

氏名(本籍)	ふる た やす ひで 古 田 泰 秀 (福岡県)
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	博 乙 第 904 号
学位授与年月日	平成 5 年 7 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	THE GENE TRAP APPROACH WITH MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS (マウス胚性未分化細胞を用いたジーントラップ法による変異マウス作製系の開発)
主 査	筑波大学教授 理学博士 平 林 民 雄
副 査	理化学研究所副主任研究員 理学博士 相 澤 慎 一 (筑波大学客員教授)
副 査	筑波大学教授 理学博士 山 根 國 男
副 査	筑波大学助教授 理学博士 牧 岡 俊 樹

論 文 の 要 旨

複雑な生物現象を遺伝子のレベルで解明していくためには、突然変異体での表現型とそれに関わる遺伝子を結び付けて解析することが非常に重要である。マウスの系ではこれまで約1,300の変異遺伝子座が記載され、解析が進んでいるが、実際、これらの表現型を規定する遺伝子の同定にはしばしば困難を伴い、同定されるに至った遺伝子のごく限られていて、効率的な実験系の開発が大きな課題である。

マウス胚性未分化細胞 (ES 細胞) は、これを宿主初期胚に移植することにより、完全なマウス個体へと発生させることのできる多能性幹細胞である。従って培養下での個々の ES 細胞をマウス個体と等価に扱え、培養下でこの細胞に遺伝的修飾を加えることにより、高率よく遺伝子組換え個体を得ることができる。そこで本研究では ES 細胞を用いたジーントラップ法により積極的に変異マウスを作製することができるのではないかと考え、系の開発を試みた。標識遺伝子として splice acceptor 配列を連結した大腸菌由来 lacZ 遺伝子、および neo 遺伝子を有するジーントラップベクターを構築し、これを ES 細胞に電気穿孔法により導入したところ、 1.3×10^{-4} の効率で neo 遺伝子の発現による G418 選別に対する耐性クローンが308個得られた。

未分化な ES 細胞で直接発現の有無を調べる方法、及び、ES 細胞をヌードマウスの皮下に注入して分化させ何らかの分化組織形態を示す部位での発現の有無を調べる方法によりジーントラップクローンを選別した。その結果、未分化な ES 細胞の段階で発現のみられるものが全体の1.9%、ヌードマウ

ス皮下注入による分化細胞塊形式で発現の導入されるものが3.9%の割合で得られた。分化によって発現が誘導される遺伝子の中に、組織特異的な形態形成に重要な役割を果たしているものがあると考え、後者の発現様式を示すクローンについて更に解析を進めた。

分化により lacZ の発現が誘導される性質を有するジーントラップクローンを宿主初期胚に注入して発生させ、キメラマウスを作製した。得られた9クローン由来のキメラマウスからそれぞれ子孫マウス系統の樹立を試みた結果、8クローンのES細胞由来の子孫系統が得られ、胚発生時期の神経系で特に興味深い発現様式の認められる2系統を同定した。

TY 43系統：変異の子孫への伝達はほぼメンデルの法則に従ってキメラマウス1匹（キメラ度70%）が得られた。発生段階での lacZ の発現は最初9.5日胚心臓で認められ、10.5日で心臓に加えて中枢神経系で発現が認められるようになる。14.5日以降、神経系での発現は弱まり、生後再び脳全体でその発達とともに発現が上昇してくることが観察され、中枢神経系の形態形成に参与しているものと考えられた。

YF 4 系統：この系統からは、ほぼ100%近いキメラ率を有するF0個体が5匹得られ、いずれも100%の割合でES細胞由来の毛色を有するF1子孫を生じた。

lacZ の発現は12.5日胚中枢神経系で認められ、16.5日胚では、中脳、後脳、脊髄神経管の接着面と各神経節に発現が認められた。成体脳では、嗅球の顆粒細胞層、海馬、中脳、間脳、橋から延髄、及び小脳プルキニエ細胞層で発現が認められた。

次にこれらの系統についてベクター挿入部位遺伝子の単離・同定を行い、TY 43及びYF 4由来のそれぞれ510 bp、750 bp の cDNA 断片を得、それぞれの塩基配列を決定したところ lacZ の上流には splice junction を境にしてベクター由来の intron 配列の代わりに、未知の配列が連なっていた。このことは、用いた splice acceptor 配列が期待通りに働き、ジーントラップが起こっていることを示している。

得られた塩基配列に対して、データベースによる検索を行った、結果、有意な相同性を示す既知遺伝子はなく、いずれのクローンも新しい遺伝子であると考えられた。

また、これらの配列をプローブに用いて行ったサザン法により、それぞれゲノム上に single コピーで存在する遺伝子であることがわかった。

審 査 の 要 旨

本実験は生物材料としては重要でありながら、遺伝学・発生学的には解析が進まない哺乳動物における研究に新しい研究方法を導入しようとした実験である。ジーントラップベクターの構築は以後の実験計画を十分に踏まえて行われ、クローンの選別の段階においてはかなりの高率でジーントラップクローンを得ている。さらにこのクローンをマウス初期胚に注入してキメラマウスの樹立に成功し、その発生過程での解析から主として神経系の分化に参与すると思われる変異個体を取り出し、その変異遺伝子の単離に成功している。この遺伝子の機能を決定するには更に研究が進まなければならない

が、哺乳類の発生機構の解明方法として新機軸を出したものとして高く評価出来る。
よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。