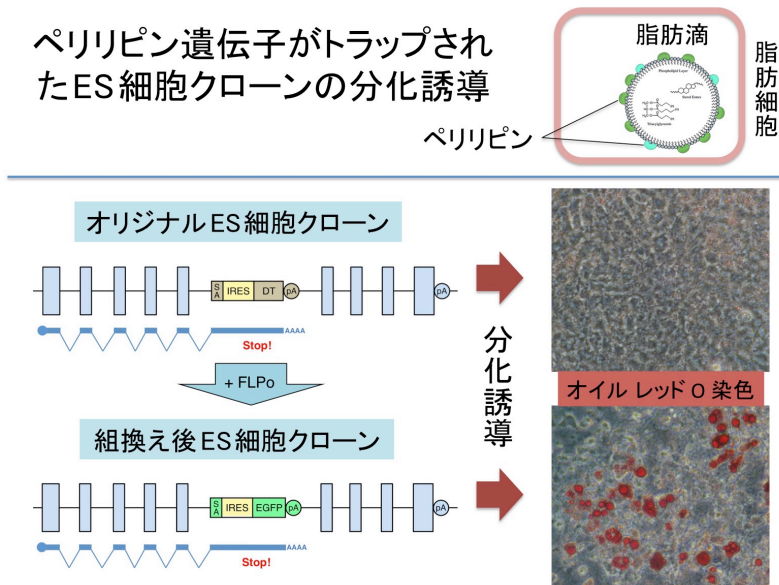


Focus	Production of conditionally gene-disrupted ES-cell clones and establishment of a database for the inactivated genes
PI	Yasumasa Ishida Graduate School of Biological Sciences Nara Institute of Science and Technology
Period	FY2010 - 2011
Overview	<p>In order to disrupt all the protein-coding genes in the mouse embryonic stem (ES) cell by using the insertional-mutagenesis techniques and to freely distribute a tremendous number of ES-cell mutants generated for researchers in the academic fields, the knockout mouse project (KOMP) has been carried out in some of the major western countries. However, random and conditional disruption of transcriptionally silent genes in ES cells through gene trapping has been poorly developed in the project based on the conventional gene-trapping technologies. Thus, people have already started accelerating to disrupt a large number of the remaining 'difficult-to-trap' genes individually by using gene-targeting (non-random) strategies.</p> <p>In this program, we will try to attain quick, selective, and conditional trapping of transcriptionally silent genes in mouse ES cells by establishing a novel strategy in which the diphtheria toxin (DT)-mediated negative selection is involved and by exploiting the UPATrap methodology that had already been refined thoroughly in the national bio-resource project (NBRP) of Japan during its fiscal years H19-H20. Further, we will also establish a fully competent and useful database for genes disrupted in an enormous number of ES-cell clones generated in the current program. By combining these novel developments effectively, we would be able to create a highly useful resource for a wide range of biomedical researchers, and consequently, Japan would be able to occupy a unique position in the international collaborative effort of the KOMP.</p>
Progress	<p>(written in Japanese)</p> <div style="text-align: center;"> <p>ペリリピン遺伝子がトラップされたES細胞クローンの分化誘導</p>  <p>脂肪滴 脂肪細胞 ペリリピン</p> <p>オリジナルES細胞クローン</p> <p>分化誘導</p> <p>オイルレッドO染色</p> <p>組換え後ES細胞クローン</p> </div> <p>この図では、ジフテリア毒素（DT）遺伝子を利用した新しい遺伝子トラップの成功例を示します。マウス未分化 ES 細胞中で恒常的に発現する遺伝子内に新型のトラップベクターが挿入された場合、トラップした内在性遺伝子の転写活性により、DT 遺伝子の発現が誘導され、ES 細胞は自動的に死滅します。しかし、マウス未分化 ES 細胞中で全く発現しない遺伝子内にベクターが挿入された場合には、DT 遺伝子の発現は誘導されず、ポリ A トラップ型の遺伝子トラップが成立します。</p> <p>今回例示する ES 細胞クローンでは、マウスのペリリピン遺伝子がトラップされていました。ペリリピン遺伝子は脂肪細胞のみに限局して発現され、未分化 ES 細胞中ではその発現が完全にシャットオフされているため、トラップが成功したのです（オリジナルクローン）。実験では、このオリジナルクローン中で FLP 組換え酵素を一過性に発現させ、トラップベクター内部の DT カセットを EGFP（緑色蛍光タンパク）カセットで置換しました（組換え後クローン）。これらのオリジナルクローンと組換え後クローンを利用し、インビトロで脂肪細胞への分化誘導を行ったところ、組換え後クローンからは脂肪細胞が効率よく誘導されましたが（図では、オイルレッド O によ</p>

で赤く染色される細胞が脂肪細胞です)、オリジナルクローンからは脂肪細胞は誘導されませんでした。これは、オリジナルクローンでは、ペリリピン遺伝子の内部に DT カセットが残存しているため、脂肪細胞への分化誘導にともないペリリピン遺伝子の発現が ON になると、それに「つられて」DT カセットの部分も発現してしまうため、細胞死が強力に誘導されることが原因だと考えられます。このように、DT 遺伝子を活用した新しい遺伝子トラップを実施すれば、マウス未分化 ES 細胞中で全く発現しない遺伝子をランダムにトラップ（破壊）できるだけでなく、トラップした遺伝子が発現される細胞系譜を選択的に除去する cell lineage ablation 実験を行うことが可能になります。