

平成25年 2月

滝口正人 学位論文審査要旨

主 査 佐 藤 建 三

副主査 岡 田 太

同 押 村 光 雄

主論文

A novel and stable mouse artificial chromosome vector

(安定な新規マウス人工染色体の構築)

(著者：滝口正人、香月康宏、平松敬、阿部智志、飯田雄一、嵩原昇子、西田直史、大林徹也、
若山照彦、押村光雄)

平成24年 ACS Synthetic Biology DOI:10.1021/sb3000723 12pages

学 位 論 文 要 旨

A novel and stable mouse artificial chromosome vector

(安定な新規マウス人工染色体の構築)

従来のトランスジェニックマウス作製法において、(1)DNA導入サイズの制限、(2)宿主染色体の破壊、(3)ランダム挿入(位置効果)による予測・再現不可能な遺伝子発現といった課題が指摘されている。その解決策として、ヒト人工染色体断片(hCF: human chromosome fragments)およびヒト人工染色体(HAC: Human artificial chromosomes)をマウスES細胞へ移入することによる染色体導入(Tc: trans-cromosomic)マウスの作製が試みられてきた。hCFやHACを用いることにより、マウス個体に巨大なゲノム領域を独立して維持させることが可能となった一方、これらhCFやHACがマウスのES細胞やTcマウスの各組織において保持率にばらつきがあることが明らかとなった。また増幅させたマウスセントロメア周辺配列及びマウスサテライトリピート配列を基本構造とする人工染色体(mSATAC)をマウスに導入した場合においても、保持率にばらつきがあることがわかった。これは、移入したhCFやHACまたはmSATACが細胞増殖にともない次第に抜け落ちた結果であると考えられ、この現象の要因はセントロメアが異なること及び正常なマウスセントロメアではないことであると考えた。これらの仮説を元に、本研究ではトップダウンアプローチにより、正常マウス染色体を改変し、天然のマウスセントロメアを基本構造とする新規の人工染色体“マウス人工染色体(MAC: mouse artificial chromosome)ベクター”を構築することで、マウス細胞において均一で高い保持率が期待される人工染色体が作出できると考えられる。

方 法

マウス11番染色体を保持した、相同組み換え頻度が高いニワトリB細胞を用いて、相同組み換えにより遺伝子領域を除き、遺伝子挿入サイトのloxPを導入したマウス人工染色体(MAC)ベクターを構築した。ゲノムPCR及び蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション(FISH)解析により、目的の改変が行われていることを確認した。微小核細胞融合法により、MACベクターをニワトリB細胞からCHO細胞、並びにCHO細胞からマウスES細胞へ移入した。MACベクターを保持するマウスES細胞を8細胞期のマウス胚にインジェクションし、仮親マウスへ移植することで、キメラマウスを作製した。キメラマウスとICRマウスを交配することで、MACベクターを子孫伝達したTcマウスを得た。MACベクターの細胞並びに組織での保持率は、

FISH解析またはGFPタンパク発現により解析した。

結 果

ゲノムPCR及びFISH解析により、マウス11番染色体が目的の領域で組換えが行われ、MACベクターが構築されていることを確認した。loxPタイプの異なる二つのMACベクターが構築された。MACベクターに任意の遺伝子としてGFP遺伝子を導入することができ、かつ安定的に発現すること、またloxPを介して複数の遺伝子導入サイトを導入できることが確認された。MACベクターを導入したマウスES細胞で長期培養を行っても、染色体異数性など核型に異常を起こさないことがわかった。子孫伝達したTcマウスの組織細胞、血液細胞において、HACベクターに比較してMACベクターは、安定かつバラつきが少なく保持されることが示された。

考 察

マウス染色体から遺伝子領域を削除し、天然のセントロメア構造を保持したMACベクターは、マウスES細胞およびマウス個体において安定に存在したことから、マウスの細胞において安定に保持するためにはマウスセントロメアが必要であり、特に天然のマウスセントロメアを利用することが有効であることがわかった。これは、マウス細胞に導入したMACベクターの天然のマウスセントロメアは、他の内在染色体同様に、マウス細胞の細胞分裂時に生理的に機能するためと考えられる。また、遺伝子挿入サイトを導入し、任意の遺伝子を挿入し安定に発現することが確認されたことから、内在および外来プロモーターで目的遺伝子を導入し、発現させることができることがわかった。

結 論

マウス染色体から構築した天然マウスセントロメア領域を保持するMACベクターは、マウス細胞およびマウス個体において安定に保持され、導入した任意の遺伝子を安定に発現することができるため、ゲノム機能解析への有用性はもちろんのこと、疾患モデルへのヒトゲノム領域の移入や、ヒト型モデルマウスや動物細胞の遺伝子改変に有用な遺伝子ベクターになると考えられる。またサイズに制限されることなく目的の遺伝子を導入できる汎用性があることから、ダウン症候群モデルマウスなど染色体異常モデル等にも応用されることが期待される。