

嵩原昇子 学位論文審査要旨

主 査 岡 田 太
副主査 汐 田 剛 史
同 押 村 光 雄

主論文

A novel transchromosomal system: stable maintenance of an engineered Mb-sized human genomic fragment translocated to a mouse chromosome terminal region

(新規トランスクロモソミックシステム：マウス染色体末端へ転座させたMbサイズの改変ヒトゲノム断片の安定維持)

(著者：嵩原昇子、Thomas C. Schulz、阿部智志、滝口正人、香月加奈子、岸上哲士、若山照彦、冨塚一磨、押村光雄、香月康宏)

平成26年 Transgenic Research 掲載予定

参考論文

1. Complete genetic correction of iPS cells from Duchenne muscular dystrophy
(デュシェンヌ型筋ジストロフィー患者由来のiPS細胞における遺伝子の完全修復)
(著者：香月康宏、平塚正治、滝口正人、尾崎充彦、梶谷尚世、星谷英寿、平松敬、吉野とう子、香月加奈子、石原千恵、嵩原昇子、檜垣克美、中川正人、高橋和利、山中伸弥、押村光雄)
平成22年 Molecular Therapy 18巻 386頁～393頁
2. Highly stable maintenance of a mouse artificial chromosome in human cells and mice
(ヒト細胞とマウスにおいて極めて安定に維持されるマウス人工染色体)
(著者：香月加奈子、嵩原昇子、宇野愛海、今岡奈津子、阿部智志、滝口正人、平松敬、押村光雄、香月康宏)
平成25年 Biochemical and Biophysical Research Communications 442巻
44頁～50頁
3. Refined human artificial chromosome vectors for gene therapy and animal transgenesis
(遺伝子治療と遺伝子改変動物作製のためのヒト人工染色体ベクターの改良)
(著者：香月康宏、星谷英寿、滝口正人、阿部智志、飯田雄一、尾崎充彦、加藤基伸、平塚正治、白吉安昭、平松敬、上野悦也、梶谷尚世、吉野とう子、香月加奈子、石原千恵、嵩原昇子、辻沙織、江島文夫、豊田敦、榊佳之、Vladimir Larionov、Natalay Kouprina、押村光雄)
平成23年 Gene Therapy 18巻 384頁～393頁

学 位 論 文 要 旨

A novel transchromosomal system: stable maintenance of an engineered Mb-sized human genomic fragment translocated to a mouse chromosome terminal region

(新規トランスクロモソミックシステム：マウス染色体末端へ転座させたMbサイズの改変ヒトゲノム断片の安定維持)

ヒト染色体断片 (hCF) あるいはヒト人工染色体 (HAC) を用いたトランスクロモソミック技術は、Mbサイズのヒトゲノム導入マウスの作製に利用されてきた。しかし、ヒトセントロメアを持つ染色体を利用したトランスクロモソミック技術の最大の問題は、hCFsやHACがマウスにおいて脱落していく傾向がある点であった。本研究の目的は、前述の課題を克服するため、染色体工学技術を用いてマウス染色体末端へヒト染色体の特定の領域を転座させることでマウス個体においてMb単位のヒトゲノムを安定に維持できるシステムを確立することである。

方 法

以下の8つのステップで新規トランスクロモソミックマウス作製システムを構築した。

(1) マウスES細胞においてマウス10番染色体末端にloxPをターゲティングするベクターをエレクトロポレーション (EP) 法により導入し、Polymerase Chain Reaction (PCR) 解析、サザンブロット解析によりクローンを選別した。(2) DT40細胞においてヒト21番染色体上のAML領域にloxPをターゲティングするベクターをEP法により導入し、PCR解析、サザンブロット解析、fluorescent *in situ* hybridization (FISH) 解析によりクローンを選別した。

(3) DT40細胞において前述 (2) で改変したヒト21番染色体上のETS2領域にテロメア配列をターゲティングするベクターをEP法により導入し、PCR解析、FISH解析によりクローンを選別した。(4) (3) で改変したヒト21番染色体を微小核細胞融合法にてCHO細胞を介して

(1) で改変したマウスES細胞へ導入し、PCR解析、FISH解析により確認した。(5) Cre発現ベクターを(4) で改変したマウスES細胞へEP法により導入し、PCR解析、サザンブロット解析、FISH解析によりクローンを選別した。(6) 6-TG選択によりクローンを選択し、PCR解析、FISH解析により確認した。(7) (6) で作製したマウスES細胞を8細胞期胚へインジェクションし、仮親へ移植することでキメラマウスを作製した。(8) 交配により、子孫伝達マウスを作製した。さらに、(8) で作製された子孫伝達マウスの組織を用いて、FISH

解析により保持率の検討、RT-PCR解析により遺伝子発現の解析を行った。

結 果

前述の方法に対応させて以下に結果を記載する。(1) マウス10番染色体末端にloxPが部位特異的に挿入されたクローンは、70クローン中4クローンであった。(2) ヒト21番染色体上のAML領域にloxPが部位特異的に挿入されたクローンは、178クローン中71クローンであった。(3) ヒト21番染色体上のETS2領域に部位特異的に染色体が切断されたクローンは、92クローン中2クローンであった。(4) (3) で改変したヒト21番染色体を(1)で改変したマウスES細胞へ導入できたクローンは、12クローン中3クローンであった。(5) 特定のヒト21番染色体領域がマウス10番染色体末端に転座されたクローンは、3クローン中1クローンであった。(6) ヒト21番染色体-マウス染色体の転座染色体が除去されたクローンは、9クローン中8クローンであった。(7) 様々な毛色を示すキメラマウスが作製され、PCR解析により21番染色体領域が導入されていることを確認した。(8) 90%程度のキメリズムを示すマウスとの交配により、子孫伝達マウスを作製し得た。この子孫伝達マウスを用いて、FISH解析により保持率の検討を行った結果、調べた全ての組織で89%以上の高い保持率であった。また、RT-PCR解析により遺伝子発現の解析を行った結果、導入したヒト21番上の遺伝子はヒトと同様の遺伝子発現パターンを呈した。

考 察

本研究のシステムではマウス染色体末端へヒト染色体領域を転座させることで、マウス個体でMb単位のヒト遺伝子領域が安定に維持されることが明らかとなった。これまでに正常マウス11番染色体から作製したMACベクターはマウス個体で安定であることがわかっていることから、天然のセントロメア配列を持つ染色体への転座によって、特定の染色体領域を安定化できるかもしれない。

結 論

本研究で新規トランスクロモソミックシステムを開発し、ヒト21番染色体上の4 Mbの領域がマウス個体で極めて安定に維持され、前述21番染色体上の遺伝子はヒトと同様の発現パターンであることが明らかにされた。本マウスはダウン症候群のモデルになることが期待され、ダウン症候群の原因遺伝子の同定に利用されるかもしれない。また、本新規トランスクロモソミックシステムはマウス個体での遺伝子機能解析への有用性はもちろんのこと、ヒト型モデルマウスの作出に重要なツールとなることが期待される。