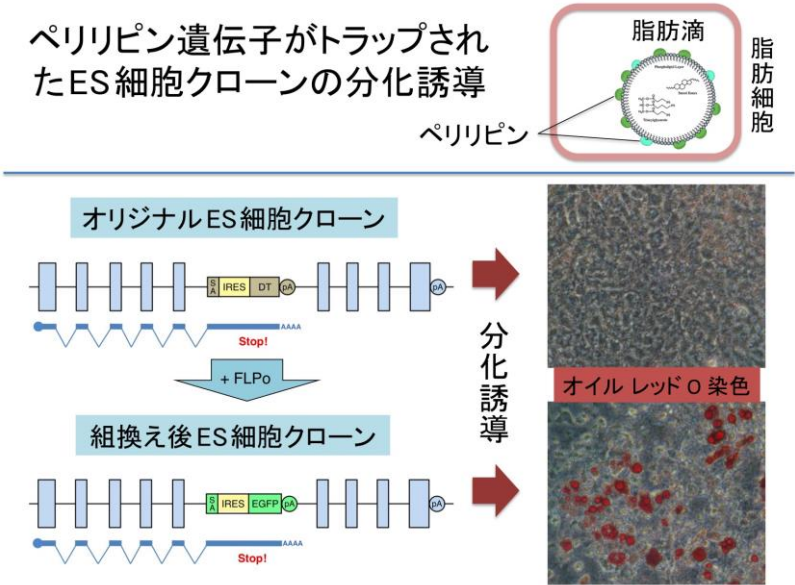


課題名	条件的遺伝子改変 ES 細胞株の量産とデータベース化
課題管理者	石田 靖雅 奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科
実施期間	2010 - 2011 年度
概要・実施体制	<p>現在欧米では、マウス ES 細胞中で全ての遺伝子をノックアウトし、作製されたおびただしい数の ES 細胞クローンを一般の研究者に無償・無条件で分配するためにノックアウトマウス・プロジェクト (KOMP) が推進されていますが、従来型の遺伝子トラップ法をベースに立案された現在の計画では、ES 細胞中で発現しない遺伝子の捕捉や、遺伝子破壊のコンディショナル化が大きく立ち後れています。そのため、残された多くの遺伝子を相同組換えに基づくジーンターゲットングにより個別に破壊する方法が併用され、問題点への対処が急がれています。</p> <p>本プログラムでは、ジフテリア毒素遺伝子を用いた新しい遺伝子トラップ法を完成させ、既にナショナルバイオリソースプロジェクト (平成 19-20 年度) の中で大幅に改良された UPATrap 法を活用することにより、(1) ES 細胞中で発現しない遺伝子群の網羅的かつ迅速な捕捉と、(2) コンディショナルな遺伝子破壊の達成を目指します。さらに、(3) 作出された ES 細胞株で破壊された遺伝子に関する詳細な情報をデータベース化し、利用者の便宜を図ります。これらを効果的に統合すれば、国内外の幅広い生物医学分野の研究者にとって有用なバイオリソースが構築され、国際的 KOMP の中で、我が国はユニークな地位を占めることが可能となります。</p>
成果	<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>  </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 によって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。</p>