

論 文 概 要

○ 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)

○ 指 導 教 員

人間総合科学研究科 生命システム医学専攻 八神健一 教授

(所 属) 筑波大学大学院人間総合科学研究科生命システム医学専攻

(氏名) 水野 沙織

目的:

ES細胞を用いた遺伝子ターゲティング動物の作製は、生命科学研究において重要なツールである。これまで遺伝子ターゲティング動物の作製は、マウスのみで可能であった。我々もバイオリソースの充実を目的に、各種マウス系統から遺伝子ターゲティングに有効なES細胞を樹立してきた。一方、ラットは古くから生命科学研究で広く使われてきた実験動物の1つであるにもかかわらず、最近まで利用可能な遺伝子改変技術が限られており、分子生物学的な解析を個体レベルで行うことが困難であった。2008年に初めて、生殖系列移行可能なラットES細胞が報告され、2010年には、ノックアウトラットの作製が報告された。ノックアウトラットを用いた研究が普及することで、今後、更なる生命科学研究の発展が期待される。そこで、我々は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ことを目的に研究を行っている。一般に、マウスES細胞での遺伝子ターゲティングには、プラスミドベクターが用いられる。しかし、ターゲットとする遺伝子によっては、ランダムインテグレーションが多く、相同組み換えが起こりにくいという問題点がある。その場合には約200~400 kb から成る細菌人工染色体(BAC)ベクターを用いて、染色体との相同領域をより長くすることで、ターゲティング効率が改善することが知られている。

本研究では、より効率的な遺伝子ターゲティングを実現するため、ラットES細胞において、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。現在までにラットES細胞でのBACターゲティングの報告はない。

対象と方法:

まず、BACターゲティングに有効なラットES細胞の樹立を試みた。BACベクターを構築する際、ターゲット遺伝子を含むBACクローンをを用いる必要があるが、現在、ラットゲノムDNA・BACライブラリーが構築済みの系統は3系統しかない。その内、Long-Evans (L-E)ラットは生殖系列移行可能なES細胞樹立の報告はない。そのため、L-Eラット由来のES細胞樹立を行った。次に、未分化ES細胞で発現する*Nanog*遺伝子を含むBACクローンをを用いて、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)を構築した。そして、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、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を評価した。

結果:

過排卵処理後、自然交配を確認した L-E ラットから採卵を行い、得られた胚盤胞 47 個から ES 細胞樹立を試みたところ、9 ラインの ES 細胞株樹立に成功した。樹立した ES 細胞株は、報告済みの ES 細胞株と同様の細胞形態および細胞増殖能を示し、正常染色体数を保持していた。さらに、RT-PCR 解析により多能性マーカーの発現が認められ、アルカリフォスファターゼ染色においても良好な結果が得られた。この L-E ES 細胞に、レポーター機能が働くことを確認した rNV-BAC ベクターを環状もしくは直鎖化し、導入したところ、両ベクターとも、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。相同組み換えの有無は、PCR 解析および FISH 解析によって判断した。遺伝子ターゲティングが成功した細胞をクローニングし、解析を行ったところ、*in vitro* において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、クローニング後の細胞も正常染色体数を保持しており、多能性マーカーを発現していることが明らかとなった。一方、rNV-BAC ベクターと同様の変異を引き起こすプラスミドベクターを作製し、遺伝子ターゲティングを試みたが、相同組み換え体をとることはできなかった。また、遺伝子ターゲティングされたラット ES 細胞由来のキメララットを本実験で、得ることはできなかった。

考察:

本研究では、ラット ES 細胞においても、マウス ES 細胞と同様の手順で、BAC ターゲティングを利用可能であることが明らかとなった。本結果は、ラット ES 細胞においても、マウス ES 細胞と同様の、相同組み換えによる遺伝子改変が可能であることを示唆している。今後、さらにラット ES 細胞の培養方法及び遺伝子改変技術を開発、改良することで、さまざまなニーズに応じた遺伝子改変ラットの作製が可能となり、生命科学研究の発展に大きく貢献することができるであろう。

結論:

新規に樹立した L-E ラット由来の ES 細胞を用いて、ラット ES 細胞においても 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。しかしながら、遺伝子ターゲティングされた ES 細胞からキメララットを作製することはできなかったため、本研究でその有効性を *in vivo* で評価することはできなかった。しかし、本結果は、遺伝子ターゲティングマウス同様、幅広いニーズに応じたモデルの作製がラットにおいても可能であることを示唆している。