

## 日獣大オリジナルの GFP トランスジェニックマウスの作製および特性解析

丸山基世<sup>1)</sup>・藤澤正彦<sup>1)</sup>・中垣和英<sup>2)</sup>・羽山伸一<sup>3)</sup>  
 福田孝一<sup>4)</sup>・三好一郎<sup>5)</sup>・田中 実<sup>6)</sup>・袴田陽二<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 日本獣医生命科学大学・獣医保健看護学科・基礎部門

<sup>2)</sup> 日本獣医生命科学大学・獣医学科・感染症学教室

<sup>3)</sup> 日本獣医生命科学大学・獣医学科・野生動物学教室

<sup>4)</sup> 防衛医科大学校・動物実験施設

<sup>5)</sup> 名古屋市立大学大学院医学研究科・病態モデル医学分野・実験動物研究教育センター

<sup>6)</sup> 日本獣医生命科学大学・動物科学科・動物生理制御学教室

**要 約** 今回我々は、医学生物学研究の研究用ツールの開発を目指して、Green Fluorescent Protein (GFP) トランスジェニック (Tg) マウスの作製を行った。BDF1 雌マウスから採取した 250 個の受精卵に CAG プロモーターの下流に GFP 遺伝子を連結した導入遺伝子をマイクロインジェクションし、1 匹の GFP Tg マウスの作出に成功した。発生の各時期における GFP 発現プロファイルを蛍光顕微鏡、非侵襲的な *in vivo* imaging system (IVIS) およびフローサイトメトリーを用いて解析した。GFP Tg マウスの遺伝子型を Real time PCR 法を用いて判定した。GFP の発現は、発生のいずれの時期においても全身性に強く認められた。末梢白血球の GFP 陽性率は 90% 以上と高率であった。Real time PCR 法は、導入遺伝子の遺伝子型を明確に判定することが出来た。本研究により全身性に GFP を強く発現する GFP Tg マウスの作出に成功した。系統化に成功した日獣大オリジナルの GFP Tg マウスは、発生学あるいは幹細胞を利用した再生医学研究等、幅広く医学生物学研究に有用な研究ツールとなる。

**キーワード**：トランスジェニックマウス, GFP, *in vivo* イメージングシステム

日獣生大研報 60, 58-66, 2011.

### 背 景

1980 年に GORDON らがマウスのウイルスの Tk (チミジンキナーゼ) 遺伝子を導入したトランスジェニック (Tg) マウスの作製に世界で初めて成功した<sup>6)</sup>。1982 年にはラット成長ホルモン遺伝子を導入した“スーパーマウス”が作製され、ヒト疾患モデルとして大いに注目を浴びた<sup>18)</sup>。Tg マウスの登場により、遺伝子の配列と生体における機能との関連性、特に遺伝子の時空間的調節を制御しているプロモーター解析が著しく発展した。現在、Tg マウスは生体における遺伝子の機能解析や病気のメカニズム解明あるいは治療開発のための不可欠な研究用ツールとなっている<sup>3)</sup>。

近年、個体レベルでの分子の分布および局在を可視化する技術として非侵襲的なバイオイメーキングシステムが注目されている<sup>9,10,15)</sup>。本法は、疾病の解明や新たな治療法開発への利用にも期待されている<sup>9,10)</sup>。下村脩博士によりオ

ワンクラゲから単離された緑色蛍光タンパク質 GFP (Green Fluorescent Protein) は特異的な励起光を照射するだけで、その発現を可視化できる。GFP は特別な基質や酵素を必要とせずリアルタイムでかつ非侵襲的に遺伝子発現を検出できるためバイオイメーキングシステムのレポータータンパクとして最も広く使用されている蛍光マーカータンパク質の一つである。

この GFP の遺伝子を導入した Tg 動物が、すでにマウス<sup>11,17)</sup>、ラット<sup>7,12,19)</sup>、ウサギ<sup>22,25)</sup>、ブタ<sup>13)</sup> で報告されている。また、2009 年に GFP Tg コモンマーモセットの作出に成功した例が報告され、導入遺伝子が次世代に伝達することを霊長類において世界で初めて明らかにされた<sup>21)</sup>。GFP Tg 動物由来の細胞は増殖してもその蛍光輝度が減弱することがないため、移植研究や細胞療法、幹細胞を利用した再生医療の基礎研究等に広く用いられている<sup>4,14,26)</sup>。

今回の研究は、日獣大オリジナルの移植研究や細胞療法あるいは幹細胞を利用した再生医療など、医学生物学研究

の研究用ツールの開発を目指して GFP Tg マウスを作製し、その特性解析を行った。

## 材料と方法

### 動物

受精卵採取用に 3 週齢の BDF1 雌マウスおよび 12 週齢の BDF1 雄マウスを、受精卵の移植用に 8 週齢の ICR 雌マウスと精管結紮用に 12 週齢の ICR 雄マウスを SLC (株) から購入し、日本獣医生命科学大学生命科学共同利用施設の温度 20~25°C、湿度 40~70%、明期 12 時間/暗期 12 時間の照明制御下の飼育室で飼育した。餌と水は共に自由摂取させた。本実験は日本獣医生命科学大学の動物実験委員会の承認を受け、動物実験規程に従って適正に実施した。

### 導入遺伝子の調整

導入遺伝子は、過去に GFP Wistar Tg ラット<sup>7)</sup> の作製時に用いたものと同じ、CAG プロモーター (cytomegalovirus early enhancer と chicken beta-actin の融合遺伝子) の下流に GFP 遺伝子を連結したものを利用した。定法に従い、精製プラスミドを制限酵素 Sal I および Pst I により切断し直鎖状にしてインジェクション用に使用した。

### 受精卵へのマイクロインジェクション法

3 週齢 BDF1 雌マウスに 7IU/匹の PMSG を腹腔内投与し、48 時間後に 7IU/匹の hCG を同様に投与し、同晩、12 週齢 BDF1 雄マウスと交配させた。翌朝、腔内にプラグを確認した雌マウスの卵管膨大部より受精卵を採取した。定法に従って、マイクロマニピュレーター (DM IRB, ライカマイクロシステムズ, 東京) を用いてマウス受精卵の前核に目的遺伝子をマイクロインジェクションした。インジェクション後、炭酸ガス培養器にて一晩培養し、2 細胞期胚に分裂した卵を移植胚とした。移植用 ICR 雌マウスを移植の前日に精管結紮した ICR 雄マウスと交配させ、翌朝、腔内にプラグを確認した雌マウスを偽妊娠雌マウスとした。偽妊娠雌マウスを同午前中にイソフルラン麻酔下で開腹し、卵管を露出させ、2 細胞期胚を卵管膨大部に移植した。

### GFP 発現解析

胚移植された ICR 雌マウスは自然分娩させ、21 日間哺育させた。離乳時に各個体から尾部組織 (長さ 0.5 mm) を採取し、GFP の発現を蛍光実体顕微鏡 (M205FA, ライカマイクロシステムズ, 東京) にて解析した。GFP 発現個体を正常 BDF1 マウスと交配して、F1 個体を作出し、系統化を計った。GFP 陽性 F1 個体と正常 BDF1 個体を交配して作出した GFP 陽性個体を用いて、各発生段階における GFP の発現を蛍光実体顕微鏡, IVIS<sup>®</sup> Imaging System (Xenogen, Alameda, CA) およびフローサイトメーター (FACS Calibur; Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) にて解析した。

### 遺伝子型判定

GFP 陽性 F1 個体同士を交配して産子を作出し、F2 個体における GFP 遺伝子の遺伝子型を SYBR Green Real-time PCR 法を用いて判定した。桜井らの方法<sup>20)</sup> に従って、各個体の尾組織から抽出した DNA を 50 ng/ $\mu$ l に調整し、TaKaRa SYBR Premix Ex Taq Rox plus (タカラバイオ株式会社, 滋賀) を用いて PCR を行った。プライマーの配列は、Forward primer 5'-ACCACTACCTGAGCAC-CCAGTC-3', Reverse primer 5'-ATCCATGCCGAGAG-TGATCC-3' とした。PCR 反応の増幅条件は、95°C 15 秒、59°C 30 秒、72°C 30 秒を 1 サイクルとして 40 サイクルで行った。サンプル DNA は F2 個体と F0 個体を使用し、陽性コントロールとして既知のヘミ個体 DNA を 2 倍量加えてホモ個体相当とした。Real-time PCR により算出された Ct 値を基に遺伝子型を判別した。

### 統計検定

GFP 発現個体の発現率の統計学的検定にはカイ 2 乗検定を用いた。危険率 5% 以下を有意差ありとした。

## 結果

### GFP Tg マウス作製効率

GFP Tg マウスの作製効率を Table 1 に示した。25 匹の過排卵処理した BDF1 雌マウスから合計 559 個の卵を採取した。そのうち正常な 250 個の受精卵に CAG-GFP 遺伝

Table 1. GFP Tg マウスの作製記録

| 実験群   | ドナー処置数 | 供試胚数 |     |         | レシピエント |     | 産子  |     |     |         |
|-------|--------|------|-----|---------|--------|-----|-----|-----|-----|---------|
|       |        | 採卵数  | 注入数 | 生存率 (%) | 移植数    | 処置数 | 妊娠数 | 出産数 | 離乳数 | Tg数 (%) |
| 1     | 4      | 92   | 40  | 38      | 38     | 1   | 1   | 5   | 0*  | 0       |
| 2     | 6      | 112  | 73  | 68      | 68     | 2   | 1   | 6   | 6   | 0       |
| 3     | 6      | 167  | 69  | 63      | 63     | 2   | 2   | 16  | 14  | 1       |
| 4     | 4      | 102  | 32  | 29      | 29     | 2   | 1   | 5   | 5   | 0       |
| 5     | 5      | 86   | 36  | 32      | 32     | 1   | 0   | -   | -   | -       |
| Total | 25     | 559  | 250 | 230     | 230    | 8   | 5   | 32  | 25  | 1       |
|       |        |      |     | (92%)   |        |     |     |     |     | (0.4%)  |

\*5日齢で全子不明

Table 2. Founder マウスの出産記録

| 出産回数 | 総産子数 | 実測値  |      | 期待値   |      |
|------|------|------|------|-------|------|
|      |      | Tg   | wild | Tg    | wild |
| 1    | 10   | 0    | 10   | 5     | 5    |
| 2    | 9    | 0    | 9    | 4.5   | 4.5  |
| 3    | 8    | 0    | 8    | 4     | 4    |
| 4    | 9    | 0    | 9    | 4.5   | 4.5  |
| 5    | 8    | 0    | 8    | 4     | 4    |
| 6    | 8    | 2    | 6    | 4     | 4    |
|      | 52   | 2*   | 50   | 26    | 26   |
|      |      | (4%) |      | (50%) |      |

百分率は総産子数に対するGFP陽性個体の比率を表している  
\*P<0.05

子を導入し、2細胞期まで正常に発育した230個の卵を8匹のICR雌マウスの卵管に移植した。5匹の雌マウスから32匹の新生子が得られ、25匹が正常に発育し、その内1匹の雌にGFP発現を確認した(0.4%)。このGFP個体をFounder (F0 個体)として正常BDF1成熟雄個体と交配させて系統化を行った。5回までの分娩で44匹の新生子個体を得られたが、何れもGFP発光が陰性であった。6回目の出産で初めて雌雄1匹ずつにGFP発現陽性個体が出現した。6産までのGFP陽性個体の出現率は4%と、低値となり、期待値(50%)との間に有意差が認められた(Table 2)。GFP陽性F1個体と正常個体との交配から生まれるGFP陽性個体の出現率は約50%となった(Data not shown)。

#### GFP 発現プロファイル

GFP陽性F1個体を用いた各発生段階におけるGFP発現プロファイルを図1に示した。GFP陽性雌個体から得られた初期胚は、GFPを発光していた。新生子のGFP発現は、全身性に強く認められた。成熟期におけるGFPの発現は毛のない表皮に強く認められるが、毛はGFPを発現していないことが明らかとなった。GFP陰性の正常個体は何れの発生段階においてもGFP様の非特異な発現は一切認められず、GFP発現が極めて特異性が強いことが明らかとなった。

成熟期のGFP陽性F1個体の主要臓器のGFP発現プロファイルを図2に示した。GFPの発現は特に脾臓、骨格筋で強く、脾臓で弱い傾向が認められた。IVISを用いた蛍光強度の定量結果を図3に示した。定量解析の結果は、蛍光写真の結果と良く一致した。

F0およびF1のGFP陽性個体の末梢白血球を用いたFACS解析の結果を図4に示した。GFP陽性F1個体の末梢白血球のGFP陽性率は96%と極めて高値を示した。一方、GFP陽性F0個体のGFP陽性率は約51%となり、F1個体の約半分値を示した。陰性個体の値は、1%以下であった。

GFPF1個体の骨髄ならびに末梢血塗抹の蛍光写真を図5に示した。骨髄、末梢血の両方にGFP陽性細胞が確認された。末梢赤血球にはGFPの発現を認めなかった。

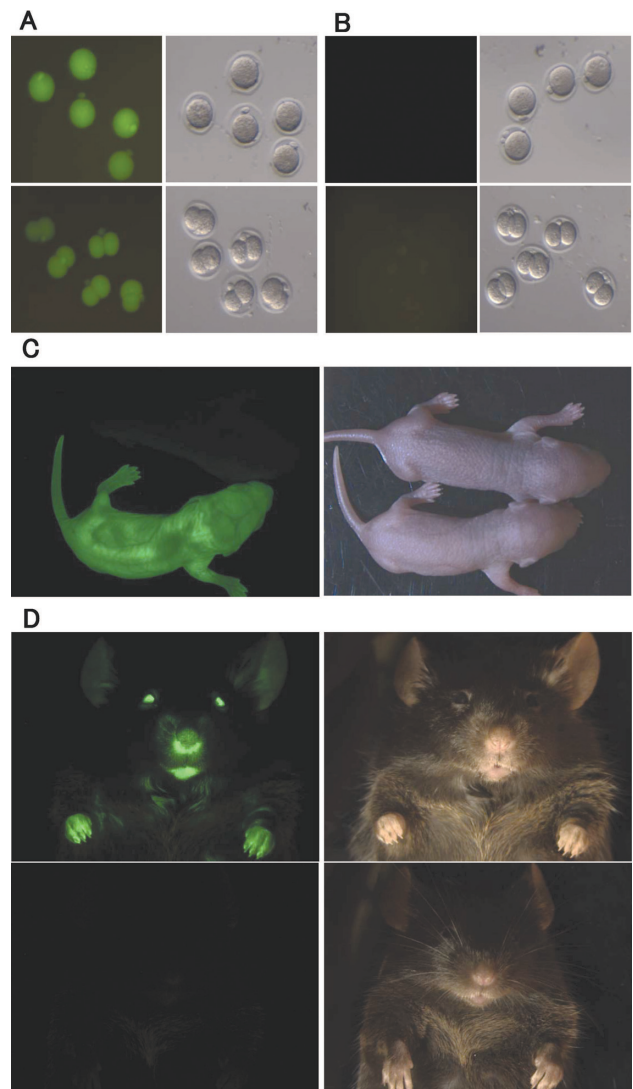


Fig. 1. 発生段階別のGFP発現プロファイル。A: GFP発現陽性F1雌個体由来の1細胞期胚(上段)、2細胞期胚(下段)。B: 正常マウスの初期胚, 1細胞期胚(上段), 2細胞期胚(下段)。C: GFP陽性および同腹陰性F1新生子マウス。D: 成熟期のGFP F1陽性(上段)、陰性(下段)マウス。各サンプルは、蛍光実体顕微鏡を用いて蛍光像(左側)ならびに可視光像(右側)を撮影した。

GFP陰性個体の末梢血にはGFP様の非特異な蛍光発現は認めなかった。

#### GFP 遺伝子型判定

GFP陽性F1個体同士の交配から得られたF2世代の同腹個体から抽出したDNAを用いて行ったSYBR Green Real-time PCRの結果を図6に示した。ヘミ個体の平均Ct値は25.3となり、ホモ個体では24.4を示し、ホモ/ヘミ間のCt値の差はほぼ1サイクルであった。F0 GFP陽性個体のCt値が26.4であった。GFP陰性個体のCt値は32.3となった。

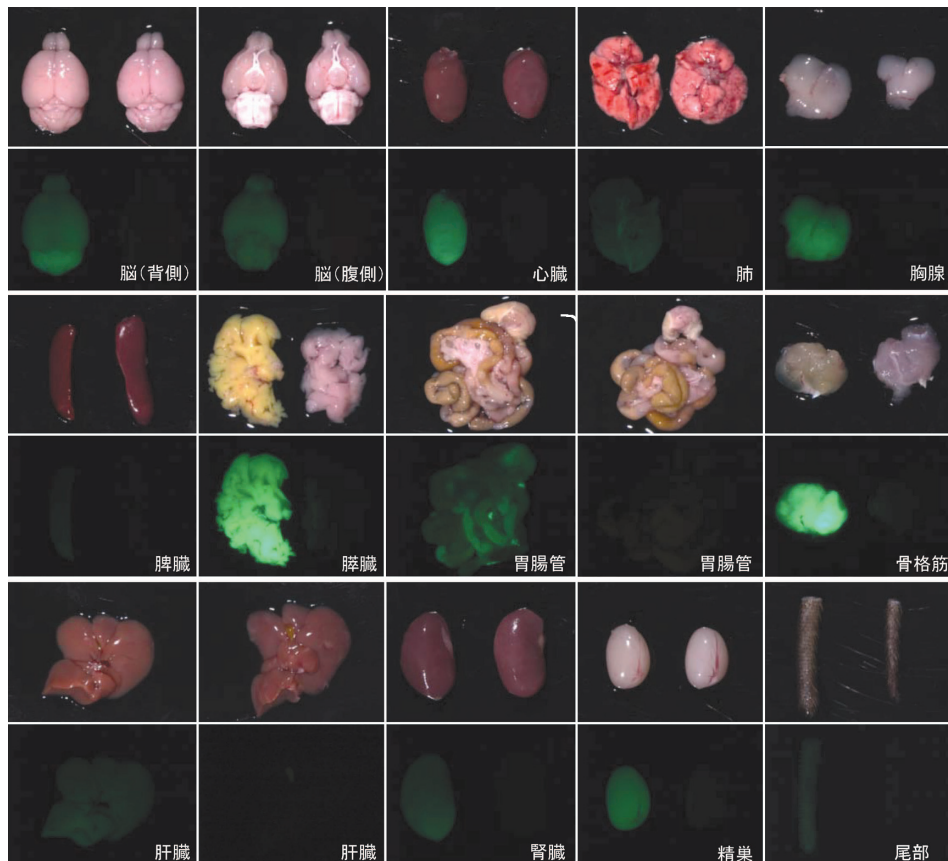


Fig. 2. 主要臓器における GFP 発現プロファイル。成熟期の GFP 陽性 F1 個体ならびに正常個体から主要臓器を摘出し、蛍光実体顕微鏡で蛍光像（下段）ならびに可視光像（上段）を撮影した。

### GFP ホモ個体の GFP 発現プロファイル

GFP 陽性 F1 個体同士の交配から得られた F2 世代の GFP 新生子の GFP 蛍光画像を Fig. 7 に示した。GFP 蛍光は輝度の強いものと、低いものの 2 種類が認められた。Real time PCR の結果、強輝度の個体がホモ型に低輝度がヘミ型に GFP 遺伝子を持つことが判明した。GFP ホモ型個体は、出生後数日以内に死亡した。

### 考 察

生体における遺伝子機能解析ツールとしてトランスジェニック (Tg) 動物の有用性は広く認知されているが、Tg 動物の作製には特別な施設や高度な技術が必要とされるため、必ずしも一般研究用のツールとまでは定着していない。今回、我々は日獣大の既存の施設を利用して Tg 動物作製の実験系の立ち上げを目指して実験を行い、日獣大オリジナルの GFP Tg マウスの系統化に成功した。

作出した GFP Tg マウスの GFP 発現プロファイル解析の結果、初期胚、新生子、成熟個体のいずれの時期においても GFP 発現が確認できた。また、全ての臓器で GFP 発現が観察された。特に心臓、胸腺、膵臓、骨格筋で高い GFP 発現が認められた。今回の発現プロファイルの結果は従来報告されている GFP Tg マウス<sup>17)</sup> や GFP Tg ラッ

ト<sup>12)</sup> とほぼ同様の結果であった。今回の実験では、プロモーターに CAG を使用したため、実績どおりに全身性に GFP を発現することができた。この GFP Tg マウスは、これまでの GFP Tg 動物と同様に移植細胞の遊走あるいは分化増殖の追跡および遺伝子発現観察のよい研究モデルとなることが期待される。本マウスが、学内の再生医学研究に携わる研究者の方々に広く利用され、発展の一助になれば作製者として幸いである。

今回、我々は、GFP 発現の定量化に IVIS を利用した。通常、蛍光タンパクの発現の定量化には難があるとされてきたが、IVIS を利用した蛍光タンパクの定量結果は、各データにばらつきが小さく、その定量の信頼性が明らかとなった。

今回の実験では、Tg マウス作製に前核期受精卵へのマイクロインジェクション法による遺伝子導入を行った。従来、Tg マウスの作製効率は、遺伝子導入した受精卵に対して 1~5% の確率とされているが<sup>16)</sup>、今回の実験では移植した 230 個の受精卵から 1 匹の GFP 陽性個体を作成し、作製効率は約 0.4% と低かった。実は、過去に GFP の毒性を指摘する報告がある<sup>1)</sup>。GFP の毒性により、GFP 陽性個体が生まれにくい可能性が考えられた。

通常は、受精卵前核内に導入された外来遺伝子は雌雄の

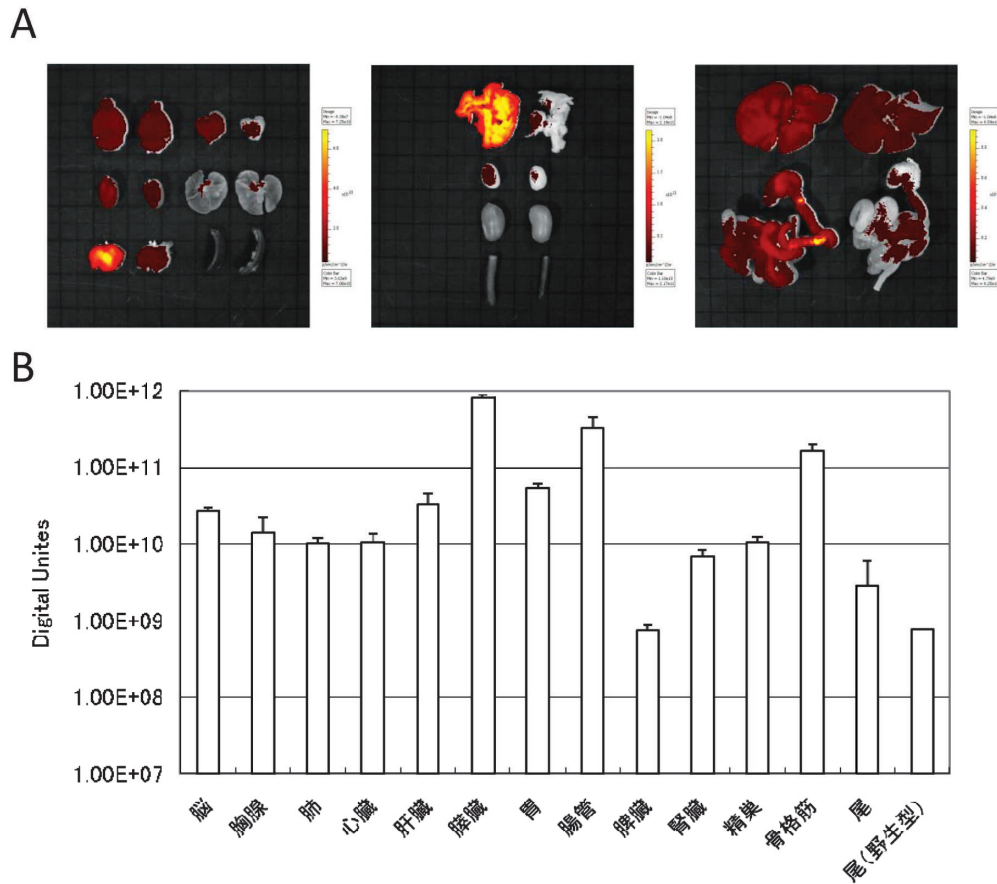


Fig. 3. IVIS を利用した GFP 蛍光発現量の定量化。A : IVIS を利用した蛍光画像。B : IVIS で取得した画像を画像解析ソフトを用いて定量化し, 臓器別にグラフに表した。各データは平均値 $\pm$ 標準偏差 (n=5) を示している。

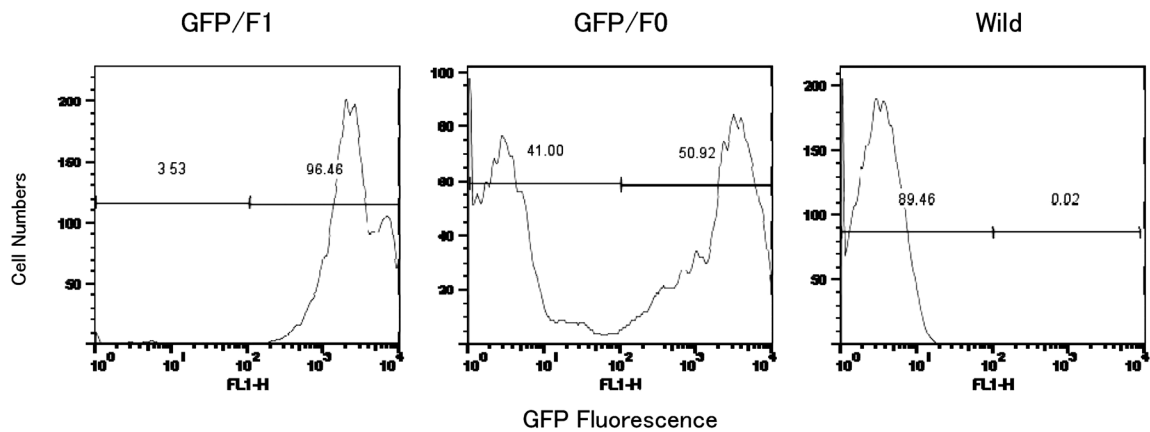


Fig. 4. FACS 解析による末梢白血球の GFP 陽性率。GFP 陽性 F1 個体の GFP 陽性率は約 96% となり, GFP 陰性個体の陽性率は 1% 以下となった。Founder 個体では 51% と低値を示した。

前核が融合する前に宿主 DNA に組み込まれるため, その後の細胞は全てヘミ接合体の状態を導入遺伝子を保有すると考えられている。従って, 遺伝子が導入された F0 個体を, 正常個体と交配させた場合, 目的遺伝子を持つ個体と持たない個体がそれぞれ半数ずつ産まれるはずである。し

かし, 今回の実験では, 1 匹の GFP 陽性 Founder (F0) 個体を種動物として系統化を計ったが, F1 世代における GFP 個体の発現率は当初極めて低かった。FACS 解析において F0 個体の末梢血中の GFP 陽性率は F1 個体と比較して低かった。また, Real time PCR による遺伝子型判定

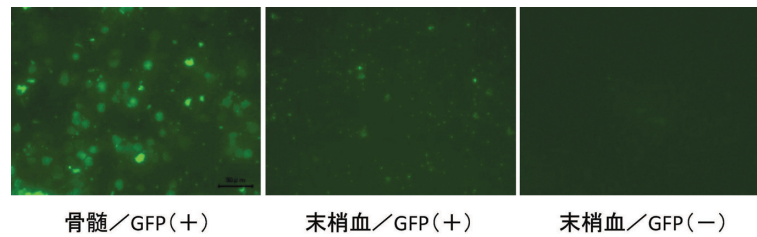


Fig. 5. 骨髄細胞および末梢血における GFP 発現プロファイル。GFP 陽性 F1 個体から採取した骨髄細胞および末梢血を用いて血液塗抹標本を作製し、蛍光顕微鏡で撮影した。GFP Tg マウスの骨髄ならびに末梢血には GFP 陽性細胞が多数含まれた。

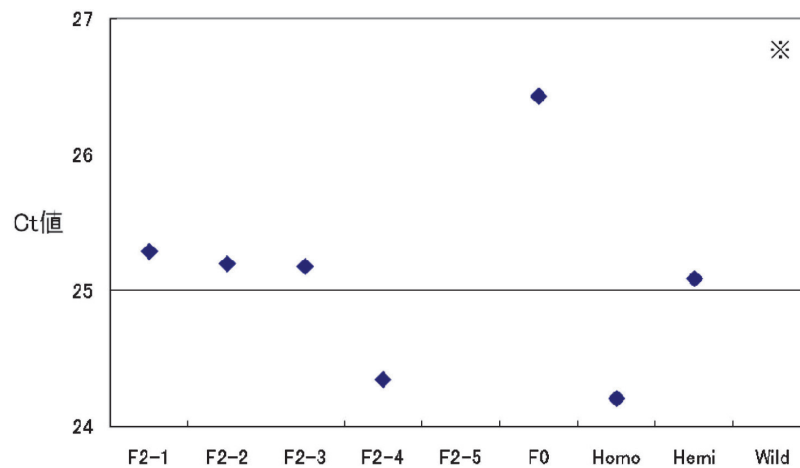


Fig. 6. SYBR Green Real-time PCR を用いた GFP 発現個体の遺伝子型判定。GFP ホモ個体とヘミ個体との Ct 値の差はほぼ 1 となった。GFP 陽性 F0 個体の Ct 値はヘミ個体よりもさらに低値となった。※Wild の Ct 値は 32.25 であるためグラフの範囲外となった。

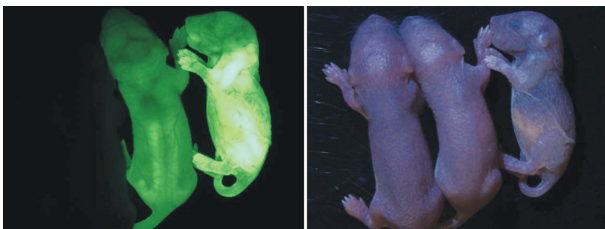


Fig. 7. GFP ホモ個体の GFP 発現プロファイル。雌雄 GFP ヘミ個体間の交配から産出された GFP ホモ個体。GFP ホモ個体は同腹ヘミ個体に比し、GFP の発現輝度が高い。

の結果では、F0 個体の Ct 値はヘミ個体およびホモ個体とそれぞれ比較した場合、1 および 2 サイクルの差がそれぞれあった。以上の結果から、F0 個体は GFP 遺伝子をキメラに持つ個体である可能性が強く示唆された。今回の Founder マウスの生殖腺が何故にキメラ状態になってしまったかに関して、その理由は不明である。従って、6 産目にして GFP 陽性個体が 2 匹生まれたのは、偶然によることである。現在のところ、キメラになる原因として、導

入遺伝子がゲノム染色体に取り込まれる時期が、2 細胞期胚以降に起きたためと想定している。

トランスジェニック動物の系統化には、導入遺伝子の遺伝子型判定は極めて重要である。すなわち、導入遺伝子をホモ型に持つ系統が確立すれば、次世代に生まれる個体はすべて導入遺伝子を持つことになり、世代毎に遺伝子型判定の必要がない。今回の実験では、遺伝子型判定に Real-time PCR 法を使用した。本法は、PCR 法やサザンブロットハイブリダイゼーション、fluorescence in situ hybridization (FISH)、交配実験と比較して非常に簡便かつ正確に行うことができる。Real-time PCR 法は、DNA あるいは RNA の正確な定量が可能であり、電気泳動が不要なため、迅速かつ簡便、またコンタミネーションの危険性が低いなど多くの利点がある<sup>2,8,20,23,24</sup>。今回の実験から、Real-time PCR 法はホモ個体とヘミ個体の遺伝子型判別が正確にできるだけでなく、キメラ個体を判別するのにも有用であることが明らかになった。

GFP はバイオイメーキング用のマーカータンパクとして極めて有効であるとされているが、異種タンパクのため、哺乳動物に発現させた場合、その抗原性が指摘されている<sup>12</sup>。また、GFP そのものの毒性も否定できない<sup>1</sup>。我々の

研究室では、GFP Tg ラットの系統維持も行っている。現在、その GFP 遺伝子のホモ化を進めているが、GFP ホモ個体は哺育期にすべて死亡してしまう (Data not shown)。今回作製に成功した GFP Tg マウスについても GFP 遺伝子のホモ化を進めているが、今のところ成功していない。トランスジェニック動物作製過程で、受精卵に外来遺伝子を挿入すると、時にランダムに挿入突然変異が生じ、予想しない表現型を生ずることがある<sup>5)</sup>。今回の GFP Tg マウスで認められる現象が挿入突然変異によるかは不明である。GFP は、細胞マーカーとして極めて有効ではあるが、その特性にはいまだ不明な点があり、今後さらなる解析が必要である。

今回、GFP Tg マウスの作製を試み、その系統化に成功した。GFP Tg マウスは発生初期から成熟段階まで一貫して強い GFP 発現を認めた。本マウスは、発生学あるいは幹細胞を利用した再生医学研究等、幅広く医学生物学的研究に有用な研究ツールとなることを確信する。

#### 謝辞

GFP Tg マウスの作製ならびに系統化にあたりご協力頂いた獣医保健看護学科基礎部門、生体機能学分野の室員の皆様に心より感謝申し上げます。

#### 参 考 文 献

- 1) ARAT, S., GIBBONS, J., RZUCIDLO, S.J., RESPESS, D.S., TUMLIN, M., and STICE, S.L. (2002) In vitro development of bovine nuclear transfer embryos from transgenic clonal lines of adult and fetal fibroblast cells of the same genotype. *Biol Reprod*, **66** (6), 1768-1774.
- 2) BALLESTER, M., CASTELLO, A., IBANEZ, E., SANCHEZ, A., and FOLCH, J.M. (2004) Real-time quantitative PCR-based system for determining transgene copy number in transgenic animals. *Biotechniques*, **37** (4), 610-613.
- 3) FENG, G., LU, J., and GROSS, J. (2004) Generation of transgenic mice. *Methods Mol Med*, **99**, 255-267.
- 4) FRANCIS, J.S., OLARIU, A., KOBAYASHI, E., and LEONE, P. (2007) GFP-transgenic Lewis rats as a cell source for oligodendrocyte replacement. *Exp Neurol*, **205** (1), 177-189.
- 5) GEURTS, A.M., COLLIER, L.S., GEURTS, J.L., OSETH, L.L., BELL, M.L., MU, D., LUCITO, R., GODBOUT, S.A., GREEN, L.E., LOWE, S.W., HIRSCH, B.A., LEINWAND, L.A., and LARGAESPADA, D.A. (2006) Gene mutations and genomic rearrangements in the mouse as a result of transposon mobilization from chromosomal concatemers. *PLoS Genet*, **2** (9), e156.
- 6) GORDON, J.W., SCANGOS, G.A., PLOTKIN, D.J., BARBOSA, J.A., and RUDDLE, F.H. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77** (12), 7380-7384.
- 7) HAKAMATA, Y., TAHARA, K., UCHIDA, H., SAKUMA, Y., NAKAMURA, M., KUME, A., MURAKAMI, T., TAKAHASHI, M., TAKAHASHI, R., HIRABAYASHI, M., UEDA, M., MIYOSHI, I., KASAI, N., and KOBAYASHI, E. (2001) Green fluorescent protein-transgenic rat: a tool for organ transplantation research. *Biochem Biophys Res Commun*, **286** (4), 779-785.
- 8) HAUROGNE, K., BACH, J.M., and LIEUBEAU, B. (2007) Easy and rapid method of zygosity determination in transgenic mice by SYBR Green real-time quantitative PCR with a simple data analysis. *Transgenic Res*, **16** (1), 127-131.
- 9) HOFFMAN, R.M. (2004) Imaging tumor angiogenesis with fluorescent proteins. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*, **112** (7-8), 441-449.
- 10) HOFFMAN, R.M., and YANG, M. (2006) Color-coded fluorescence imaging of tumor-host interactions. *Nat Protoc*, **1** (2), 928-935.
- 11) ICHIDA, M., HAKAMATA, Y., HAYAKAWA, M., UENO, E., IKEDA, U., SHIMADA, K., HAMAMOTO, T., KAGAWA, Y., and ENDO, H. (2000) Differential regulation of exonic regulatory elements for muscle-specific alternative splicing during myogenesis and cardiogenesis. *J Biol Chem*, **275** (21), 15992-16001.
- 12) INOUE, H., OHSAWA, I., MURAKAMI, T., KIMURA, A., HAKAMATA, Y., SATO, Y., KANEKO, T., TAKAHASHI, M., OKADA, T., OZAWA, K., FRANCIS, J., LEONE, P., and KOBAYASHI, E. (2005) Development of new inbred transgenic strains of rats with LacZ or GFP. *Biochem Biophys Res Commun*, **329** (1), 288-295.
- 13) KAWARASAKI, T., UCHIYAMA, K., HIRAO, A., AZUMA, S., OTAKE, M., SHIBATA, M., TSUCHIYA, S., ENOSAWA, S., TAKEUCHI, K., KONNO, K., HAKAMATA, Y., YOSHINO, H., WAKAI, T., OOKAWARA, S., TANAKA, H., KOBAYASHI, E., and MURAKAMI, T. (2009) Profile of new green fluorescent protein transgenic Jinhua pigs as an imaging source. *J Biomed Opt*, **14** (5), 054017.
- 14) KULBATSKI, I., MOTHE, A.J., KEATING, A., HAKAMATA, Y., KOBAYASHI, E., and TATOR, C.H. (2007) Oligodendrocytes and radial glia derived from adult rat spinal cord progenitors: morphological and immunocytochemical characterization. *J Histochem Cytochem*, **55** (3), 209-222.
- 15) MURAKAMI, T., and KOBAYASHI, E. (2005) Color-engineered rats and luminescent LacZ imaging: a new platform to visualize biological processes. *J Biomed Opt*, **10** (4), 41204.
- 16) NAKAO, K., and INOUE, K. (2010) Cryopreservation for broader production of transgenic mice by DNA injection into zygotes. *Exp Anim*, **59** (2), 225-229.
- 17) OKABE, M., IKAWA, M., KOMINAMI, K., NAKANISHI, T., and NISHIMUNE, Y. (1997) 'Green mice' as a source of ubiquitous green cells. *FEBS Lett*, **407** (3), 313-

- 319.
- 18) PALMITER, R.D., BRINSTER, R.L., HAMMER, R.E., TRUMBauer, M.E., ROSENFELD, M.G., BIRNBERG, N.C., and EVANS, R.M. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes. *Nature*, **300** (5893), 611-615.
- 19) POPOVA, E., RENTZSCH, B., BADER, M., and KRIVOKHARCHENKO, A. (2008) Generation and characterization of a GFP transgenic rat line for embryological research. *Transgenic Res*, **17** (5), 955-963.
- 20) SAKURAI, T., KAMIYOSHIM, A., WATANABE, S., SATO, M., and SHINDO, T. (2008) Rapid zygosity determination in mice by SYBR Green real-time genomic PCR of a crude DNA solution. *Transgenic Res*, **17** (1), 149-155.
- 21) SASAKI, E., SUEMIZU, H., SHIMADA, A., HANAZAWA, K., OIWA, R., KAMIOKA, M., TOMIOKA, I., SOTOMARU, Y., HIRAKAWA, R., ETO, T., SHIOZAWA, S., MAEDA, T., ITO, M., ITO, R., KITO, C., YAGHASHI, C., KAWAI, K., MIYOSHI, H., TANIOKA, Y., TAMAOKI, N., HABU, S., OKANO, H., and NOMURA, T. (2009) Generation of transgenic non-human primates with germline transmission. *Nature*, **459** (7246), 523-527.
- 22) TAKAHASHI, R., KURAMOCHI, T., AOYAGI, K., HASHIMOTO, S., MIYOSHI, I., KASAI, N., HAKAMATA, Y., KOBAYASHI, E., and UEDA, M. (2007) Establishment and characterization of CAG/EGFP transgenic rabbit line. *Transgenic Res*, **16** (1), 115-120.
- 23) TESSON, L., HESLAN, J. M., MENORET, S., and ANEGON, I. (2002) Rapid and accurate determination of zygosity in transgenic animals by real-time quantitative PCR. *Transgenic Res*, **11** (1), 43-48.
- 24) TESSON, L., REMY, S., MENORET, S., USAL, C., and ANEGON, I. Analysis by quantitative PCR of zygosity in genetically modified organisms. *Methods Mol Biol*, **597**, 277-285.
- 25) WANG, H.J., LIN, A.X., ZHANG, Z.C., and CHEN, Y.F. (2001) Expression of porcine growth hormone gene in transgenic rabbits as reported by green fluorescent protein. *Anim Biotechnol*, **12** (2), 101-110.
- 26) YAMAGUCHI, Y., KUBO, T., MURAKAMI, T., TAKAHASHI, M., HAKAMATA, Y., KOBAYASHI, E., YOSHIDA, S., HOSOKAWA, K., YOSHIKAWA, K., and ITAMI, S. (2005) Bone marrow cells differentiate into wound myofibroblasts and accelerate the healing of wounds with exposed bones when combined with an occlusive dressing. *Br J Dermatol*, **152** (4), 616-622.
-



## Establishment of GFP transgenic mice for biomedical research

Motoyo MARUYAMA<sup>1)</sup>, Masahiko FUJISAWA<sup>1)</sup>, Kazuhide NAKAGAKI<sup>2)</sup>,  
Shin-ichi HAYAMA<sup>3)</sup>, Koichi FUKUDA<sup>4)</sup>, Ichiro MIYOSHI<sup>5)</sup>,  
Minoru TANAKA<sup>6)</sup> and Yoji HAKAMATA<sup>1)</sup>

- <sup>1)</sup> Department of Basic Science, School of Veterinary Nursing and Technology, Faculty of Veterinary Science, Nippon Veterinary and Life Science University  
<sup>2)</sup> Laboratory of Wildlife Medicine, Department of Veterinary Science, Faculty of Veterinary Science, Nippon Veterinary and Life Science University  
<sup>3)</sup> Laboratory of Infectious diseases and Immunology, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, Nippon Veterinary and Life Science University  
<sup>4)</sup> Center for Laboratory Animal Science, National Defense Medical College  
<sup>5)</sup> Department of Comparative and Experimental Medicine, Center for Experimental Animal Science, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences  
<sup>6)</sup> Laboratory of Animal Physiology, Department of Animal Science, Faculty of Applied Life Science, Nippon Veterinary and Life Science University

### Abstract

This study aimed to establish green fluorescent protein (GFP) transgenic mice as a model in biomedical research. The GFP gene construct was designed to express ubiquitously because it is used in several research fields. A fusion DNA construct of GFP under the control of a hybrid cytomegalovirus early enhancer and chicken beta-actin (CAG) promoter was injected into the pronuclear cell of a BDF1 mouse according to the authentic method, and a GFP transgenic mouse line was established. The GFP expression profile at each developmental stage from early embryo to adulthood was monitored by fluorescent microscopy, *in vivo* imaging system (IVIS) or flow cytometry. The genotype of the GFP transgene in each mouse was determined by the SYBR Green Real-time PCR method. GFP expression in all tissues was ubiquitous and abundant, even in the developmental stage. The peripheral leucocyte of the GFP mouse consisted of more than 90% GFP-positive cells. The results of Real-time PCR demonstrated that the method could accurately distinguish the hemi and/or homo genotype of each GFP mouse carrying the GFP gene. In the present study, we succeeded in establishing an original GFP transgenic mouse, and the results showed that this mouse is a useful tool for studying cell migration and differentiation in biomedical research.

**Key words** : Transgenic mouse, GFP, *in vivo* imaging system

Bull. Nippon Vet. Life Sci. Univ., 60, 58-66, 2011.