

学 位 論 文 要 約

Exploring new gene integration sites for gene knock-in by gene-trapping strategy

(ジーントラップ法による遺伝子ノックインのための新規遺伝子結合領域の探索)

(著者：南地勇、吉村祐貴、中村和臣、真砂有作、大林徹也、奥田智彦)

平成27年 Transgenic Research 24巻 549頁～559頁

ノックインマウスは分子生物学においてなくてはならない技術の一つであるが、ノックインマウスを作製する上で、導入した遺伝子はそのゲノム領域における位置効果の影響を強く受けることが知られている。そのため、導入遺伝子が安定的に発現するか否かは、マウスゲノムのどこに遺伝子を導入するかによって強く依存する。現在、導入した遺伝子が安定的に発現し、かつマウス表現型に影響しない、遺伝子導入に理想的なゲノム領域としてRosa26領域が頻用されるものの、他に利用できる領域はほとんどない。本研究においては、遺伝子導入に適したゲノム領域を効率的に探索する方法を確立し、遺伝子ノックインに適したゲノム領域を新たに見出すことを目的とした。

方 法

効率的なゲノム領域探索のため、新たな遺伝子トラップ型ベクターを構築した。トラップ型ベクターは、トラップされた内在性遺伝子の発現を赤色蛍光タンパクであるmCherryで、外来性に導入した遺伝子の発現を緑色蛍光タンパクであるEnhanced Green Fluorescent Protein (EGFP)で、それぞれリアルタイムにモニターできるように設計した。構築したトラップベクターをマウス胚性幹細胞 (Embryonic Stem Cell : ES細胞) に導入し、蛍光シグナルが安定した株を選別した。次に、選別したES細胞株を用いてキメラ胎児を作製し、*in vivo*における蛍光シグナルの安定性を評価すると共に、トラップベクターの導入領域を同定した。最後に、同定した領域の中でも特に遺伝子導入に適すると考えられたゲノム領域 (*Fam168a* Neighbourhood-Locus : FN-Locus) について、遺伝子改変マウス (FNマウス) を作製し、各組織における蛍光シグナルの安定性を評価した。

結 果

トラップベクターを導入したES細胞において、クローン毎に多様なEGFPおよびmCherryの蛍光シグナルが得られ、中でもEGFPの発現安定性が高い12クローンを選抜した。キメラ胎児を用いた解析においては、解析に用いたうち約半数のクローンにおいて、ユビキタスなEGFPシグナルが観察された。一方で、mCherryシグナルはいずれのクローンにおいても観察されなかった。導入領域の同定の結果、多くのクローンにおいてトラップベクターは既知の遺伝子内に導入されていたが、一部のクローンでは遺伝子の近傍、あるいは近傍に遺伝子が報告されていない領域に導入されていた。FNマウスを用いた解析では、全身組織においてユビキタスなGFPシグナルが観察され、導入した遺伝子が広汎な細胞種で安定して発現していることが明らかとなった。FNマウスにおいて導入領域近傍の*Fam168a*遺伝子の発現が亢進する傾向が認められたものの、ホモマウスにおいても出生率や体重など一般的なマ

ウス表現型に異常は認められなかった。

考 察

ES細胞における検証結果から、構築したトラップベクターが正常に機能し、GFPシグナルにより導入遺伝子の発現安定性を *in vitro* で評価することが可能であることが示された。キメラ胎児を用いた解析において、多くのクローンでユビキタスなGFPシグナルが得られたことから、ES細胞におけるクローン選抜が効率の向上に寄与したと考えられる。また本研究では、ES細胞においてmCherryのシグナルが強いことが、トラップベクターが導入された領域の染色体構造が開かれていることを意味し、外来遺伝子の安定発現や遺伝子導入効率の向上に寄与する、と考えトラップベクターを設計した。しかしながら、mCherryシグナルによる選抜が実際に効率向上に寄与する否かは不明であり、今後更なる研究が必要である。FNマウスの解析において、導入遺伝子の発現が広汎な組織、細胞で認められ、かつマウス表現型には影響が認められなかったことから、本研究において同定されたFN-Locusが遺伝子の導入領域として有望であることが強く示唆された。

結 論

本研究において、新たなトラップベクターとキメラ胎児を用いた手法により、効率的に遺伝子導入領域の探索が可能であることが示された。さらに、本研究において同定されたFN-Locusは、遺伝子導入領域として有望であることが示唆された。