

氏名 (本籍)	水野 沙織 (茨城県)		
学位の種類	博士 (医学)		
学位記番号	博甲第 7013 号		
学位授与年月	平成 26 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	人間総合科学研究科		
学位論文題目	Establishment of BAC-based gene-targeting methods with Long-Evans rat ES cells (Long-Evans ラット ES 細胞を用いた BAC ターゲティング法の確立)		
主査	筑波大学教授 (連携大学院)	博士 (医学)	中村 幸夫
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	工藤 崇
副査	筑波大学准教授	博士 (医学)	楊 景堯
副査	筑波大学助教	博士 (理学)	高崎 真美

## 論文の内容の要旨

### (目的)

遺伝子ターゲティングラット作製のための技術基盤を構築するため、ラット ES 細胞における BAC ベクターを用いた遺伝子ターゲティング(BAC ターゲティング)を確立することを目的とした。

### (対象と方法)

①既にゲノム DNA・BAC ライブラリーが構築済みである Long-Evans (L-E)ラット由来の ES 細胞株樹立を試みた。②未分化 ES 細胞で発現する Nanog 遺伝子を含む BAC クローンを用いて、蛍光タンパク質 Venus を含むカセット(Venus レポーターカセット)を Nanog 遺伝子の翻訳開始コドンに挿入した BAC ベクター(rNV-BAC ベクター)の構築を行った。③構築した BAC ベクターをエレクトロポレーション法により、樹立した L-E ラット ES 細胞株に導入し、in vitro 及び in vivo で、BAC ターゲティングの有効性の評価を行った。

### (結果)

L-E ラットから回収した胚盤胞から ES 細胞株樹立に成功した。L-E ES 細胞株は、既存の細胞株

と同様の細胞形態及び細胞増殖能を示し、正常染色体数を保持していた。この L-E ES 細胞に、構築した rNV-BAC ベクターを導入したところ、相同組み換えによって Nanog 遺伝子領域に Venus レポーターカセットを挿入することに成功した。この細胞を解析したところ、レポーターカセットが、Nanog 遺伝子の発現をモニターしていること、in vitro で多能性を示すことが明らかとなった。しかし、遺伝子ターゲティングされた ES 細胞由来のキメララットを得ることはできなかった。

#### (考察)

本研究では、新規に樹立したラット ES 細胞株を用いて、マウス ES 細胞株と同様の手順で、ラットにおいても BAC ターゲティング法が有効であることを in vitro で証明した。その有効性を in vivo で評価することはできなかったが、本結果は、遺伝子ターゲティングマウス同様、様々なニーズに応じたモデルラットの作製がラット ES 細胞株を用いることで可能であることを示唆しており、今後さらにラット ES 細胞株の培養方法及び遺伝子改変技術を開発・改良することで、生命科学の発展に大きく貢献することが期待できる。

### 審査の結果の要旨

#### (批評)

ラットは、実験動物としてマウスと同様にきわめて重要な存在であり、マウスよりも大型であることから、マウスでは実施が困難な研究分野への応用でも非常に期待されている。しかしながら、マウスに比較して、その利用が遅れている要因の一つとして、20 世紀終盤の生物学研究分野を席卷した特定遺伝子欠損動物樹立による遺伝子機能解析が、マウスで可能であった一方で、ラットでは不可能であった事実が挙げられる。そして、その背景には、ラット ES 細胞株を樹立することができなかった事実がある。近年の細胞培養技術の進展により、ラット ES 細胞株の樹立も可能となったが、樹立されているラット ES 細胞株の数は未だにきわめて少ないのが現状である。そのような状況下、既にゲノム DNA・BAC ライブラリーが構築済みである Long-Evans (L-E)ラット由来の ES 細胞株の樹立に成功したことは大きな成果であると評価できる。加えて、樹立した ES 細胞株を用いて、BAC ターゲティング法が有効であることも実証し、今後、BAC ターゲティング法を用いて遺伝子変異ラットを効率よく作成できる可能性を示したことも高く評価できる。

ただし、樹立した ES 細胞由来細胞を含むキメラ個体の作成に成功していない点が、最も残念な点である。細胞特性に関する解析結果からはキメラ個体ができる可能性は高いように思われる。著者は引き続き当該分野において職を継続するとのことであり、実験系を洗練させ、引き続きキメラ個体の作成に取り組んで欲しい。

平成 25 年 12 月 26 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認める。