

Cre/loxP遺伝子組換えにより緑色から赤色蛍光に変換する

ROSA26 Cre レポーターマウスの開発

長谷川 賀一

筑波大学医学系技術室（生命科学動物資源センター）

〒305-8575 茨城県つくば市天王台1-1-1

概要

Rosa26 遺伝子を相同組換えする目的でターゲティングベクターを作製し、C57BL/6N 由来の相同組換え ES 細胞を作製した。この ES 細胞より R26GRR マウスを作製し解析を行った。作製されたマウスは偏在的に緑色蛍光を発現し、Cre ドライバーマウスと交配をかけた F₁ マウスにおいては部位特異的な赤色蛍光を発現することを見出した^[1]。

キーワード： CAC promoter , Cre-repoter mouse , EGFP , Rosa26 , tdsRed

1. はじめに

Cre/loxP システムを利用したコンディショナルな gene-targeting は Cre ドライバーマウスによる Cre 酵素の発現に依存する。このことから、Cre ドライバーマウスにおいて loxP を切除することによって時間的・空間的にどのように制御されているかを知ることは極めて重要である。Cre ドライバーマウスの評価のため広く使用されている Cre レポーターマウスが ROSA26 レポーターマウスである^[2]。このマウスは ubiquitous に外来性遺伝子発現を許す ROSA26 遺伝子座内に、転写を STOP させる配列を Floxed し、その下流に lacZ レポーター遺伝子をノックインしたマウスである。このマウスでは Cre リコンビナーゼが発現する組織においてのみ Cre/loxP リコンビネーションが生じ、レポーター遺伝子発現を介して、Cre ドライバーマウスを評価することが可能となる。近年では live imaging や fate mapping study のため lacZ の代わりに EGFP などの蛍光タンパクに置き換えられた ROSA26 レポーターマウスも数多く開発されている。しかしながら、現在までの Cre レポーターマウスでは、レポーター遺伝子のシグナルが生じていない組織において、本当に Cre 酵素の発現が無いための評価することはできない。そこで、Cre/loxP システムを介した研究をサポートするツールのひとつとして、レポーター遺伝子のプロモーター活性を蛍光タンパクにてモニター可能であり、Cre/loxP リコンビネーションを異なる蛍光タンパクにより検出可能な新規の Cre レポーターマウスを開発することとした。

2. 方法

2.1 Rosa26 Green red Reporter (R26GRR) Mice の作製

CAG プロモーターと tdsRed 遺伝子の間に loxP 配列で挟んだ EGFP 遺伝子を配置し、Rosa26 5' arm-CAG/EGFP-tdsRed-Rosa26 3' arm のターゲティング・ベクターを構築した。このターゲティング・ベクターを C57BL/6N 由来の ES 細胞の Rosa26 遺伝子座へ相同組み換え方法により導入した(Fig.1)。キメラマウス作製には相同組み換えが確認された ES 細胞を用いた。複数のキメラマウスが作製され、そのうちの 1 ラインにおいてレポーター遺伝子である CAG/EGFP-tdsRed が生殖系列に移行することを確認した。

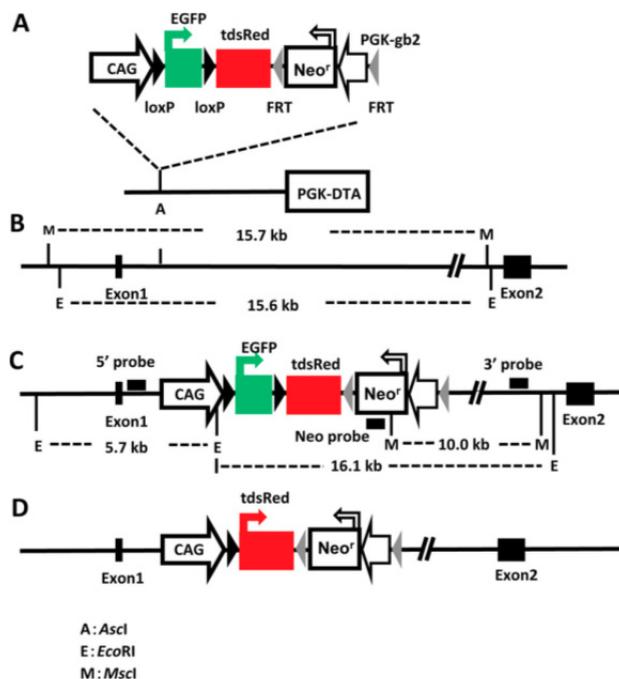


Fig.1 Generation of the ROSA26 locus with insertion of a novel Cre reporter.

2.2 動物

全ての実験は筑波大学動物実験委員会の承認のもと実施した。Cre レポーターマウスを産出するために、相同組換えが確認された ES 細胞を用いてキメラマウスを作製した。キメラマウスの雄と C57BL/6N の雌を交配し、対立遺伝子が生殖系列へ伝達されていることを確認した。Ayu1-Cre マウス、

Tie2-Cre マウス、Ins1-Cre マウスとそれぞれ交配した。マウスは明周期 14 時間、暗周期 10 時間、温度 23.5 ± 2.5 °C、湿度 52.5 ± 12.5 % の環境で飼育された。

2.3 蛍光実体顕微鏡

新生仔における蛍光イメージングでは、マウスを安楽死させた後、新生仔を解剖し、蛍光実体顕微鏡を用いて検討を行った。

2.4 組織学的解析

使用したマウスは、深麻酔後、PBS 灌流で安楽死させ、4% パラホルムアルデヒド(PFA)を用いて灌流を行った。各組織は固定後、蛍光顕微鏡を用いて蛍光の発現を確認した。その後、sucrose 溶液を用いて平衡化し、Tissue-Tek OCT に包埋した。凍結組織片は $10 \mu\text{m}$ の厚さで切片化した。

3. 結果

3.1 R26GRR マウスの産生

変異導入した ROSA26 対立遺伝子の特性を調べるために、標的とした ES 細胞の蛍光イメージングを行った(Fig.2)。標的とした ES 細胞を観察したところ、2 つのコロニーにおいて EGFP の発現を示す緑色蛍光がみられた(Fig.2A,2B)。エレクトロポレーション法によって CAG-Cre 遺伝子を R26GRR ES 細胞に導入し、セレクションなしで 72 時間後に細胞の蛍光を確認したところ、多数の緑色蛍光の細胞と少数の赤色蛍光の細胞がみられた(Fig.2E,2F)。さらに赤色蛍光を示した細胞は N 末端に FLAG がタグ付けされており、FLAG にタグ付けされたペプチド結合に対して Alexa647 でラベルされた抗体に対して検出された(Fig.2D)。

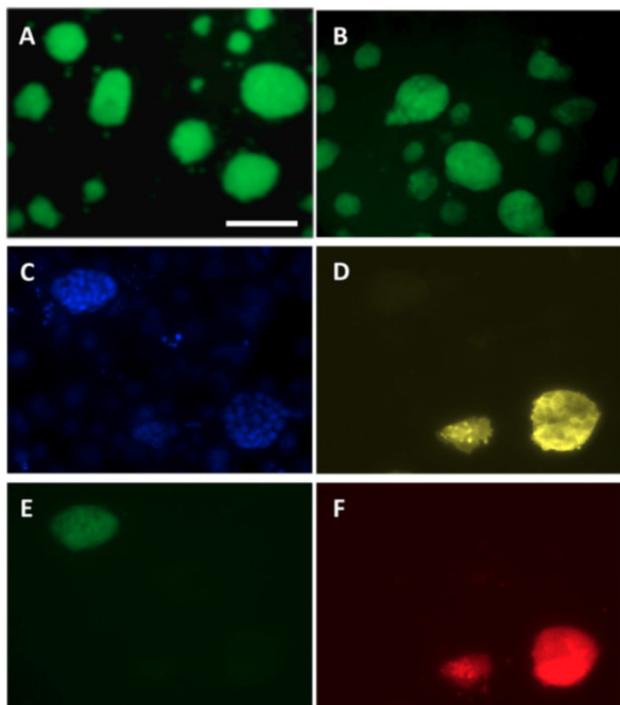


Fig.2 Fluorescence of ES cells targeted with the R26GRR vector.

3.2 R26GRR、R26RR 新生仔における EGFP、tdsRed の発現

次に、ROSA26^{CAG-EGFP/tdsRed} 対立遺伝子が持続的に発現しているかどうかを調べるためにマウスの新生仔を用いて検討を行った(Fig.3)。wild type、R26GRR、R26RR マウスの新生仔についてそれぞれ蛍光顕微鏡下で観察を行ったところ、wild type マウスの新生仔では蛍光は確認されず(Fig.3A-C)、R26GRR マウスの新生仔では全身性に緑色蛍光のみを示し(Fig.3D-F)、R26RR マウスの新生仔では全身性に赤色蛍光のみを示した(Fig.3G-I)。

3.3 R26GRR、R26RR 成体マウスの臓器における EGFP、tdsRed の発現

R26GRR マウスと R26RR マウスについて、それぞれ麻酔下で PBS 灌流、4% PFA 灌流を行った後、脳、心臓、肺、腎臓、肝臓の解剖を行い、臓器における蛍光の発現を検討したところ、R26GRR マウスにおいては緑色蛍光を示したが、赤色蛍光は示さなかった。また R26RR マウスにおいては赤色蛍光を示したが、緑色蛍光は示さなかった(Fig.4)。さらに、脳(新皮質、歯状回、小脳)、心臓、肺、腎臓、肝臓について、凍結組織切片を作製し蛍光の発現を検討したところ同様の結果を示した(Fig.5)。これらの結果は、ROSA26 遺伝子座の CAG プロモーターは最初のレポーター遺伝子を恒常的に活性化することができるが、第 2 のレポーター遺伝子は R26GRR マウスにおいて Cre を切除するまで、マウスに偏在する有核細胞のほとんどを活性化できないことを示している。以上より R26GRR マウスは C57BL/6N を遺伝的背景に持つレポーターマウスとして有益なものであると言える。

次に、EGFP が切除された後の Cre レポーターマウスに偏在する細胞において、第 2 のレポーターである tdsRed が活性化するかどうかを検証した。Ayu1-Cre トランスジェニックマウスは生殖系を含む多数の臓器において Cre リコンビナーゼを発現する^[3]。そこで、R26GRR の雌マウスと Ayu1-Cre の雄マウスを交配し、R26GRR/Ayu1-Cre F₁ マウスを得た。ヘテロの R26RR 新生仔は強い赤色蛍光を示したが緑色蛍光は示さなかった(Fig.3I,3H)。これらの結果は、tdsRed は Cre を媒介して EGFP を除去することによって作製した R26RR マウスにおいて、CAG プロモーターによって恒常的に活性化されていることが明らかとなった。

3.4 R26GRR マウスにおける組織特異的な tdsRed の活性化

赤色のレポーターである tdsRed が Cre/loxP 組換え後、R26GRR マウスにおいて特定の器官に組織特異的であるかどうかを検討した。マウスインスリン 1(*Ins1*)プロモーターはマウス膵臓ランゲルハンス島 β 細胞における外来性の遺伝子として良く用いられる^[4]。tdsRed の膵島特異的な発光を検討するために、R26GRR マウスを Ins1-Cre マウスと交配し R26GRR/Ins1-Cre F₁ 子孫を得た。膵島は明瞭に強い赤色蛍光に標識されていたが、他の膵臓の組織は緑色蛍光に標識されていた。膵島特異的な赤色蛍光

が見られたことから、膵臓β細胞において Cre/loxP による組換えが起こっていることが示唆された。

さらに R26GRR マウスを用いて、内皮細胞系列に特異的な Cre/loxP リコンビネーションについても検討した。チロシンキナーゼレセプターの制御領域にある *Tek(Tie2)* 遺伝子は血管内皮細胞特異的に遺伝子発現することが知られている^[5]。*Tie2-Cre* マウスは *Tie* プロモーター/エンハンサーの制御下で Cre リコンビナーゼを発現し、胚発生期や成体で内皮細胞に均一な発現を示す^[6]。*tdsRed* の発光が血管内皮系列特異的であるか検討するために、R26GRR マウスと *Tie2-Cre* マウスを交配し R26GRR/*Tie2-Cre* F₁ マウスを作製した。胎生 9.5 日の R26GRR/*Tie2-Cre* F₁ 個体において赤色蛍光を伴った血管形成がはっきりと観察され、組織特異的に Cre/loxP リコンビネーションが起こっていることが示唆された(Fig.7)。まとめると、Cre の組織特異的な発現は R26GRR マウスを用いることによって蛍光タンパクの色に基づいて識別できる。

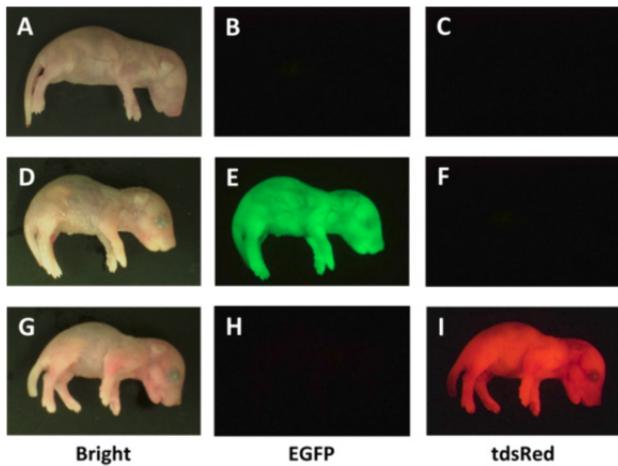


Fig.3 EGFP and tdsRed expression in R26GRR and R26RR neonates.

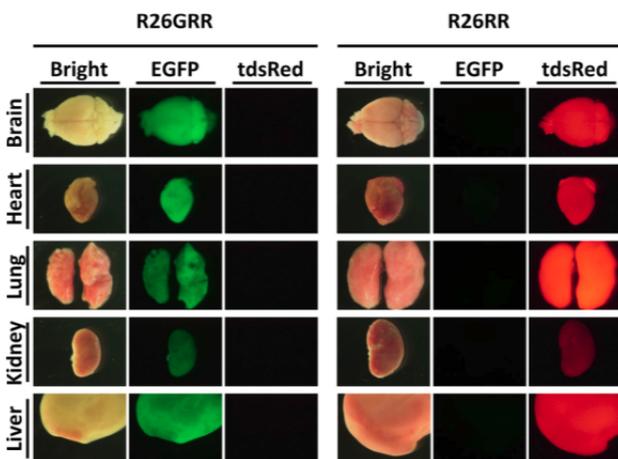


Fig.4 EGFP and tdsRed expression in the organs of R26GRR and R26RR adults.

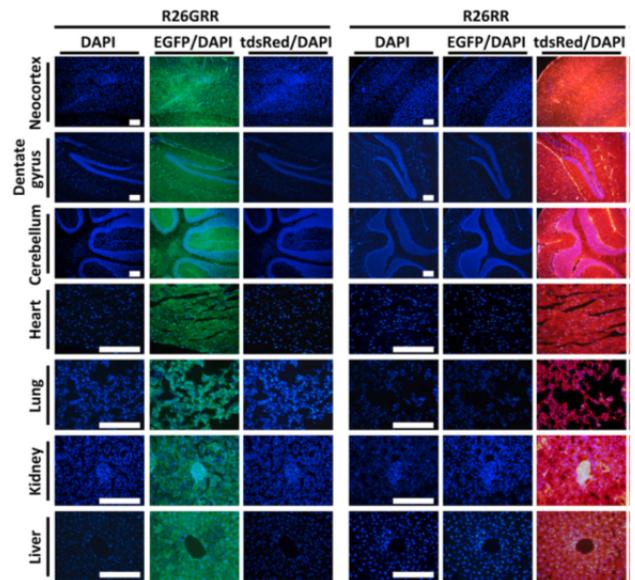


Fig.5 EGFP and tdsRed expression in tissues of R26GRR and R26RR adults.

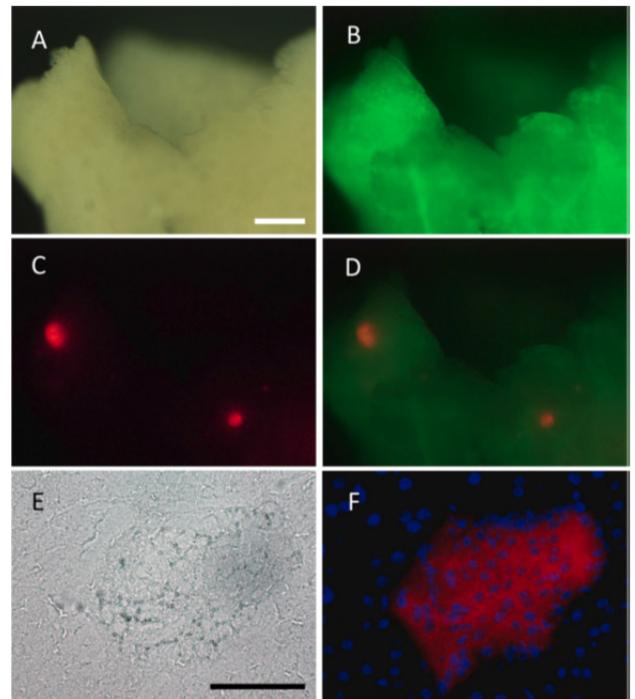


Fig.6 Double-color imaging of EGFP and tdsRed fluorescence in the pancreas of R26GRR/*Ins1-Cre* F₁ mice at the adult stage.

4. 考察

マウスにおける遺伝子機能はノックアウトマウスの表現型の研究から決定されてきた。さらにコンディショナルノックアウトマウスを用いた手法はマウスの時空間分析のための強力な方法となりうる。近年では 9000 以上のコンディショナルな対立遺伝子を用いたマウスが C57BL/6N 由来の ES 細胞から組織的に樹立されたとの報告もある^[7]。それゆえに C57BL/6N ラインを用いた Cre ドライバーマウスや Cre レポーターマウスの開発は生物学的にも基礎医学的にも重要になってきている。そこで我々は、リコンビネーションが起こっていない細胞では

緑色蛍光を発し、Cre リコンビナーゼが起こった細胞では赤色蛍光を発する R26GRR マウスを作製しその特性を明らかにした。R26GRR は遍在性に緑色蛍光を発現させ、赤色蛍光は発現しなかった。一方、Cre 酵素により EGFP を除去した R26RR マウスにおいても遍在性に赤色蛍光を発現し、レポーター遺伝子プロモーターが Cre リコンビネーション前後で変わりなく遍在性にレポーター遺伝子発現を機能させることが示唆された。さらに R26GRR/Tie2-Cre F₁ マウスにおいて血管内皮特異的赤色蛍光、また R26GRR/Ins1-Cre F₁ マウスにおいて膵島特異的な赤色蛍光が観察され、組織特異的な Cre リコンビナーゼが検出された。これらの結果は R26GRR マウスが新規の Cre レポーターマウスとして有用であること、Cre/loxP リコンビネーションにより緑色から赤色蛍光変換する C57BL/6N 遺伝的背景をもつ細胞の有用な供給源であることが示された。

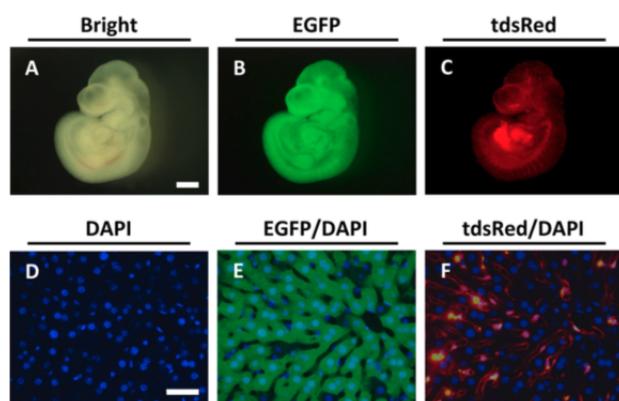


Fig.7 Double-color imaging of EGFP and tdsRed fluorescence in R26GRR/Tie2-Cre F₁ mice.

謝辞

本研究においてご指導とご鞭撻を受け賜りました筑波大学人間総合科学研究科の八神健一教授、杉山文博准教授、水野聖哉助教に感謝申し上げます。また、ご協力いただいた実験動物研究室の皆様、生命科学動物資源センターの皆様にも感謝申し上げます。

参考文献

- [1] Hasegawa, Y., Daitoku, Y., Sekiguchi, K., Tanimoto, Y., Mizuno-Iijima, S., Mizuno, S., Kajiwara, N., Ema, M., Miwa, Y., Mekada, K., Yoshiki, A., Takahashi, S., Sugiyama, F., and Yagami, K. 2013. Novel ROSA26 Cre-reporter knock-in C57BL/6N mice exhibiting green emission before and red emission after Cre-mediated recombination. *Exp.Anim.*62: 295 – 304.
- [2] Soriano, P. 1999. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat. Genet.*21: 70 – 71.
- [3] Niwa, H., Araki, K., Kimura, S., Taniguchi, S., Wakasugi, S., and Yamamura, K. 1993. An efficient gene-trap method using poly A trap vectors and characterization of gene-trap events. *J Biochem* 113: 343 – 349.
- [4] Sekiguchi, Y., Owada, J., Oishi, H., Katsumata, T., Ikeda, K., Kudo, T., and Takahashi, S. 2012. Noninvasive monitoring of b-cell mass and fetal b-cell genesis in mice using bioluminescence imaging. *Exp Anim* 61: 445 – 451.
- [5] Schlaeger, T.M., Qin, Y., Fujiwara, Y., Magram, J., and Sato, T.N. 1995. Vascular endothelial cell lineage-specific promoter transgenic mice. *Development* 121: 1089 – 1098.
- [6] Kisanuki, Y.Y., Hammer, R.E., Miyazaki, J., Williams, S.C., Richardson, J.A., and Yanagisawa, M. 2001. Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev Biol* 230: 230 – 242.
- [7] Skarnes, W. C., Rosen, B., West, A. P., Koutourakis, M., Bushell, W., Iyer, V., Mujica, A. O., Thomas, M., Harrow, J., Cox, T., Jackson, D., Severi, J., Biggs, P., Fu, J., Nefedov, M., de Jong, P. J., Stewart, A.F., and Bradley, A. 2011. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474: 337 – 342.

Novel ROSA26 Cre-reporter Knock-in C57BL/6N Mice Exhibiting Green Emission before and Red Emission after Cre-mediated Recombination

Yoshikazu Hasegawa

Technical Service Office for Medical Science, Laboratory Animal Resource Center,
University of Tsukuba,
1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8575 Japan

Keywords: CAG promoter, Cre-reporter mouse, EGFP, Rosa26, tdsRed