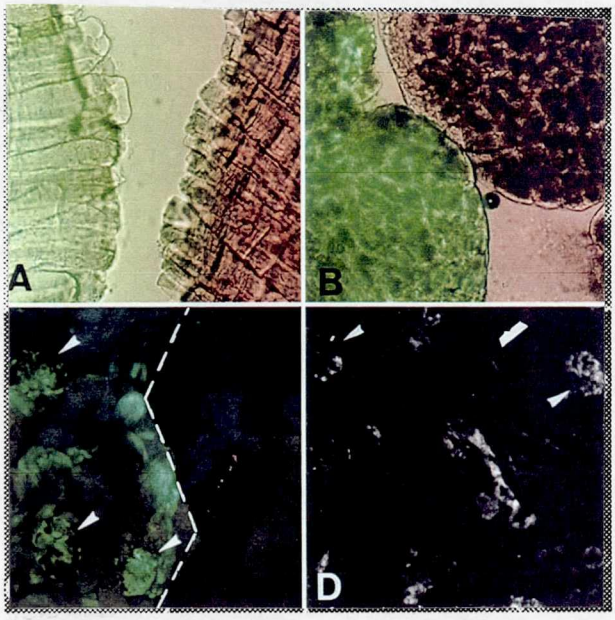

Figure 3 Expression of GFP in various tissues
Part of the muscle (A), pancreas (B), and kidney (C) from CX-wtGFP mouse and non-transgenic litter mates was pinched out and were photographed under a fluorescent microscope with V excitation. Dotted lines separate the organs of the transgenic mouse and non-transgenic litter mate. In kidney, the expression was localized in glomeruli (see arrow heads). The frozen section of kidney from CX-hCD4 mouse, stained with FITC-anti-hCD4, also showed a localized expression in glomeruli (arrow heads) (D).

(II) 各種固定法の検討

実験方法

各種固定法(エタノール・メタノール・アセトン・ブアン・パラホルムアルデヒド)により CX-wtGFP マウスの組織を固定した後、薄切片を作成し観察することで GFP に適した固定方法を検討した[14] 。

実験結果

ブアン固定では組織の自家蛍光が強くなるため、GFP の蛍光が観察されなかった。エタノール・メタノール・アセトン処理では GFP の蛍光が失われることはないものの殆ど組織切片上に固定されなかった。固定には 4%パラホルムアルデヒド-PBS が適しており、組織レベルでの固定には潅流がより効果的であることを確認した。

(III) 発現の定量化

実験方法

組織上清サンプルの調製

6週令のCX-wtGFPマウスと同腹の野生型マウスの組織を切り取り、１０倍容量のPBSを添加した。次いでハンディ型ホモジナイザー(Phscotron)を用いてホモジナイズ(１０秒間に3往復 x 3回)した後に遠心（4°C, 15000 g, 10 min）し、その上清をサンプルとした。

蛋白濃度の測定

得られた上清（約15 mg protein/ml）をPBSで適当倍希釈し、Protein assay kit（Bio Rad）を用いて蛋白濃度を測定した。

蛍光強度の測定

得られた上清（約15 mg protein/ml）をPBSで適当倍希釈し、蛍光強度計RF5000 (島津製作所)を用いて蛍光強度を測定した（励起波長400±5 nm、測定波長509±10 nm）。

実験結果

各組織におけるGFPの発現を定量化することに成功した（**Fig. 4**）。筋肉や膵臓組織では、上清を100000倍希釈した後も（約100 ng protein/ml）緑色蛍光を検出することが可能であり、微量な遺伝子発現を検出するのに十分な感度を有していた。

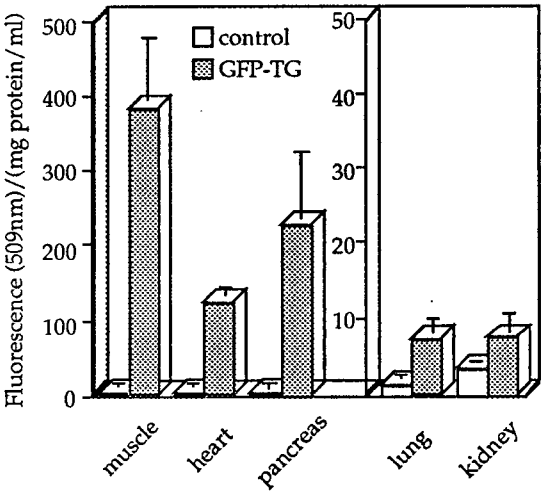

Figure 4 Fluorescence in the supernatants of various organs Homogenization supernatants from various organs were measured for fluorescence. The figure represents the intensities of fluorescence divided by protein concentrations (mean ± s.d. of fluorescence derived from 3 GFP-TG10 mice).

第四節　小括

以上の結果から、GFP が哺乳類細胞においても機能すること、さらに個体レベルでの観察にも適していることが示された。さらに GFP を発現することによる毒性は認められなかった。

全身での発現を期待して pCAGGS ベクターを用いてトランスジェニックマウスを作製したが[16]、CX-wtGFP マウスのすべての臓器が蛍光を発したわけではなかった。しかし、コントロールとして作製した CX-hCD4 マウスにおける hCD4 の発現パターンと差はみられず、GFP の発現がプロモーターに依存していることが確認された。また、得られた 3 ラインのすべてで導入遺伝子のコピー数の多少に関わらず GFP の発現が観察された。今回データは示していないが、1 コピーからの発現でも個体レベルで検出することが可能であった。

遺伝子発現のレポーターとして汎用されている CAT や luciferase は酵素であるため、酵素反応産物の RI 活性や光量を測定し、その発現量として定量化することができる[1,2]。しかし、これらの蛋白は安定ではなく、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。一方、GFP の量はその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ただけでなく、微量の遺伝子発現を検出するのに十分な感度を有していた。

以上のことから、GFP がトランスジェニックマウスにおける遺伝子発現の部位や量を観察するレポーターとして有用なことが示唆された。

第二章　改変型GFPの比較と応用

wtGFPは極大励起波長：λ ex=395nmが紫外領域にあるため、FITC用のフィルターを使用した蛍光顕微鏡観察やFACS解析に適していない（FACSでは通常、488nmのレーザー光を用いる）。そこでこれらの点を解決するだけでなく、より効率よく発光するGFPの開発が行われてきた[17-20]（Table 3）。具体的には遺伝子工学的手法により、wtGFP中のアミノ酸をランダムに置換し改変型GFPをスクリーニングするという方法であり、励起・発光波長がシフトしたものや、蛍光強度が改善されたものなどが得られている。最近ではcodon usage（各アミノ酸に対するコドンの使用傾向）を各生物種に適したものに変更する試みがなされており、出来てくるGFPのアミノ酸配列は全く同じでもmRNAの安定性や翻訳効率が改善されることで、細胞の蛍光強度が3-4倍に上昇することが確認されている[20-22]。

Table 3　　Properties of GFP mutants

variant	mutations	lex (nm)	lem (nm)	intensity	codon optimized
wt-GFP	none	395 (470)	509	x 1	no
RSGFP	F64M, S65G, Q69L	490	505	x 4-6	no
S65T	S65T	489	511	x 4-6	no
P4	Y66H	382	448	n. d.	no
cycle3	F99S, M153T, V163A	395	509	x 18	yes*
GFPmut1	F64L, S65T	488	507	x 35	no
EGFP	F64L, S65T	488	507	x 35	yes**

*Five rarely used Arginine codons from the wtGFP gene have been replaced by codons preferred in *E. coli*.
**EGFP contains >190 silent mutations that correspond to human codon-usage preferences.

第一節　改変型GFPを発現するトランスジェニックマウスの作製

著者は励起波長が長波長側にシフトしたRSGFP[19]と、励起波長が長波長側にシフトしただけでなくさらに哺乳類での発現に適するようcodon usageを変換したEGFP[22,23]を発現するための発現ベクター（pCX-RSGFP, pCX-EGFP）を調製した。それらをもとにトランスジェニックマウスを作製し、改変型GFPsが個体レベルで機能するかどうか、またその有用性について検討した。

実験方法

RSGFP, EGFP 発現ベクターの調製

RSGFP の変異部分を含む NcoI-Csp45I フラグメントを pCX-wtGFP の同じ部分と入れ替えたものを pCX-RSGFP とした。EGFP の cDNA は primer-3 (5′-TTG AAT TCG CCA CCA TGG TGA GC-3′), primer-4 (5′-TTG AAT TCT TAC TTG TAC AGC TCG TCC-3′)を用いて PCR により増幅した後、pCAGGS の EcoRI サイトに挿入し pCX-EGFP とした。pCX-RSGFP, pCX-EGFP ともに pCX-wtGFP と同じく翻訳開始点（**ATG**）の上流に Kozak 配列（GCC ACC）[11]を挿入してある。

トランスジェニックマウスの作製

pCX-RSGFP, pCX-EGFP を用いて第一章・第二節の方法に従い DNA 溶液を調製し、トランスジェニックマウスを作製した（正式名称は TgN(act-RSGFP)Osb および TgN(act-EGFP)Osb transgenic mice であるが以下 CX-RSGFP, CX-EGFP マウスと略す）。

改変型 GFP の発現と観察

第一章・第三節 **(I)** の方法に従い CX-RSGFP, CX-EGFP マウスの各組織・細胞について緑色蛍光を観察した。

wtGFP と改変型 GFP の励起波長の比較

第一章・第二節の方法に従い過排卵処理した野生型、CX-wtGFP、CX-RSGFP マウスの雌と B6C3F1 の雄を交配し、受精卵（２細胞期胚）を調製した。それらの卵子を混合し蛍光顕微鏡下、異なる励起波長（V 励起および B 励起）を当てて観察した。

Fluorescein activated cell sorter (FACS)による解析

６週令の野生型および CX-EGFP マウスの胸腺・脾臓・精巣から PBS を用いて細胞懸濁液(約 10^6 cell/ml)を調製し、さらに死細胞の核だけを赤く染色する propidium iodide (PI; Sigma, final 100ng/ml) を加えた。FACS により生細胞画分だけについて、その緑色蛍光を測定した。

実験結果

CX-wtGFP マウスの細胞がＵＶ励起により蛍光を発するのに対し、CX-RSGFP, CX-EGFP マウスの細胞は B 励起により蛍光を発することを確認した。２細胞期胚を用いた実験では、異なる励起波長で卵子が緑色蛍光を発することが確認された（**Fig. 5**）。また、CX-EGFP マウスから調製した細胞は野性型マウスから調製した細胞に比べ非常に強い蛍光(10^2-10^3倍)を発しており、FACS 解析に適していることが明らかであった（**Fig. 6**）。

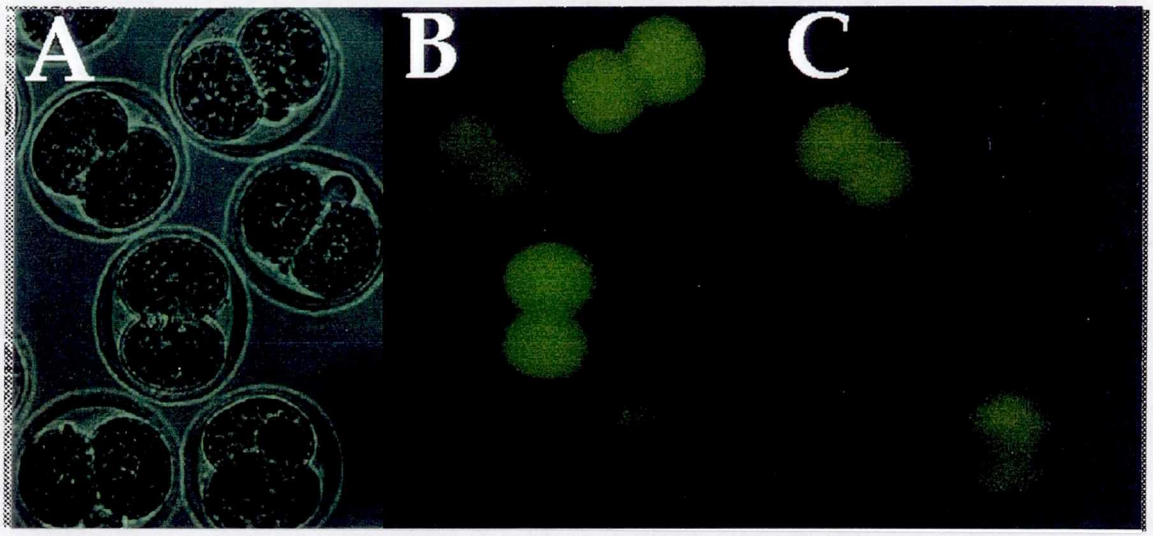

Figure 5 **wtGFP and RSGFP expression in 2-cell eggs from trasngenic mice**
The mixture of 2-cell eggs from wild-type, CX-RSGFP, and CX-EGFP mice were excited with UV-light (B) or B-light (C). (A) bright field.

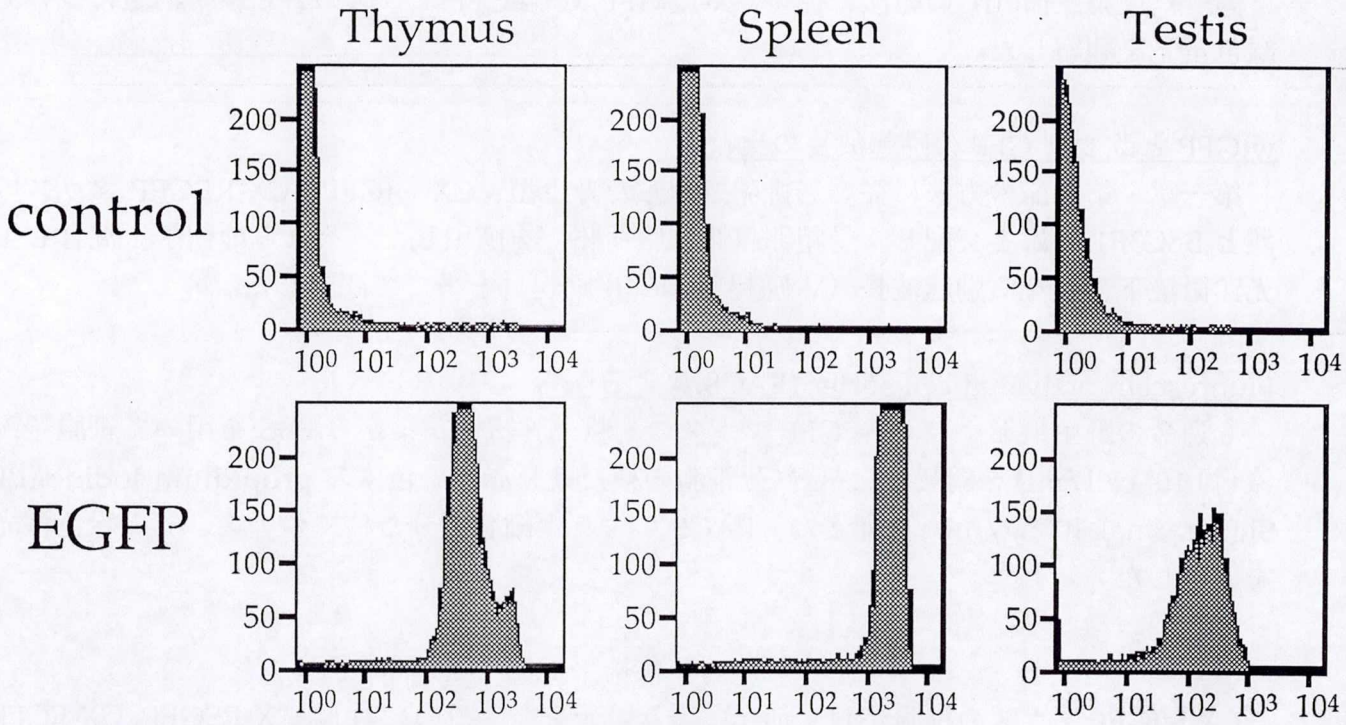

Figure 6 **FACS analysis of the cells from CX-EGFP transgenic mice**
Because the excitation optimum for EGFP is close to 488 nm, cells from the CX-EGFP mice were also suitable for analysis by flow cytometry. The green fluorescence from thymus, spleen and testicular cells was measured by a cell sorter.

第二節　全身の細胞が緑色蛍光を発するトランスジェニックマウス

前節の結果から、改変型 GFP も個体レベルで機能することが示唆された。ところで EGFP は哺乳類細胞に適した codon usage に変換してあり[21,22]、発現のし易さに変化が現れる可能性がある。そこで wtGFP マウスと改変型 GFPs マウスにおける発現パターンに違いが生じるかどうかを調べた。

実験方法

wtGFP の発現と改変型 GFP の発現の比較

第一章・第三節 **(I)** の方法に従い、6 週令の野生型・CX-wtGFP, CX-RSGFP, CX-EGFP マウスから各種臓器サンプルを調製した。精子は精巣上体にハサミで切り口を付けた後 TYH メディウム中に沈め、泳ぎあがってくる精子を含む上清を 5 分後に回収した。卵子は第二章・第二節と同様にして調製した。観察は、蛍光顕微鏡下（B 励起）で行い蛍光強度を比較した。

実験結果

Table 4 に示すように、RSGFP を用いた場合には各組織での蛍光が強くなるだけでなく、CX-wtGFP マウスでは発現の認められなかった胸腺や脾臓といった組織で緑色蛍光が認められラインがいくつか得られた。さらに CX-EGFP マウスでは、**Table 4** および **Fig. 7** に示すように殆ど全身の細胞が非常に強い蛍光を発していることが明らかであった。

Table 4　GFP expression in transgenic mice

tissues	CX-wtGFP	CX-RSGFP	CX-EGFP
brain	-	-	++
thymus	-	+, -	++
heart	++	+++	++++
lung	+	+	++
liver	±	±	++
pancreas	++	+++	++++
spleen	-	+, -	++
kidney	+	+	+++
muscle	++	+++	++++
sperm	-	-	+
egg	+	++	+++

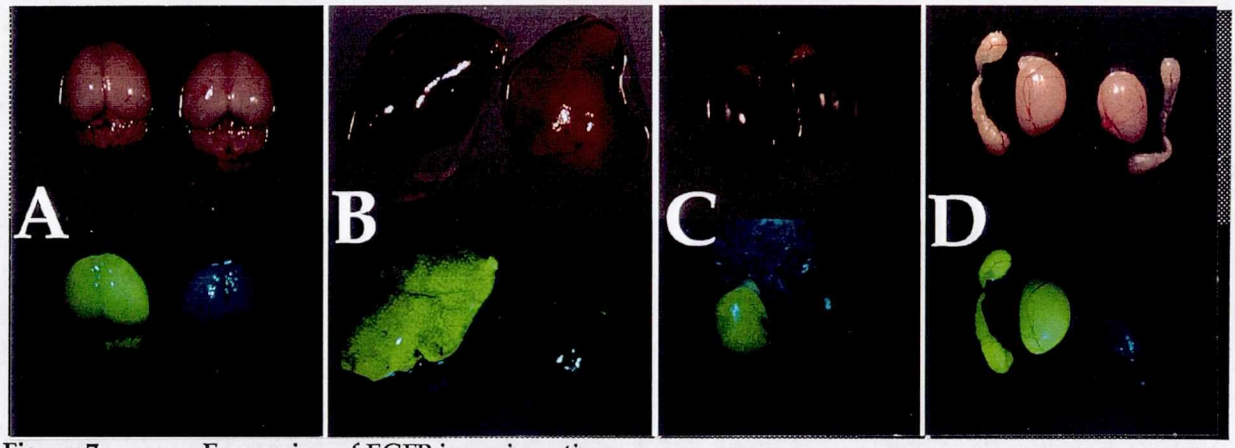

Figure 7 **Expression of EGFP in various tissues**
Organs (A; brain, B; liver, C; kidney, and D; testis) collected from CX-EGFP mice emitted green fluorescence when excited with blue light. Upper panels; bright field, lowere panels; 488 nm excitation. Organs collectged from wild-type mice were placed at right side.

第三節　小括

以上の結果は GFP だけでなく改変型 GFP も哺乳類個体レベルでの遺伝子発現のレポーターとしても有用であることを示しており、改変型 GFP を組み合わせた実験[24,25]も可能になったことを示している。また、wtGFP では困難であった FACS を用いた解析へも応用範囲が広がったことが示された。

EGFP については殆どすべての組織で利用できることが示された。発色団におけるアミノ酸置換もさることながら、condon usage の適応化が発現効率をより高めたことが予想される[21,22]。このように殆ど全身で GFP を発現した場合にもその毒性は認めらなかった。

第三章　GFPの細胞内局在マーカーとしての応用

GFPは目的の蛋白質との融合蛋白を作ることで細胞内に局在する蛋白質の動きを観察するマーカーとしても利用できる。培養細胞を用いた系では、グルココルチコイドレセプターの細胞質から核への移行や[26]、ミトコンドリア局在シグナルが機能する様子を観察した論文がある[25,27]。融合蛋白による解析は他にもたくさん報告されているが、融合蛋白を作った後もGFPがそれらの機能に影響を与えないことが同時に報告されている[26,28]。

著者は受精のメカニズムをテーマに研究を進めていることもあり、精子を用いてGFPの細胞内局在マーカーとしての有用性を検討した。

第一節　精子培養上清が精子受精能に及ぼす影響

哺乳類では、*in vivo*,*in vitro* に関わらず卵子と融合する精子はほんの数個しかないにも関わらず一度に数億もの精子が射精される。そこで著者は、精子懸濁液中には受精を促進するなんらかの因子が存在するのかも知れないと考え、精子懸濁液の培養上清を調製し精子受精能に及ぼす影響を調べた。

精子受精能の指標として、卵子との融合率および先体反応率（**Fig. 8** のように、射出された直後の精子の頭部には先体と呼ばれる分泌小胞があり、そこに含まれる各種蛋白の放出を伴う先体反応を起こして始めて卵子と融合できるようになる）を測定した。

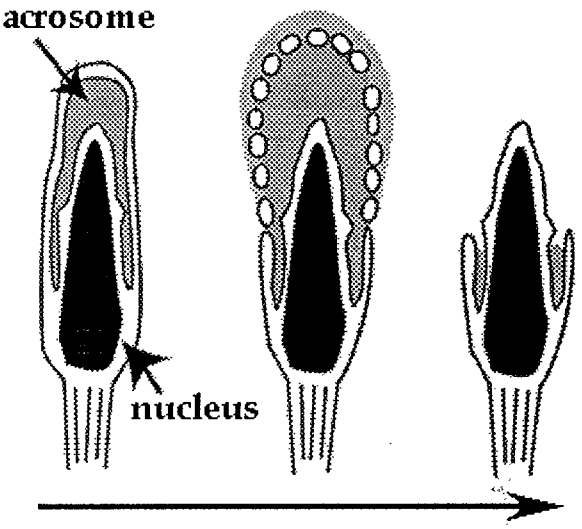

Figure 8　　**acrosome reaction**

実験方法

ハムスターテスト[29]

ヒトの精子受精能を測定する方法として、ヒトの卵子を用いる代わりにハムスターの卵子を用いた。酵素処理によって透明体を取り除いたハムスター裸卵を適当個ずつヒト精子懸濁液中（2×10^5/ml）に加え、5時間培養した後に精子と卵子の融合を位相差顕微鏡で観察した。ヒト精子懸濁液は用手法により得られた精液からSwim-up法により調製した（1×10^7/ml ）ものを希釈した。

精子懸濁液からのCM（conditioned medium）の調製

3ヶ月令の ddY 雄マウス(SLC)の精巣上体からピンセットで精子をしごきだし、mBWWメディウム[30] で2回洗浄した後、mBWWメディウムで懸濁した（1×10^7/ml）。さらに-80°C で凍結後、室温で融解しただちに 0.2μm の滅菌フィルタで濾過したものをCM-FTMとした。

精子、卵子の前処理

swim up 法で得られた精子を 9 時間前培養し、CM を用いて 2×10^5/ml に希釈しさらに 3 時間培養したものをハムスターテストに用いた。ハムスターの卵子は採卵後 3 時間 CM で培養したものをハムスターテストに用いた。

精子の染色とフローサイトメトリー

swim up 法によって得られたヒト精子を 12 時間前培養したものを、CM で 2×10^5/ml に懸濁した。それをさらに 5 時間培養する間に 1 時間おきに MH61 抗体[31,32]（先体反応した精子だけを認識する）と propidium iodide を用いて染色した。

実験結果

卵子のみを CM で前処理した場合は、殆ど融合指数（ハムスター卵子一個あたりに融合した精子数）に影響しなかったが、精子のみを前培養した場合は **Table 5** に示すように融合指数の上昇（約 2 倍）が認められた。このことは精子から調製した CM が精子自身に効いていることを示している。

次に精子受精能獲得に大切なステップである先体反応に CM が与える影響について検討した。その結果、CM が精子の生存性や運動性に影響を与えることなく、先体反応を促進していることが示唆された（**Table 6**）。

Table 5　Effect of sperm pretreatment with CM on SPA index

Pretreatment medium	Penetrated eggs (%)	Fusion index
mBWW	33.0 ± 10.5 (21/48)	0.50 ± 0.23
CM-FTM	51.4 ± 16.4 (31/54)	1.02 ± 0.51

Values presented mean ± s.e. of 6 independent experiments.

Table 6　The change in reactivity to acrosome reacted sperm specific antibody MH61 detected with flow cytometry

medium	before incubation (%)	after 5 hour incubation (%)
mBWW	8.2 ± 1.7	12.4 ± 1.5
CM-FTM	-	20.0 ± 3.2*

Mean ± s.e. of 8 independent tests.
*Significantly different from 5 hour in BWW2.　$P < 0.05$

第二節　acrosin/EGFP 融合蛋白の精子先体への局在

第一節では精子の培養上清が精子の先体反応を促進していることを明らかにした。しかし従来の方法では抗原抗体反応等に要する時間が必要なため、先体反応をリアルタイムで観察することは不可能であった。そこで著者は先体反応を観察するためのモデルマウスとしてGFPを精子の先体に局在させることを試みた。

アクロシンは先体内腔に含まれる酵素の一つでり、先体反応の過程で放出されるのでアクロシンの挙動を追うことは先体反応の様子を観察することと等しい。そこでアクロシンのシグナルペプチドとEGFPの融合蛋白（acrEGFP）を精子に発現させることを考えた。しかし減数分裂を起こす精細胞を培養することは困難であり、外来遺伝子の発現を観察する実験はトランスジェニックマウスを作製する以外にない。そこでアクロシンプロモーター33,34の制御下 acrEGFP を発現するトランスジェニックマウスを作製し、その挙動を観察した。

実験方法

acrEGFP 発現ベクターの調製

転写開始点から上流、約2.4 kbのアクロシンプロモーター33の制御下、アクロシンのN末24アミノ酸（MVEMLPTVAV LVLAVSVVAK DNTT）の下流に EGFP を挿入したコンストラクト acr2EGFP を調製した（**Fig. 9**）。N末の24アミノ酸にはアクロシン軽鎖の一部(KDNTT)も含まれている。コントロールとしてシグナルペプチドを含まないもの（acr1EGFP）も用意した。

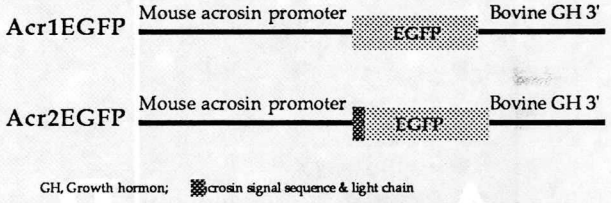

Figure 9　Constructs of acrEGFPs

トランスジェニックマウスの作製

Fig. 9 のコンストラクトから DNA 溶液を調製し、第一章・第二節の方法に従いトランスジェニックマウスを作製した（正式名称は TgN(acr1 or 2 -EGFP)Osb transgenic mice であるが以下 acr1EGFP, acr2EGFP マウスと略す）。

acrEGFP の発現と観察

8週令のトランスジェニックマウス雄の精巣から各分化段階ごとに生きたまま精細胞を回収した。精巣上体から第二章・第二節の方法に従って精子懸濁液を調製した。いずれのサンプルも、生きたままの状態で蛍光顕微鏡下（B 励起）観察した。

acr1EGFP マウスでは、精子形成の過程で作られたシグナルペプチドを持たない EGFP は精細胞の細胞質内に広がり、精子になる前に残余小体として捨てられてしまった。そのため成熟精子に緑色蛍光は認められなかった[34]。一方すべての acr2-EGFP マウスの雄で、精子形成の過程で作られた acr2EGFP は、精子が成熟する(step4→step8→step11)のに従ってアクロシンと同様に先体内に局在するのが確認された（**Fig. 10**）。また精巣上体から回収した成熟精子では、先体に強い緑色蛍光を観察した（**Fig. 11**）。これら蛍光を発する精子の生存性・運動性を調べた結果、変化は認められなかった。ヘミザイガストランスジェニックマウスの場合、精子は半数体であるため、約半数の精子しか acr2EGFP transgene を持たないが、すべての緑色蛍光を発した。

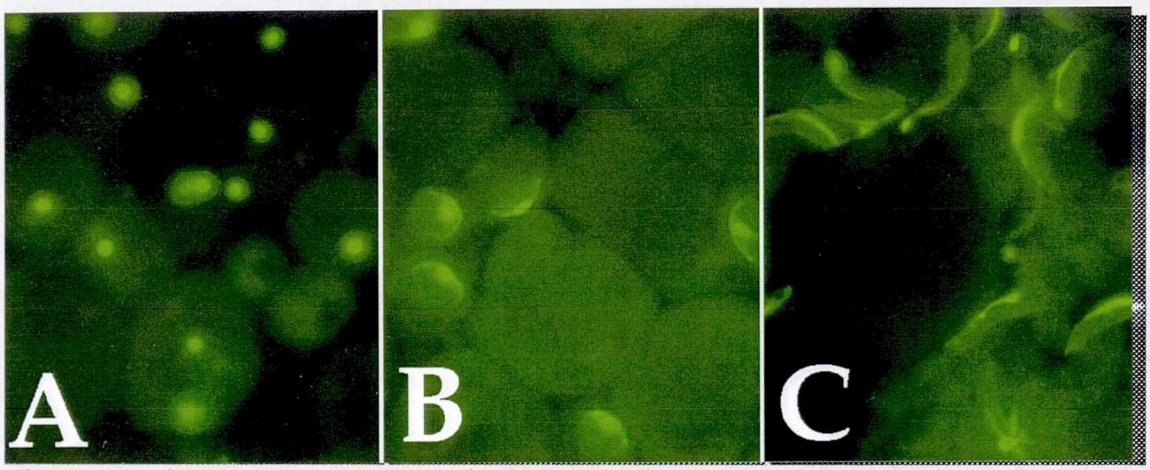

Figure 10　Acrosomal localization of acrosin/EGFP during spermiogenesis
Acrosin/EGFP fusion proteins were localized into acrosome during spermiogenesis. A, step 4: B, step 8; C, step 11 spermatid.

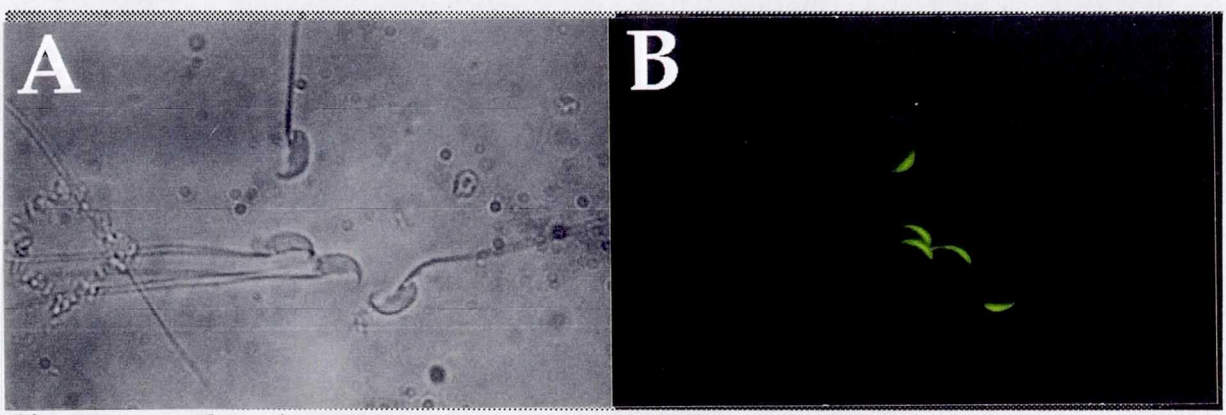

Figure 11　Green fluorescent sperm from acr2EGFP mice
A, bright field; B, B-excitation.

第三節　acrosin/EGFP の蛍光を指標とした精子先体反応の観察

acr2EGFP マウスと野生型マウスから得られた精子を用いて、先体反応がおこる様子を観察し、EGFP の蛍光を利用した方法と従来の方法を比較した。

実験方法

精子先体反応の観察

acr-EGFP マウスの精巣上体から回収した精子を TYH medium[35]中で培養し、FACS により解析した。先体反応精子のみに反応する OBF13 抗体[36,37]を用いて免疫染色する方法をコントロールとして比較した。

実験結果

従来の方法では抗原抗体反応に時間を要するため、先体反応の観察には常に時間差が生じていた。一方 acrEGFP マウスの精子は、先体反応と同時に acr2EGFP 蛋白を放出し蛍光を失うので（**Fig. 12**）、先体反応の様子をリアルタイムで観察することができた。

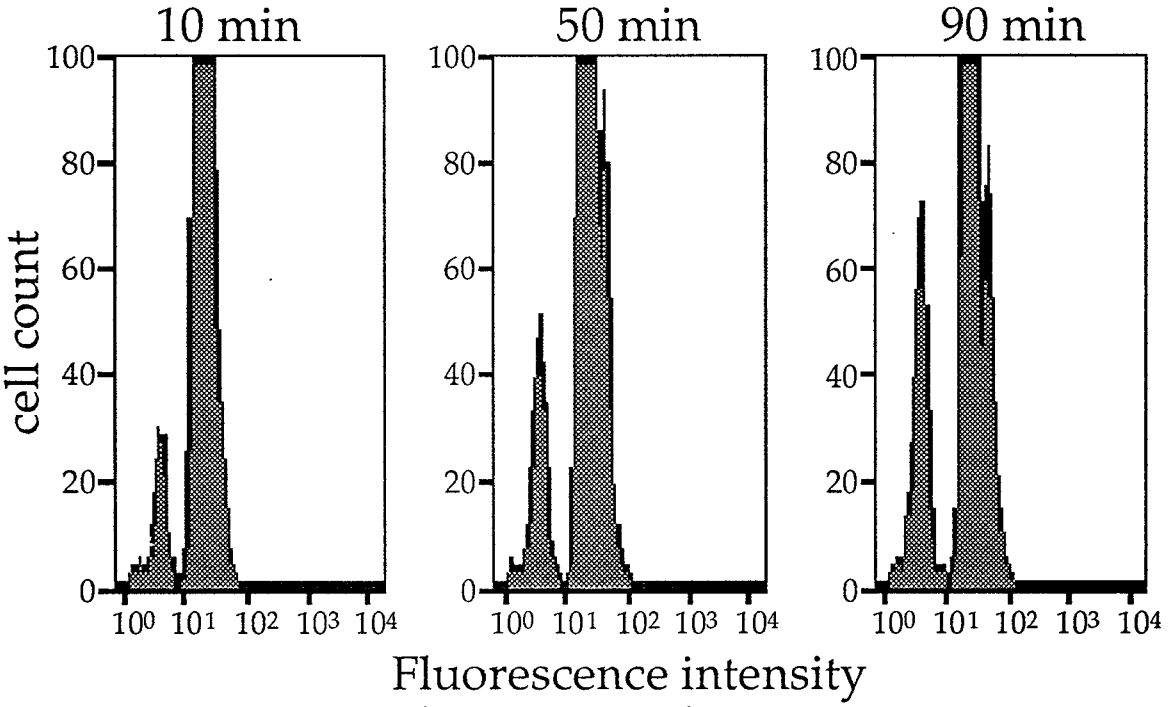

Figure 12　**Real time analysis of acrosome reactionby flow cytomerry**
Population of acrosome reacted (non-green) sperm increased during incubation in TYH medium.

第四節　小括

アクロシンと EGFP の融合蛋白をトランスジェニックマウスに発現させたところ、精子の先体に局在した。シグナルペプチドの有無によりその局在場所が限られていたことから、EGFP は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が示された。またこの実験からアクロシンが先体に局在するために必要なシグナルはＮ末の２４アミノ酸に含まれることが明らかになった。

ヘミザイガス acr2EGFP マウスの精子は、その半数がトランスジーンを有することになるが、実際にはすべての精子が緑色蛍光を発していた。つまりトランスジーンを有していないと考えられる精子も緑色蛍光を発したことになる。これまでに、精子形成の過程で作られる mRNA や protein が精子細胞間の架橋を通じて行き来していることが報告されており[38,39]、acr2EGFP マウスの精子がすべて光ったのはそのためだと考えられる。

acr2EGFP マウスの精子は先体反応の過程で緑色蛍光を失うことから、緑色蛍光を観察することで、これまで不可能であった先体反応のリアルタイム解析が可能となった。このことは acrEGFP マウスが受精を研究するモデルマウスとしての有用であることを示している。

第四章　トランスジェニック動物作製の coinjection marker としての応用

一般にトランスジェニックマウスを作製する際に２種類の遺伝子を同時に注入してやれば、その両方が染色体上の１ケ所に高頻度で取り込まれることが知られている[12,40]。そこで、pCX-GFPs がトランスジェニック動物作製の coinjection marker として有用かどうか検討した。

第一節　ダブルトランスジェニックマウスの作製

同時に２種類の外来遺伝子を受精卵に注入した場合、両方の遺伝子を有するダブルトランスジェニックマウスがどれ位の頻度で現れるのかを調べた。

実験方法

導入遺伝子の調製とトランスジェニックマウスの作製

第一章・第二節の方法に従い、コントロール遺伝子(第三章・第二説で調製した Acr1EGFP の EGFP 部分が GFP にしてあるもの)と pCX-EGFP を１：１（モル比）の割合で混合した DNA 溶液を調製した。トランスジェニックマウスは第一章・第二節の方法に従って作製し、PCR により両遺伝子の有無を確認した。

実験結果

合計３１ラインのトランスジェニックマウスを作製したが、約８４％にあたる２６ラインはコントロール遺伝子と pCX-EGFP の両方を有していた（**Table 7**）。

Table 7　Production of double transgenic mice

control gene	pCX-EGFP	no. of transgenic founder mice*
+	+	26 (83.9%)
+	-	1 (3.2%)
-	+	4 (12.9%)
	total	31

Mixed solution of transgenes (control : pCX-EGFP = 1 : 1) was injected into B6C3F1 x B6C3F1 eggs.
*Integration of transgenes were confirmed by PCR analysis.

第二節　トランスジェニックマウスの非侵襲的な判定

CX-GFPs マウスは生きたままの組織で緑色蛍光が観察できる。そこで、トランスジェニックマウスかどうかの判定が生後すぐにできるかどうかを試みた。

実験方法

緑色蛍光の非侵襲的な観察

CX-GFPs マウスと同腹のマウスを生後すぐに蛍光顕微鏡下（V 励起）で観察した。

実験結果

CX-GFPs マウスの筋肉は非常に強い蛍光を発しており、生後すぐの毛の生えていない状況では、全身の蛍光から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た（**Fig. 13**）。その時、個体を傷つける必要もなくトランスジーンを検出するための DNA の抽出や PCR・サザンといった煩雑な操作も一切いらなかった。

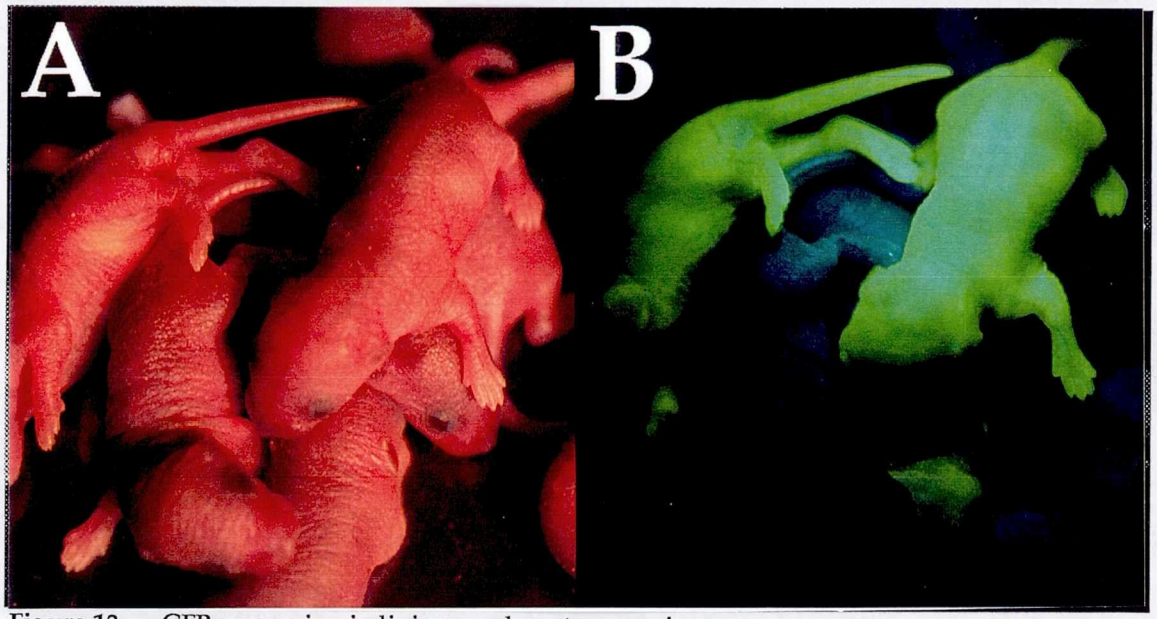

Figure 13　GFP expression in living newborn transgenic pups
A, bright field; B, illuminated by a hand-held, long-wave UV lamp.

第三節　トランスジェニック動物の着床前選択

近年では生理活性産物の供給源として、また臓器移植のドナーとするために、ウシやヤギ、ブタなどの大型の哺乳類動物でもトランスジェニック動物が作られるようになった[41,42]。しかし、マウスの妊娠期間が約２０日で産仔数も十匹程度なのに比べ、大型動物では妊娠期間が２００日にも及び産仔数も１から数匹と少ない。そのため、トランスジェニック動物が得られても、効率よく子孫を増やすことが難しい。

そこで著者は着床前の初期胚の段階でトランスジェニック動物かどうかを判定し、仮親に移植することで効率よくトランスジェニック動物を増やすことを考えた。GFP の発現は beta-galactosidase 等と違い、細胞を固定することなく生きたままで観察できるので、トランスジェニック動物を生後ではなく着床前に選別することも可能であるかどうかを検討した。

実験方法

緑色蛍光胚の選別と PCR によるトランスジーンの検出

一方の染色体にだけトランスジーンを有するヘミザイガス CX-wtGFP マウスの雄と、第一章・第二節の方法に従い過排卵処理した野生型の雌を交配した。交配後 2.5 日胚を雌の輸卵管から回収し、蛍光顕微鏡下（V 励起）に観察したところ緑色蛍光陽性・陰性の２グループに分類できることが明らかであった（**Fig. 14** には回収後、一日培養して 3.5 日胚の写真を示してある）。そこで、回収した５９個の卵子を緑色蛍光陽性・陰性の２グループに分け、トランスジーンを有しているかどうか、さらに発生能を有しているかどうかを検討した。

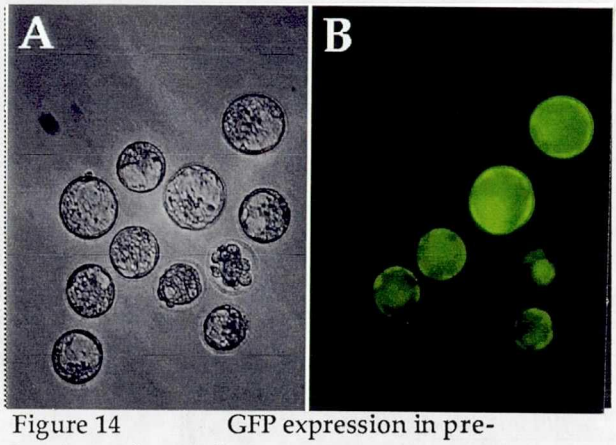

Figure 14　GFP expression in pre-implantation embryos
The embryos collected from wild-type females mated with hemizygous transgenic males. A, bright field; B, V-excitation.

実験方法

PCR によるトランスジーンの検出

選別した、それぞれの卵子から DNA を抽出し、primer-1, -2（第一章・第一節を参照）を用いた PCR によりトランスジーンの有無を確認した。

選別した胚の移植と子孫の検定

蛍光をもとに選別した胚を一日培養し、胚盤胞に成長した時点で偽妊娠マウスの子宮に移植した。生まれてきた子孫について PCR によりトランスジーンの有無を確認した。

実験結果

選別した緑色陽性胚２６個・陰性胚２３個についてPCRを行った結果、すべての緑色胚でPCR産物のバンドが確認された（**Fig. 15**）。陰性胚からは、シグナルは検出されなかった。さらに選別した緑色胚を仮親に移植することで100%トランスジェニックマウスだけを生ませることにも成功した（**Table 7**）。

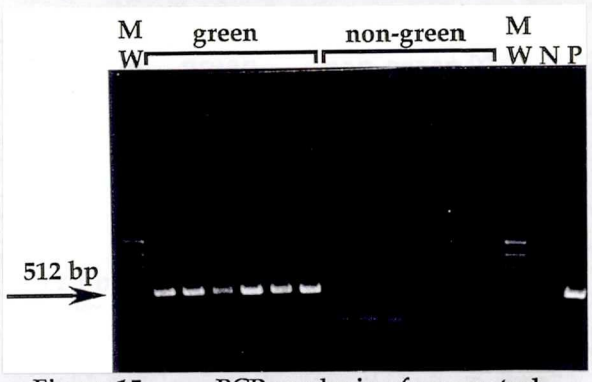

Figure 15 PCR analysis of separated embryos The 512 bp fragments showed that all the green embryos inherited GFP transgene. MW, øX174 HaeIII digest; P, positive control; N, negative control.

Table 6. Exclusive production of GFP-transgenic mice by selecting preimplantation embryos

embryos recovered	embryos transferred*	pregnant /recipients	transgenic /pups
154	82 (green)	5 / 6	32 / 32
	72 (non-green)	4 / 6	0 / 20

* Embryos were separated under a fluorescent microscope. Shedding the excitation light on the embryos was within a few seconds.

第四節　小括

以上の結果から、目的の導入遺伝子とpCX-GFPsを同時に注入してトランスジェニックマウスを作製してやれば、高い頻度で両方の遺伝子を持つダブルトランスジェニックマウスが得られることが明らかになった。一方でCX-GFPsマウスは生後すぐに傷つけることなく簡単にトランスジェニックマウスを選別できることが示された。そこで著者は、pCX-GFPsをTG動物作製のco-injection markerにすることを提唱している。つまり目的の遺伝子とCX-GFPsのダブルトランスジェニック動物を作ることで、マウスを傷つけたりDNAの抽出とそれに続くPCRやサザンブロッティングを行うことなく、より簡便に目的のトランスジェニック動物を選別できる。

さらに、ヘミザイガストランスジェニックマウスであるCX-GFPsマウスの雄と交配した野生型の雌から回収した初期胚でトランスジーンを有するものだけを着床前に選別できた。さらに選別した胚から子孫も得られており、着床前に胚を選別することで１００%の確率でトランスジェニックマウスの子孫を増やすことに成功した。

第三編　考察

著者は生きた細胞で遺伝子発現を観察できる新しいレポーターとしてGFPに着眼し、哺乳類細胞での遺伝子発現を観察するのに適しているかどうか、またその応用について検討を行った。

まず最初に、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[26,43]。しかし、GFP発現のためのベクターpCX-wtGFPを作成し哺乳類細胞に導入したところ、通常の培養条件下（37度、5% CO_2）で非常に強い蛍光を発することを見いだし、低温で培養することは必須でないことを示した。

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作製し、それがまさにgreen fluorescent miceであることを示した。組織特異的な発現が見られたが、コントロールとして作製したCX-hCD4マウスにおけるhCD4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[16]ことが明らかであった。これまで汎用されてきたLacZをレポーターとした場合には、LacZ自身が遺伝子のメチル化などを介してその発現に影響するようなことが報告されているが[44]、著者の作製したトランスジェニックマウスでの観察からは、GFP遺伝子にはそのような影響は認められずプロモーターの制御に従った発現が確認された。

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[1,2]。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[3,8]。安定すぎるのも問題で、遺伝子発現のshut offを観察するようなレポーターとしては適していないかもしれないが、発現を定量化するにはメリットである。そのためGFPの量はその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。トランスジェニックマウスを用いた実験からは、100ng protein/mlのような組織抽出物をもとに遺伝子発現を検出しており、CAT assayに匹敵する感度を有していると考えられた。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。

著者は蛍光強度を改良しただけでなく改変型GFPsが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を発現させることや、それらを組み合わせた実験が予想される。ところでEGFPは殆どすべての組織で発現された。発色団におけるアミノ酸置換もさることながら、codon usageの適応化による発現効率の改良が大きな原因であると考えられる[21,22]。

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[3,8]。

そこで著者は、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唆している。

また、殆ど全身の細胞で強い緑色蛍光を発する CX-EGFP マウスでは、蛍光顕微鏡による観察でも FACS による解析でも野生型マウスの細胞と簡単に分けることができた。選別後も細胞は生存しており、観察を続けることが可能であった。最近では血球細胞や精細胞の幹細胞を移植し追跡するような実験も試みられており[45-48]、CX-EGFP マウスの臓器移植やキメラ解析への応用が期待される。

さらに著者は CX-GFPs をトランスジェニック動物作製の coinjection marker としての可能性を示唆した。すでにチロシナーゼを coinjection marker として導入し、毛色によってトランスジェニックマウスかどうかを判定する方法[49,50]が提唱されてはいるものの、この方法はアルビノマウス（チロシナーゼを欠損するため色素を作れず白色になる）にしか適用できない。それに対し、pCX-GFPs を用いた場合にはマウスの系統を選ばないだけでなく、マウス以外のトランスジェニック動物作製[41,42]への応用が可能であると考えられる。さらに緑色蛍光をもとに着床前に選別することで、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ており、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）では特に有効であると考えられる。

このように GFP はこれまでのレポーターにない特徴を備えている。すなわち、無処理のままで連続的に、同じサンプルを何度でも観察できる。GFP の有用性が示されて約２年が経過しようやくその地位を確保しつつあるが、従来のレポーターも非常に優れており、様々な使用方法が考案されている。そのため GFP を使用する事を考慮しても、つい今までの型のレポーター遺伝子・マーカー蛋白としての使用方法を思いついてしまう。これまでの発想に留まるのであれば beta-gal や CAT, luciferase で十分であることになる。著者は GFP の特徴を生かした研究を進めてきたが、今後はさらに柔軟な発想による奇想天外な利用がなされるであろう。

第四編　結論

1）　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 が哺乳類個体レベルでも遺伝子発現のレポーターとして有用であることを示した。

2）　精子形成の過程で発現したアクロシン・EGFP 融合蛋白がアクロシンと同じく先体に局在することを示し、GFP 細胞内局在マーカーとして機能することを示唆した。

4）　CX-EGFP マウスは臓器移植やキメラ解析の、Acr2EGFP 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と考えれる。

5）　pCX-GFPs がトランスジェニック動物作製の coinjection マーカーとして利用できる可能性を示した。

6）　緑色蛍光をもとにトランスジェニックマウスの胚を着床前に選別できることを示したが、妊娠期間が長く産仔数の少ない大型のトランスジェニック動物（ウシ、ヤギ、ブタ等）の子孫を効率的に繁殖させるには特に有効であると考えられる。

第五編　謝辞

終に幸いにして興味ある新知見を得、ここに博士論文としてまとめ得ましたのは、恩師、大阪大学薬学部教授田中慶一先生の御指導、御鞭撻の賜物であり心より御礼申しあげます。また実験に際し、種々の御指導御協力を頂きました大阪大学微生物病研究所教授西宗義武先生、大阪大学微生物病研究所助教授岡部勝先生、大阪大学微生物病研究所動物実験学教室の諸氏ならびに大阪大学薬学部環境毒性学教室の諸氏に感謝いたします。さらに、GFP遺伝子を供与頂きましたDr. Prasher, D. C., RSGFP遺伝子を供与頂きましたDr. Youvan, D. C., EGFP遺伝子を供与頂きましたDr. Kain, S., hCD4遺伝子を供与頂きましたDr. Littman, D. R. pCAGGS発現ベクターを供与頂きました宮崎純一先生に感謝いたします。

第六編　参考文献

1. Bronstein I, Fortin J, Stanley PE, Stewart GS, Kricka LJ: Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays. **Anal. Biochem.** 219:169-18, 1994
2. Cui C, Wani MA, Wight D, Kopchick J, Stambrook PJ: Reporter genes in transgenic mice. **Transgenic Res.** 3:182-194, 1994
3. Prasher DC: Using GFP to see the light. **Trends Genet.** 11:320-323, 1995
4. Prasher DC, Eckenrode VK, Ward WW, Prendergast FG, Cormier MJ: Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein. **Gene** 111:229-233, 1992
5. Cody CW, Prasher DC, Westler WM, Prendergast FG, Ward WW: Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the Aequorea green-fluorescent protein. **Biochemistry** 32:1212-1218, 1993
6. Ormo M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ: Crystal structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein. **Science** 273:1392-1395, 1996
7. Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC: Green fluorescent protein as a marker for gene expression. **Science** 263:802-805, 1994
8. Cubitt AB, Heim R, Adams SR, Boyd AE, Gross LA, Tsien RY: Understanding, improving and using green fluorescent proteins. **Trends Biochem. Sci.** 20:448-455, 1995
9. 小川秀知、井上敏、Tsuji FI、安田國夫、梅園和彦: GFP による細胞蛍光ラベリング法 実験医学 14:101-107, 1996
10. Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J: Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. **Gene** 108:193-199, 1991
11. Kozak M: An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. **Nucleic Acids Research** 15:8125-8148, 1987
12. Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E: Production of transgenic mice, in Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E (eds): **Manipulating the Mouse Embryo** (ed 2nd ed.). NY, Cold Spring Habor Laboratory press, 217-252, 1994
13. Madon PJ, Littman DR, Godfrey M, Madon DE, Chess L, Axel R: The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin genen family. **Cell** 42:93-104, 1985
14. Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E: Techniques for visualizing genes, gene products, and specialized cell types, in Hogan B, Beddington R, Costantini F, Lacy E (eds): **Manipulating the Mouse Embryo** (ed 2nd ed.). NY, Cold Spring Habor Laboratory press, 326-384, 1994
15. Fukudome K, Furuse M, Imai T, Nishimura M, Takagi S, Hinuma Y, Yoshie O: Identification of membrane antigen C33 recognized by monoclonal antibodies

inhibitory to human T-cell leukemia virus type 1 (HTLV-1)-induced syncytium formation: altered glycosylation of C33 antigen in HTLV-1-positive T cells. **J. Virol.** 66:1394-1401, 1992

16. Ikematsu S, Kaname T, Ozawa M, Yonezawa S, Sato E, Uehara F, Obama H, Yamamura K, Muramatsu T: Transgenic mouse lines with ectopic expression of alpha-1,3-galactosyltransferase: production and characteristics. **Glycobiology** 3:575-580, 1993
17. Heim R, Prasher DC, Tsien RY: Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 91:12501-12504, 1994
18. Heim R, Cubitt AB, Tsien RY: Improved green fluorescence [letter]. **Nature** 373:663-664, 1995
19. Delagrave S, Hawtin RE, Silva CM, Yang MM, Youvan DC: Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein. **Bio/Technology** 13:151-154, 1995
20. Crameri A, Whitehorn EA, Tate E, Stemmer WPC: Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. **Nature Biotechnology** 14:315-319, 1996
21. Haas J, Park E, Seed B: Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. **Curr. Biol.** 6:315-324, 1996
22. Yang TT, Kain SR, Kitts P, Kondepudi A, Yang MM, Youvan DC: Dual color microscopic imagery of cells expressing the green fluorescent protein and a red-shifted variant. **Gene** 173:19-23, 1996
23. Cormack BP, Valdivia RH, Falkow S: FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). **Gene** 173:33-38, 1996
24. Heim R, Tsien RY: Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. **Curr. Biol.** 6:178-182, 1996
25. Rizzuto R, Brini M, De Giorgi F, Rossi R, Heim R, Tsien RY, Pozzan T: Double labelling of subcellular structures with organelle-targeted GFP mutants in vivo. **Curr. Biol.** 6:183-188, 1996
26. Ogawa H, Inouye S, Tsuji FI, Yasuda K, Umesono K: Localization, trafficking, and temperature-dependence of the Aequorea green fluorescent protein in cultured vertebrate cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 92:11899-11903, 1995
27. Rizzuto R, Brini M, Pizzo P, Murgia M, Pozzan T: Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells. **Curr. Biol.** 5:635-642, 1995
28. Marshall J, Molloy R, Moss GW, Howe JR, Hughes TE: The jellyfish green fluorescent protein: a new tool for studying ion channel expression and function.

Neuron 14:211-2151995

29. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ: The use of zona-free animal ova as a test system for the assessment of fertilizing capacity of human spermatozoa. **Biol. Reprod.** 15:471-476, 1976
30. Overstreet JW, Yanagimachi R, Katz DF, Hayashi R, Hanson FW: Penetration of human spermaotzoa into the human zona pellucida and the zona-free hamster egg: A study of fertilie donors and infertile patients. **Fertil. Steril.** 33:534-542, 1980
31. Okabe M, Nagira M, Kawai Y, Matzno S, Mimura T, Mayumi T: A human sperm antigen possibly involved in binding and/or fusion with zona-free hamster eggs. **Fertil. Steril.** 54:1121-1126, 1990
32. Okabe M, Ying X, Nagira M, Ikawa M, Kohama Y, Mimura T, Tanaka K: Homology of an acrosome-reacted sperm-specific antigen to CD46. **J. Pharmacobio-Dyn.** 15:455-459, 1992
33. Watanabe K, Baba T, Kashiwabara S, Okamoto A, Arai Y: Structure and organization of the mouse acrosin gene. **J. Biochem. Tokyo** 109:828-833, 1991
34. Nayernia K, Burkhardt E, Beimesche S, Keime S, Engel W: Germ cell-specific expression of a proacrosin-CAT fusion gene in transgenic mouse testis. **Mol. Reprod. Dev.** 31:241-248, 1992
35. Toyoda Y, Yokoyama M, Hoshi T: Studies on the fertilization of mouse eggs *in vitro*. I. *In vitro* fertilization of eggs by fresh epididymal sperm. **Jpn. J. Anim. Reprod.** 16:147-151, 1971
36. Okabe M, Adachi T, Takada K, Oda H, Yagasaki M, Kohama Y, Mimura T: Capacitation-related changes in antigen distribution on mouse sperm heads and its relation to fertilization rate in vitro. **J. Reprod. Immunol.** 11:91-100, 1987
37. Okabe M, Yagasaki M, Oda H, Matzno S, Kohama Y, Mimura T: Effect of a monoclonal anti-mouse sperm antibody (OBF13) on the interaction of mouse sperm with zona-free mouse and hamster eggs. **J. Reprod. Immunol.** 13:211-219, 1988
38. Zambrowicz BP, Harendza CJ, Zimmermann JW, Brinster RL, Palmiter RD: Analysis of the mouse protamine 1 promoter in transgenic mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 90:5071-5075, 1993
39. Jasin M, Zalamea P: Analysis of Escherichia coli beta-galactosidase expression in transgenic mice by flow cytometry of sperm. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 89:10681-10685, 1992
40. Behringer RR, Ryan TM, Reilly MP, Asakura T, Palmiter RD, Brinster RL, Townes TM: Synthesis of functional human hemoglobin in transgenic mice. **Science** 245:971-973, 1989
41. Gershon D: Biotechnology. Will milk shake up industry? [news]. **Nature** 353:7,

1991

42. Dickson D: Pig heart transplant 'breakthrough' stirs debate over timing of trials [news]. **Nature** 377:185-186, 1995
43. Pines J: GFP in mammalian cells. **Trends Genet.** 11:326-327, 1995
44. Paldi A, Deltour L, Jami J: Cis effect of lacZ sequences in transgenic mice. **Transgenic Res.** 2:325-329, 1993
45. Hollander GA, Wang B, Nichogiannopoulou A, Platenburg PP, van Ewijk W, Burakoff SJ, Gutierrez Ramos JC, Terhorst C: Developmental control point in induction of thymic cortex regulated by a subpopulation of prothymocytes. **Nature** 373:350-353, 1995
46. Wolfe JH, Sands MS, Barker JE, Gwynn B, Rowe LB, Vogler CA, Birkenmeier EH: Reversal of pathology in murine mucopolysaccharidosis type VII by somatic cell gene transfer. **Nature** 360:749-753, 1992
47. Brinster RL, Avarbock MR: Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation [see comments]. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 91:11303-11307, 1994
48. Brinster RL, Zimmermann JW: Spermatogenesis following male germ-cell transplantation [see comments]. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 91:11298-11302, 1994
49. Beermann F, Ruppert S, Hummler E, Bosch FX, Muller G, Ruther U, Schutz G: Rescue of the albino phenotype by introduction of a functional tyrosinase gene into mice. **EMBO J.** 9:2819-2826, 1990
50. Overbeek PA, Aguilar CE, Hanten G, Schaffner DL, Patel P, Lebovitz RM, Lieberman MW: Coinjection strategy for visual identification of transgenic mice. **Transgenic Res.** 1:31-37, 1991