

綜 説

## 遺伝子機能解析ツールとしての ノックアウトマウスの作出とバイオリソース

角 田 茂

信州大学ヒト環境科学研究支援センター生命科学分野動物実験部門  
(現所属: 東京大学大学院農学生命科学研究科獣医学専攻病態動物医科学講座獣医実験動物学)

### Generation of Knock-out Mice as Research Tools for Gene Function and Bioresource Project

Shigeru KAKUTA

*Division of Laboratory Animal Research, Research Center for Human  
and Environmental Sciences, Shinshu University  
(Present Address: Department of Biomedical Science,  
Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)*

---

**Key words:** knock-out mice, embryonic stem (ES) cell, genetic engineering, bioresource, interleukin (IL)  
ノックアウトマウス, 胚性幹 (ES) 細胞, 発生工学, バイオリソース, インターロイキン (IL)

---

#### はじめに

近年, 遺伝子改変マウスは基礎医学研究をはじめとする様々な生物学の研究に当然のごとく使われる「ツール」となっている。その中でも特に, ノックアウト (KO) マウスの普及は, 医学・生物学研究のあり方を変えてしまったと言っても過言ではない。実際, KO マウスの作製技術を確立した Evans, Capecchi と Smithies の3博士には, 2007年ノーベル生理学・医学賞が与えられるなど, その貢献は科学界全体で認められるところである。遺伝子改変マウスを用いた研究は, 技術の確立から20年の間に急速な発展を見せたが, 今後はどう展開していくのであろうか。

本稿では, 私が東京大学医科学研究所の岩倉洋一郎教授 (現・東京理科大学生命医科学研究所教授) の下で行ってきた KO マウスの作製プロジェクトおよび国際 KO マウスプロジェクト, さらに発生工学技術の現状について概説したい。

#### I 岩倉研究室での KO マウス作製プロジェクト

東京大学医科学研究所の岩倉洋一郎教授の研究室では, 田川陽一博士が最初にインターフェロン (IFN) -

$\gamma$  遺伝子 KO マウスの作製に成功して以来<sup>1)</sup>, 外部の研究者に対しても共同研究という形で KO マウス作製を進めていた。2002年, 当時 KO マウス作製プロジェクトを担当していた助手の宝来玲子先生の NIH への留学に伴い, 学位取得と同時に助手のポジションを引き継ぐという形で作製プロジェクトを担当することになった。当時, 私が取りまとめるターゲット ES 細胞樹立を担うチームと, 須藤カツ子博士率いるキメラマウス作製を中心とした胚操作チームで発生工学グループを形成し, 次々と KO マウスを樹立していった。岩倉研究室では2012年3月の岩倉教授の東大定年退職までに総計98アレルの KO マウスの樹立に成功してきたが, その中で私が担当したおよそ9年の間に外部の研究者向けとしては27アレルの KO マウスを樹立した。そして2012年11月現在, そのうち15アレルについて論文発表がなされている (表1)<sup>2)-14)</sup>。岩倉研究室自体は感染・炎症・免疫と発生学を中心に研究を進めていた研究室であったが, 共同研究としては学内外を問わずあらゆる分野の研究者の要望に応じて作製を行っていたのが特徴である。

一方, 1998年にそれまでの実験動物研究施設からヒト疾患モデル研究センターへの改組に伴い, 遺伝子改変マウスをバイオリソースとして積極的に活用する取り組み, すなわち, 論文発表済みの系統についての情報公開と遺伝子改変マウスの配布事業も取り組んで来

---

別刷請求先: 角田 茂 〒113-8657  
東京都文京区弥生1-1-1 東京大学大学院農学生命科学研究科  
獣医実験動物学講座

表 1 共同研究で作製して論文報告された KO マウス

研究領域	系統名	遺伝子シンボル	表現型	研究責任者	文献
脳・神経系	ALS2 KO	<i>Als2</i> <sup>tm1Jei</sup>	遺伝性筋萎縮性側索硬化症モデル	池田穰衛	2
	Dok7 KO	<i>Dok7</i> <sup>tm1Yyam</sup>	DOK7型筋無力症モデル	山梨裕司	3
	PTP-MEG KO	<i>Ptpn4</i> <sup>tm1Tya</sup>	運動学習能力と小脳シナプス可塑性の減弱	山本雅	4
	NR2A-Y1325F	<i>Grin2a</i> <sup>tm1.1Tnk</sup>	抗うつ	中澤敬信	5
	Nyap1 KO Nyap2 KO Nyap3 KO	<i>6430598a04rik</i> <sup>tm1Tya</sup> <i>9430031j16rik</i> <sup>tm1Tya</sup> <i>Myo16</i> <sup>tm1Tya</sup>	3重欠損により脳萎縮および神経突起伸長の減弱	山本雅	6
代謝・内分泌系	MC2R KO	<i>Mc2r</i> <sup>tm1Dchl</sup>	家族性糖質コルチコイド欠損モデル	久保光正	7
	IRS-1 conditional	<i>Irs1</i> <sup>tm2Tka</sup>	インスリンシグナル解析ツール	門脇孝	8
	Vaspin KO	<i>Serpina12</i> <sup>tm1Jwa</sup>	ER ストレス増強による耐糖能異常	和田淳	9
感染・免疫系	LGP2 KO	<i>Dhx58</i> <sup>tm1Gnb</sup>	ウイルス感染防御機能の異常	Glen N Barber	10
	Tecpr KO	<i>Tecpr1</i> <sup>tm1Csa</sup>	赤痢菌侵入時のオートファジー異常	笹川千尋	11
発生系	Kid KO	<i>Kif22</i> <sup>tm1.1Tya</sup>	染色体分配異常	山本雅	12
	cPGE2 KO	<i>Ptges3</i> <sup>tm1Nkt</sup>	呼吸器系異常による新生仔致死	中谷良人	13
腫瘍系	ANA KO	<i>Btg3</i> <sup>tm1Tya</sup>	肺がん発症率上昇	山本雅	14

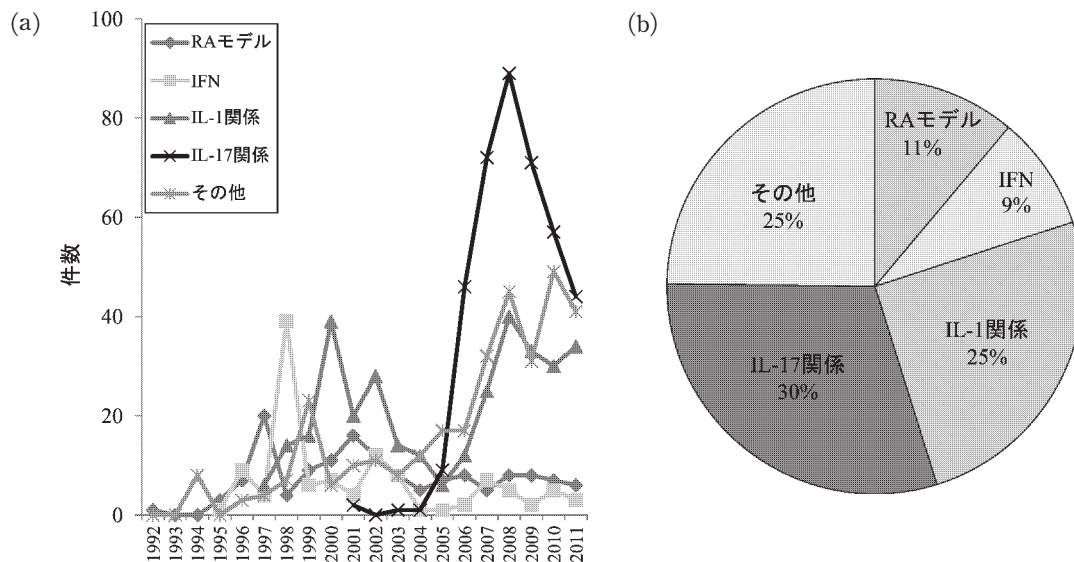


図 1 岩倉研究室における KO マウスの分与件数

RA モデル (HTLV-I Tg, IL-1ra KO), IFN (IFN- $\gamma$  KO), IL-1関係 (IL-1 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\alpha/\beta$  KO), IL-17関係 (IL-17A, F, A/F KO), およびその他 (TNF $\alpha$  KO, IL-6 KO) のマウスの(a)分与件数の推移 (1992~2011年) と(b)その割合。

た。現在では、理化学研究所バイオリソースセンター (BRC) や熊本大学生命資源研究・支援センター (CARD) などの専門の機関が日本国内にも立ち上がっているが、当時としては画期的な試みであった。初期はIFN- $\gamma$ KOマウス<sup>1)</sup>とインターロイキン (IL) -1  $\alpha/\beta$ KO マウス<sup>5)</sup>に加えて、BALB/c 背景の IL-1レセプターアンタゴニスト (ra) KO マウス<sup>16)</sup>とヒト成

人T細胞白血病ウイルス (HTLV) -I トランスジェニック (Tg) マウス<sup>17)</sup>といった関節リウマチモデルマウスが中心であったが、2006年以降は IL-17KO マウス<sup>18)</sup>が主流となり、多くの研究者に利用されている (図 1)。2012年 3 月の岩倉洋一郎教授の東京大学定年退職に伴い、医科学研究所のラボは完全解散となったが、東京理科大学生命医科学研究所に異動し、規模は



図2 ノックアウトマウスプロジェクト立ち上げ時の海外視察

2009年10月、北米のノックアウトマウスプロジェクトについて海外視察を行った。写真はManitoba Institute of Cell Biologyにて。カナダのプロジェクトNorCOMMの責任者Geoff Hicks博士（右から3人目）と山村研一団長（右から2人目）、そして岩倉洋一郎教授の代理で参加した筆者（左から3人目）。

縮小したものの、現在でも一部の系統についてバイオリソース事業を継続している。残りのうち112系統を理化学研究所BRCに寄託作業を行い、現在、BRCから公開・配布が開始されている。

## II 網羅的ノックアウトマウス作製プロジェクトの展開

しかし、世界に目を向けてみると、我々の研究は規模から言えば“家内制手工業”の域を出ず、世界はまさに「産業革命」の如き状況となっている。

KOマウス作製技術が完全に確立したこと、そして何よりポスト・ゲノム解析として遺伝子の機能の解析のステージに入ったことが追い風となり、ヨーロッパ(EUCOMM: European Conditional Mouse Mutagenesis Program)とアメリカ(CSDとRegeneron, TIGM)、カナダ(NorCOMM: North American Conditional Mouse Mutagenesis Project)が参加する国際コンソーシアム(IKMC: International Knockout Mouse Consortium)が結成され、網羅的KOマウス(ES細胞クローン)作製を行う国際プロジェクトが2006年にスタートした<sup>19)</sup>。このプロジェクトにより、本稿執筆時点(2012年11月)で既に18,099遺伝子の変異ESクローンが作製され、HPに公開、研究者への提供が行われている。これらにより、既に予測されている遺伝子の大部分の変異ES細胞ができたことになる。まさにカネとマンパワーにモノを言わせた力技の世界である。ただし、全遺伝子のKOマ

ウスを作製するとなると、莫大な費用と巨大な飼育施設が必要となるなど、さすがに現実的ではない。そのため、個体化まで終了した系統は2,023遺伝子に留まっている。

このような中、我が国においても熊本大学(代表・山村研一副学長)を中心として東京大学(代表・岩倉洋一郎教授)および大阪大学(代表・岡部勝教授)の3大学連携で2009年に計画が小規模ながらスタートした(図2)。さらに2011年、この3大学に九州大学、筑波大学、京都大学、理化学研究所を加えた7つの組織が共同で、「先進的医学研究のための遺伝子改変動物研究コンソーシアムの設立」計画を提案、実現化を目指している。この中では、研究者コミュニティの要望を取り入れながら疾患に関連した2,000遺伝子を選別し、遺伝子変異マウス(ラット)を作製、新たな治療法開発への手がかりを得ることを目的としている。医学研究に特化し、かつ個体化を行い解析とセットで進める点で海外と差別化を図っている。しかしながら、昨今の厳しい財政事情のため、実現はかなり厳しい状況となっている。

なお、世界の流れは既に網羅的に「作る」から網羅的に「解析する」のステージに突入しており、2010年にGenentech社が表現型解析までセットにした472系統におよぶ分泌/膜型KOマウスライブラリーの構築を報告<sup>20)</sup>したのに引き続いて、2011年には国際マウス表現型解析コンソーシアム(IMPC: International Mouse Phenotyping Consortium)がスタートしてい



る<sup>21)</sup>。IKMCで開発したKOマウスについて、マウス表現型解析パイプラインによって共通基準による網羅的な表現型解析を行い、その結果をデータベース化し、世界中の研究者に情報とKOマウスを提供する計画となっている。なお、日本では理化学研究所バイオリソースセンターが参画している。2016年までに5,000系統が目標となっており、極めて大規模なプロジェクトであると言える。

### Ⅲ KOマウス解析から見えてきた遺伝的背景の重要性

KOマウスプロジェクトの中で昨年発足した国際マウス表現型解析コンソーシアムでは網羅的な表現型解析が進行中であるが、この中ではC57BL/6Nを標準系統とするなど、世界的にはC57BL/6という近交系マウスに偏向した解析が進められようとしている。しかしながら、近交系マウスで解析する以上、特定の遺伝子セットの中での機能を解析しているに過ぎない。

それに対して私たちは、古典的な実験動物学の立場からC57BL/6以外の遺伝的背景でも解析を行うことを基本として研究を進めてきた。そのきっかけとなったのは、岩倉教授が開発した関節リウマチモデルHTLV-I Tgマウスであった。HTLV-I Tgマウスは当初C3H/HeNで作製されたが、関節リウマチの発症率は40%程度であった。しかし、C57BL/6J、BALB/cAにそれぞれ戻し交配を行ったところ、C57BL/6Jでは全く発症せず、逆にBALB/cAでは80%以上の発症率となるなど、疾患発症は遺伝的背景の影響を強く受けることを見出した<sup>22)</sup>。同様にIL-1ra KOマウスは、当初作製・解析した129\*B6交雑やC57BL/6J背景では削瘦<sup>23)</sup>や脱肛の自然発症といった表現型であるのに対して、BALB/cA背景ではリウマチ様関節炎<sup>16)</sup>や血管炎<sup>24)</sup>、乾癬様皮膚炎<sup>25)</sup>といった多彩な自己免疫様疾患を自然発症する(図3)<sup>26)</sup>。また、感染に対する感受性も系統によって大きく異なり、私たちの作出したIL-17A/F二重欠損マウスは黄色ブドウ球菌の日和見感染により鼻膿瘍を形成するが(図4)<sup>27)</sup>、これは129\*B6交雑やC57BL/6J背景の場合であり、BALB/cA背景では黄色ブドウ球菌に対する感受性はやや高くなるものの膿瘍形成には至らない。

このように、背景遺伝子により表現型は大きく異なる場合があり、C57BL/6背景でのみの解析で、遺伝子の機能を評価してしまうのは早計である。ちなみに、

このような表現型の違いの原因となる背景遺伝子の探索は、遺伝子機能の解析において重要である。岩倉研でも90年代後半に西城忍博士(現・千葉大真菌医学センター)が中心となって、HTLV-I Tgマウスの系を用いてBALB/cとC57BL/6の関節リウマチ発症に影響を及ぼす背景遺伝子のポジショナルクローニングを試みた。しかし、QTL解析により複数の候補領域があることまでは確認できたものの、責任遺伝子の同定には至らなかった。まだマウスゲノム配列が未解読の時代であったことから、シーケンス技術やデータベースが充実した現在に比べるとその労力は比較にならず、逆遺伝学(reverse genetics)を主戦場とする我々には荷が重いプロジェクトであった。最近、UTHSCのGuらの研究グループにより、岩倉研で樹立したBALB/cA背景のIL-1ra KOマウスを用いて、DBA/1背景(コラーゲン誘導関節炎感受性であるが、関節リウマチは自然発症しない系統)を対照とした背景遺伝子のポジショナルクローニングの試みがなされており、関節炎発症を規定する責任遺伝子が明らかになりつつある<sup>28)</sup>。マウス系統一塩基多型(SNP)データベースを駆使して研究が行われており、この10数年の研究基盤の充実ぶりには感服する思いである。

このようにKOマウスの解析において遺伝的背景は極めて重要である。この点に注目し、日本版KOマウスプロジェクトの中で熊本大CARDのグループは、日本オリジナルのリソースである日本産野生マウスMSM/Ms系統の利用を進めており、既にES細胞の樹立も完了している<sup>29)</sup>。MSM/Msは一般的な実験用マウスと遺伝的に大きく異なっており、新しい遺伝子機能の発見に有用であると考えられている。しかしながら、MSM/Msは俊敏かつ攻撃的でありハンドリングが極めて難しいことから、一般の研究者への普及は困難であることも予想されている。

### Ⅳ 今後のKOマウスの展望：コンディショナルKO

IKMCにおいては、網羅的にコンディショナルKOマウスを作ることを標榜している<sup>30)</sup>。コンディショナルKOとは、Cre/loxPシステムに代表される配列特異的組換え酵素(SSR: site-specific recombinase)を用いて、細胞種特異的あるいは時期特異的に標的遺伝子で組換えを起こさせKOする方法である(図5)<sup>31)</sup>。すなわち、特徴的な8塩基のコア配列の両側に13塩基のパリンドローム様繰り返し配列を持つ

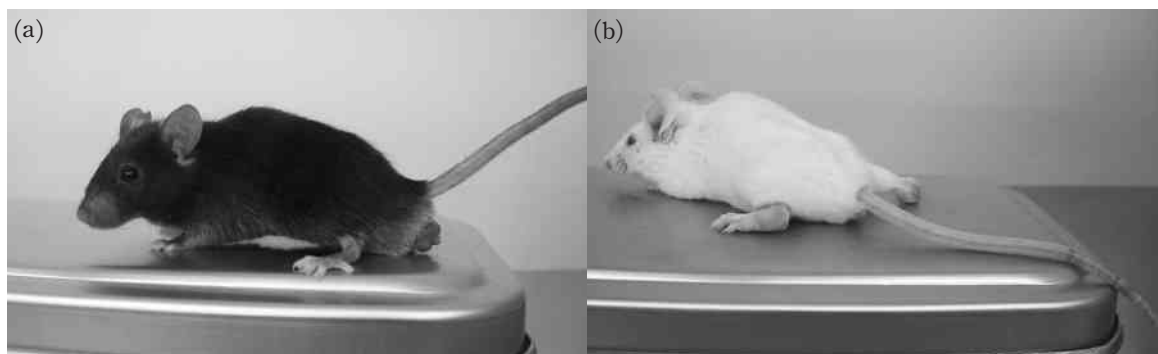


図3 C57BL/6J および BALB/cA 背景の IL-1ra KO マウス

(a) C57BL/6J背景では消瘦および脱肛が認められ、(b) BALB/cA背景ではリウマチ様関節炎と乾癬様皮膚炎を自然発症する。

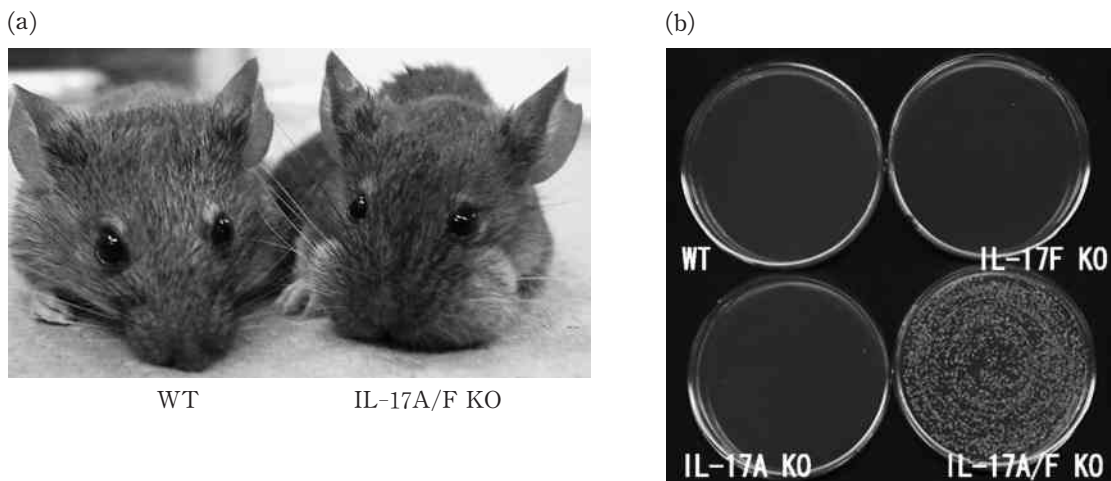


図4 IL-17A/F KO マウスにおける黄色ブドウ球菌の日和見感染

129\*B6交雑系統の IL-17A/F KO マウスに発症した(a)鼻部腫脹と(b)その膿瘍病変部位から分離された黄色ブドウ球菌

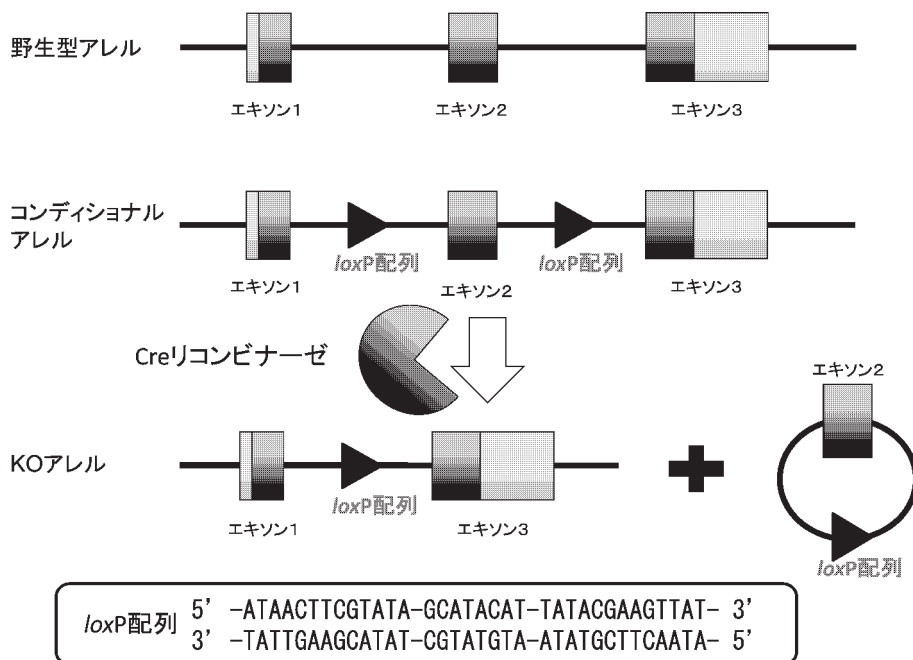


図5 Cre/*loxP* システムを用いたコンディショナル KO の原理

*loxP* 配列を標的遺伝子のエクソンを挟むように挿入したコンディショナルアレルに Cre リコンビナーゼが作用すると組換えが生じ、KO アレルが生み出される。

*loxP* 配列を標的遺伝子の必須エクソンを挟むように挿入（コンディショナルアレル）しておく、バクテリオファージ P1由来 SSR Cre リコンビナーゼを発現したときのみ組換えが生じ、KO 状態になる。また、エストロジェン受容体のリガンド結合部位（変異型）との融合型 Cre を用いることにより、合成ステロイドを投与したときのみ Cre 組換え酵素が核移行し、時期特異的に KO 遺伝子座が生じる誘導型システムも開発されている<sup>32)</sup>。なお、こうしたコンディショナル KO マウスを用いた実験の鍵は、いかに自分の実験目的に適合した Cre ドライバースマウスを入手するかに掛かっているが、世界中でデータベース化が積極的に進められており<sup>33)</sup>、以前より格段に入手し易い状況になりつつある。

さらに近年、Cre リコンビナーゼや *loxP* 配列の改良が精力的に進められており、N末端とC末端を分割し制御配列を付加した“Split-Cre”を別々のプロモーターによって発現させることによりダブルポジティブ細胞でのみ組換えを起こさせる方法<sup>34)35)</sup>や、マイクロサテライト不安定性を利用した体細胞突然変異モザイク発現型 Cre<sup>36)37)</sup>が開発されたほか、変異 *lox* 配列を利用したモザイク発現系<sup>38)</sup>など、多様な研究への応用が期待されている。

また、Cre リコンビナーゼ以外にもほ乳類細胞内で機能する SSR が次々開発されており、Flp/FRT、Dre/*rox* システム<sup>39)</sup>が既に実用化されている。また、 $\phi$ C31インテグラーゼ/偽 attP 部位による部位特異的遺伝子挿入システム<sup>40)</sup>も応用価値が高いと思われる。これらの技術を組み合わせることにより、*in vivo* により詳細に遺伝子機能を評価できると期待される<sup>41)</sup>。

### V 今後の遺伝子改変動物の展望：第二世代遺伝子ターゲティング技術の開発

相同組換え技術に基づいた標的遺伝子変異の場合、基本的にはES細胞を介しないとKO動物の作製はできない。しかし近年、ZFNs (Zinc-Finger Nucleases) を用いた全く異なる方法論による標的遺伝子破壊法がほ乳類動物において実用化された (図6)<sup>42)</sup>。

Cys<sub>2</sub>-His<sub>2</sub> Zinc-Finger はおよそ30アミノ酸からなり Zn<sup>2+</sup>依存的に3塩基対 (5'-RNN) を認識するドメインで、ほ乳類の場合、全遺伝子の約2% (4,000ドメイン/700タンパク) に存在することが知られている。これら Zinc-Finger ドメインを認識配列ごとに整理し、制限酵素 (FokI) と組み合わせることにより、標的配列特異的制限酵素“ZFNs”を作り出すことができるようになった。これを細胞内に導入すると

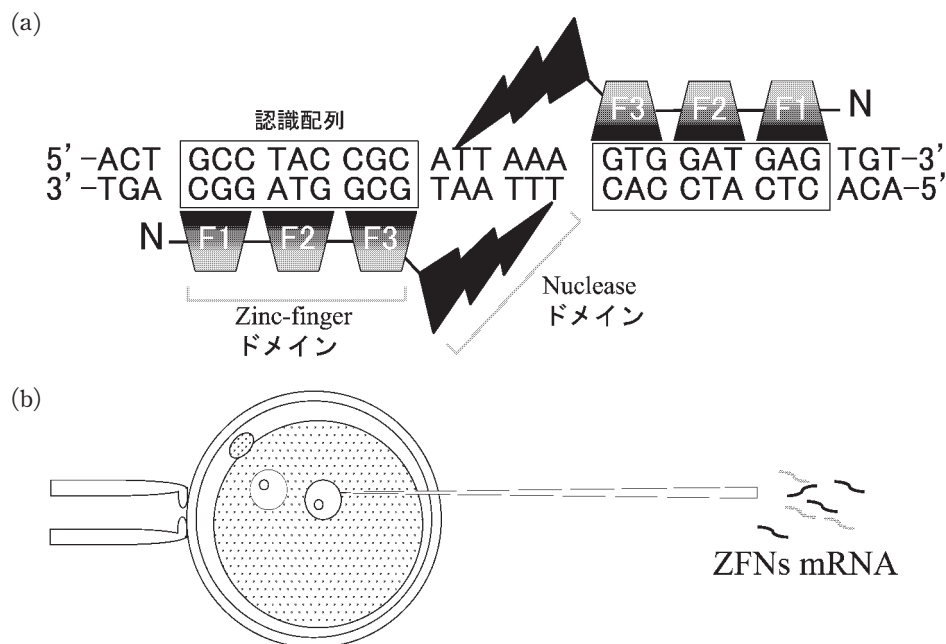


図6 ZFNsの原理と受精卵へのマイクロインジェクション法

(a) ZFNsの原理。3塩基対ずつ認識する Zinc-finger ドメイン (F1~3) と Nuclease ドメインをタンデムに配置した人工制限酵素を作製することにより標的遺伝子座に二重鎖切断を引き起こさせる。(b) 2種類の ZFNs mRNA を受精卵にマイクロインジェクションすることにより遺伝子破壊動物を作出する。

標的配列部位に二重鎖切断を導入し、その修復過程で変異（欠損）を導入することができる。そして、受精卵への ZFNs mRNA のマイクロインジェクションができれば標的遺伝子変異動物を作出することができるようになり、マウス以外の動物での KO 動物作出に大きく道を開くことになった。

近年、さらに塩基認識ドメインが 1 塩基認識となっている植物病原性細菌 *Xanthomonas* 由来の TAL-effector ドメインを用いた TALENs (TAL effector nucleases) 標的遺伝子破壊法も開発されている<sup>43)</sup>。TALENs は認識配列に制約がないことから ZFNs よ

りも使い勝手がよいと考えられ、今後利用が拡大していく可能性が高いと考えている。

上述した技術以外にも、点変異やレポーター遺伝子を導入するノックイン技術や、双方を組み合わせたコンディショナルノックイン技術など<sup>44)</sup>、発生工学技術の進歩により、さらに複雑なことが可能となってきている。そして一般の研究者にとっても作製あるいは入手が格段に容易となっている<sup>45)</sup>。ES 細胞が生み出した「KO マウス」は、生命科学・基礎医学分野で今後ますます重要な役割を担うようになると思われる。

## 文 献

- 1) Tagawa Y, Sekikawa K, Iwakura Y : Suppression of concanavalin A-induced hepatitis in IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> mice, but not in TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup> mice: role for IFN- $\gamma$  in activating apoptosis of hepatocytes. *J Immunol* 159 : 1418-1428, 1997
- 2) Hadano S, Benn SC, Kakuta S, Otomo A, Sudo K, Kunita R, Suzuki-Utsunomiya K, Mizumura H, Shefner JM, Cox GA, Iwakura Y, Brown RH Jr, Ikeda JE : Mice deficient in the Rab5 guanine nucleotide exchange factor ALS2/alsin exhibit age-dependent neurological deficits and altered endosome trafficking. *Hum Mol Genet* 15 : 233-250, 2006
- 3) Okada K, Inoue A, Okada M, Murata Y, Kakuta S, Jigami T, Kubo S, Shiraishi H, Eguchi K, Motomura M, Akiyama T, Iwakura Y, Higuchi O, Yamanashi Y : The muscle protein Dok-7 is essential for neuromuscular synaptogenesis. *Science* 312 : 1802-1805, 2006
- 4) Kina S, Tezuka T, Kusakawa S, Kishimoto Y, Kakizawa S, Hashimoto K, Ohsugi M, Kiyama Y, Horai R, Sudo K, Kakuta S, Iwakura Y, Iino M, Kano M, Manabe T, Yamamoto T : Involvement of protein-tyrosine phosphatase PTPMEG in motor learning and cerebellar long-term depression. *Eur J Neurosci* 26 : 2269-2278, 2007
- 5) Taniguchi S, Nakazawa T, Tanimura A, Kiyama Y, Tezuka T, Watabe AM, Katayama N, Yokoyama K, Inoue T, Izumi-Nakaseko H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y, Umemori H, Inoue T, Murphy NP, Hashimoto K, Kano M, Manabe T, Yamamoto T : Involvement of NMDAR2A tyrosine phosphorylation in depression-related behaviour. *EMBO J* 28 : 3717-3729, 2009
- 6) Yokoyama K, Tezuka T, Kotani M, Nakazawa T, Hoshina N, Shimoda Y, Kakuta S, Sudo K, Watanabe K, Iwakura Y, Yamamoto T : NYAP : a phosphoprotein family that links PI3K to WAVE1 signalling in neurons. *EMBO J* 30 : 4739-4754, 2011
- 7) Chida D, Nakagawa S, Nagai S, Sagara H, Katsumata H, Imaki T, Suzuki H, Mitani F, Ogishima T, Shimizu C, Kotaki H, Kakuta S, Sudo K, Koike T, Kubo M, Iwakura Y : Melanocortin 2 receptor is required for adrenal gland development, steroidogenesis, and neonatal gluconeogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 : 18205-18210, 2007
- 8) Kubota N, Kubota T, Itoh S, Kumagai H, Kozono H, Takamoto I, Mineyama T, Ogata H, Tokuyama K, Ohsugi M, Sasako T, Moroi M, Sugi K, Kakuta S, Iwakura Y, Noda T, Ohnishi S, Nagai R, Tobe K, Terauchi Y, Ueki K, Kadowaki T : Dynamic functional relay between insulin receptor substrate 1 and 2 in hepatic insulin signaling during fasting and feeding. *Cell Metab* 8 : 49-64, 2008
- 9) Nakatsuka A, Wada J, Iseda I, Teshigawara S, Higashio K, Murakami K, Kanzaki M, Inoue K, Terami T, Katayama A, Hida K, Eguchi J, Horiguchi CS, Ogawa D, Matsuki Y, Hiramatsu R, Yagita H, Kakuta S, Iwakura Y, Makino H : Vaspin is an adipokine ameliorating ER stress in obesity as a ligand for cell-surface GRP78/MTJ-1 complex. *Diabetes* 61 : 2823-2832, 2012
- 10) Venkataraman T, Valdes M, Elsby R, Kakuta S, Caceres G, Saijo S, Iwakura Y, Barber GN : Loss of DExD/H box



- RNA helicase LGP2 manifests disparate antiviral responses. *J Immunol* 178 : 6444-6455, 2007
- 11) Ogawa M, Yoshikawa Y, Kobayashi T, Mimuro H, Fukumatsu M, Kiga K, Piao Z, Ashida H, Yoshida M, Kakuta S, Koyama T, Goto Y, Nagatake T, Nagai S, Kiyono H, Kawalec M, Reichhart JM, Sasakawa C : A Tecpr1-dependent selective autophagy pathway targets bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* 9 : 376-389, 2011
  - 12) Ohsugi M, Adachi K, Horai R, Kakuta S, Sudo K, Kotaki H, Tokai-Nishizumi N, Sagara H, Iwakura Y, Yamamoto T : Kid-mediated chromosome compaction ensures proper nuclear envelope formation. *Cell* 132 : 771-782, 2008
  - 13) Nakatani Y, Hokonohara Y, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y, Kudo I : Knockout mice lacking cPGES/p23, a constitutively expressed PGE2 synthetic enzyme, are peri-natally lethal. *Biochem Biophys Res Commun* 362 : 387-392, 2007
  - 14) Yoneda M, Suzuki T, Nakamura T, Ajima R, Yoshida Y, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y, Shibutani M, Mitsumori K, Yokota J, Yamamoto T : Deficiency of antiproliferative family protein Ana correlates with development of lung adenocarcinoma. *Cancer Sci* 100 : 225-232, 2009
  - 15) Horai R, Asano M, Sudo K, Kanuka H, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M, Iwakura Y : Production of mice deficient in genes for interleukin (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\alpha/\beta$ , and IL-1 receptor antagonist shows that IL-1 $\beta$  is crucial in turpentine-induced fever development and glucocorticoid secretion. *J Exp Med* 187 : 1463-1475, 1998
  - 16) Horai R, Saijo S, Tanioka H, Nakae S, Sudo K, Okahara A, Ikuse T, Asano M, Iwakura Y : Development of chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in interleukin 1 receptor antagonist-deficient mice. *J Exp Med* 191 : 313-320, 2000
  - 17) Iwakura Y, Tosu M, Yoshida E, Takiguchi M, Sato K, Kitajima I, Nishioka K, Yamamoto K, Takeda T, Hatanaka M, Yamamoto H, Sekiguchi T : Induction of inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in mice transgenic for HTLV-I. *Science* 253 : 1026-1028, 1991
  - 18) Nakae S, Komiyama Y, Nambu A, Sudo K, Iwase M, Homma I, Sekikawa K, Asano M, Iwakura Y : Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses. *Immunity* 17 : 375-387, 2002
  - 19) [http : //www.knockoutmouse.org](http://www.knockoutmouse.org)
  - 20) Tang T, Li L, Tang J, Li Y, Lin WY, Martin F, Grant D, Solloway M, Parker L, Ye W, Forrest W, Ghilardi N, Oravec T, Platt KA, Rice DS, Hansen GM, Abuin A, Eberhart DE, Godowski P, Holt KH, Peterson A, Zambrowicz BP, de Sauvage FJ : A mouse knockout library for secreted and transmembrane proteins. *Nat Biotechnol* 28 : 749-755, 2010
  - 21) [http : //www.mousephenotype.org](http://www.mousephenotype.org)
  - 22) Iwakura Y, Saijo S, Kioka Y, Nakayama-Yamada J, Itagaki K, Tosu M, Asano M, Kanai Y, Kakimoto K : Autoimmunity induction by human T cell leukemia virus type 1 in transgenic mice that develop chronic inflammatory arthropathy resembling rheumatoid arthritis in humans. *J Immunol* 155 : 1588-1598, 1995
  - 23) Matsuki T, Horai R, Sudo K, Iwakura Y : IL-1 plays an important role in lipid metabolism by regulating insulin levels under physiological conditions. *J Exp Med* 198 : 877-888, 2003
  - 24) Matsuki T, Isoda K, Horai R, Nakajima A, Aizawa Y, Suzuki K, Ohsuzu F, Iwakura Y : Involvement of tumor necrosis factor-alpha in the development of T cell-dependent aortitis in interleukin-1 receptor antagonist-deficient mice. *Circulation* 112 : 1323-1331, 2005
  - 25) Nakajima A, Matsuki T, Komine M, Asahina A, Horai R, Nakae S, Ishigame H, Kakuta S, Saijo S, Iwakura Y : TNF, but not IL-6 and IL-17, is crucial for the development of T cell-independent psoriasis-like dermatitis in *Il1rn*<sup>-/-</sup> mice. *J Immunol* 185 : 1887-1893, 2010
  - 26) Ishigame H, Nakajima A, Saijo S, Komiyama Y, Nambu A, Matsuki T, Nakae S, Horai R, Kakuta S, Iwakura Y : The role of TNF $\alpha$  and IL-17 in the development of excess IL-1 signaling-induced inflammatory diseases in IL-1 receptor antagonist-deficient mice. *Ernst Schering Res Found Workshop* 56 : 129-153, 2006
  - 27) Ishigame H, Kakuta S, Nagai T, Kadoki M, Nambu A, Komiyama Y, Fujikado N, Tanahashi Y, Akitsu A, Kotaki



- H, Sudo K, Nakae S, Sasakawa C, Iwakura Y : Differential roles of interleukin-17A and -17F in host defense against mucosal bacterial infection and allergic responses. *Immunity* 30 : 108-119, 2009
- 28) Cao Y, Zhang J, Jiao Y, Yan J, Jiao F, Liu X, Williams RW, Hasty KA, Stuart JM, Gu W : Genomic dissection and prioritizing of candidate genes of QTL for regulating spontaneous arthritis on chromosome 1 in mice deficient for interleukin-1 receptor antagonist. *J Genet* 91 : 119-128, 2012
- 29) Araki K, Takeda N, Yoshiki A, Obata Y, Nakagata N, Shiroishi T, Moriwaki K, Yamamura K : Establishment of germline-competent embryonic stem cell lines from the MSM/Ms strain. *Mamm Genome* 20 : 14-20, 2009
- 30) Skarnes WC, Rosen B, West AP, Koutsourakis M, Bushell W, Iyer V, Mujica AO, Thomas M, Harrow J, Cox T, Jackson D, Severin J, Biggs P, Fu J, Nefedov M, de Jong PJ, Stewart AF, Bradley A : A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function. *Nature* 474 : 337-342, 2011
- 31) 角田 茂, 岩倉洋一郎 : コンディショナルターゲットティング法. 松村正實, 山本 雅, 岡崎康司 (編), 改訂第5版新遺伝子工学ハンドブック, pp 297-302, 羊土社, 東京, 2010
- 32) Danielian PS, Muccino D, Rowitch DH, Michael SK, McMahon AP : Modification of gene activity in mouse embryos in utero by a tamoxifen-inducible form of Cre recombinase. *Curr Biol* 8 : 1323-1326, 1998
- 33) Murray SA, Eppig JT, Smedley D, Simpson EM, Rosenthal N : Beyond knockouts : cre resources for conditional mutagenesis. *Mamm Genome* 23 : 587-599, 2012
- 34) Hirrlinger J, Scheller A, Hirrlinger PG, Kellert B, Tang W, Wehr MC, Goebbels S, Reichenbach A, Sprengel R, Rossner MJ, Kirchhoff F : Split-cre complementation indicates coincident activity of different genes *in vivo*. *PLoS One* 4 : e4286, 2009
- 35) Wang P, Chen T, Sakurai K, Han BX, He Z, Feng G, Wang F : Intersectional Cre driver lines generated using split-intein mediated split-Cre reconstitution. *Sci Rep* 2 : 497, 2012
- 36) Akyol A, Hinoi T, Feng Y, Bommer GT, Glaser TM, Fearon ER : Generating somatic mosaicism with a Cre recombinase-microsatellite sequence transgene. *Nat Methods* 5 : 231-233, 2008
- 37) Miller AJ, Dudley SD, Tsao JL, Shibata D, Liskay RM : Tractable Cre-lox system for stochastic alteration of genes in mice. *Nat Methods* 5 : 227-229, 2012
- 38) Livet J, Weissman TA, Kang H, Draft RW, Lu J, Bennis RA, Sanes JR, Lichtman JW : Transgenic strategies for combinatorial expression of fluorescent proteins in the nervous system. *Nature* 450 : 56-62, 2007
- 39) Anastassiadis K, Fu J, Patsch C, Hu S, Weidlich S, Duerschke K, Buchholz F, Edenhofer F, Stewart AF : Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in *E. coli*, mammalian cells and mice. *Dis Model Mech* 2 : 508-515, 2009
- 40) Thyagarajan B, Olivares EC, Hollis RP, Ginsburg DS, Calos MP : Site-specific genomic integration in mammalian cells mediated by phage  $\phi$ C31 integrase. *Mol Cell Biol* 21 : 3926-3934, 2001
- 41) 角田 茂, 岩倉洋一郎 : 発生工学技術による動物個体での遺伝子改変と医学研究. 山本 雅, 仙波憲太郎 (編), 遺伝子工学集中マスター, pp 74-83, 羊土社, 東京, 2006
- 42) Lombardo A, Genovese P, Beausejour CM, Colleoni S, Lee YL, Kim KA, Ando D, Urnov FD, Galli C, Gregory PD, Holmes MC, Naldini L : Gene editing in human stem cells using zinc finger nucleases and integrase-defective lentiviral vector delivery. *Nat Biotechnol* 25 : 1298-1306, 2007
- 43) Miller JC, Tan S, Qiao G, Barlow KA, Wang J, Xia DF, Meng X, Paschon DE, Leung E, Hinkley SJ, Dulay GP, Hua KL, Ankoudinova I, Cost GJ, Urnov FD, Zhang HS, Holmes MC, Zhang L, Gregory PD, Rebar EJ : A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol* 29 : 143-148, 2011
- 44) Bayascas JR, Sakamoto K, Armit L, Arthur JS, Alessi DR : Evaluation of approaches to generation of tissue-specific knock-in mice. *J Biol Chem* 281 : 28772-28781, 2006
- 45) 角田 茂, 岩倉洋一郎 : ノックアウトマウス作製技術の進歩と網羅的作製プロジェクト. *生物工学会誌* 90 : 547-549, 2012

(H 24. 12. 17 受稿)