



Title	Structures of Replacement Vectors for Efficient Gene Targeting
Author(s)	堀江, 恭二
Citation	大阪大学, 1995, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38976
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	堀 江 恭 二
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 7 7 2 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 7 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科生理系専攻
学 位 論 文 名	Structures of Replacement Vectors for Efficient Gene Targeting (効率の良いジーンターゲティングのための置換型ベクターの構造)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 島田 和典 (副査) 教 授 品川日出夫 教 授 杉野 明雄

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

ジーンターゲティング法による内在性遺伝子の改変は、遺伝子機能の解析のための極めて有用な方法である。しかし、動物細胞では、相同組換え頻度が非相同組換え頻度に比べて著しく低いために、多大な労力を要しているのが現状である。我々は、常染色体優性の遺伝病である家族性アミロイドポリニューロパチー (FAP) の解析に本手法を取り入れ、一アミノ酸置換により本疾患の原因になる血清タンパク質、トランスサイレチン (TTR) を欠損したマウスを作製した。しかし、その過程で、より効率の良いターゲティング法を確立する必要性を感じ、相同組換え株単離の効率に影響する因子を検討した。

[方法ならびに成績]

基本としたベクターの構造は、5.9kb の ttr 遺伝子断片の第 2 エクソンに G418 耐性遺伝子 (neo) を挿入し、3' 末端に単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-tk) を連結したもので、受容細胞には、マウス胚性幹 (ES) 細胞に性質が類似し、かつ培養のより容易なマウス胚性癌腫細胞株 F9 を用いた。相同組換え株の選択には positive-negative 選択法を用い、gancyclovir (GANC) 耐性株を PCR 法によりスクリーニング後、さらにサザンブロット法で同定した。尚、G418 耐性株数を GANC 耐性株数で割った数を、GANC による濃縮効果と定義した。上述のベクターの基本構造を種々に変化させ、その影響を調べ、以下の結果を得た。

1) HSV-tk 遺伝子下流の長さ と GANC の効果について：ベクター線状化後の HSV-tk 遺伝子下流のプラスミド領域の長さを 3.6kb, 1.6kb, 0 kb と短縮したところ、GANC による濃縮効果も、7.3, 3.3, 1.5 と減少した。これより、HSV-tk 遺伝子は、細胞内へ導入されたのちに exonucleolytic な分解を受けている可能性が示唆された。また、GANC 耐性株に占める相同組換え株の割合を調べたところ、GANC による濃縮効果が高いほど、それを反映して、相同組換え株の占める割合も高かった。

2) GANC 耐性の非相同組換え株に挿入されているベクター DNA の構造：非相同組換え株における HSV-tk 遺伝子の不活化の機序を明らかにするために、GANC 耐性の非相同組換え株に挿入されたベクター DNA の構造を、サザンブロット法で解析した。その結果、調べた 20 株のうち 19 株において、ベクターが末端から順次欠失した構造であった。この結果は、1) で示唆された「ベクター DNA が exonucleolytic な分解を受けている可能性」をさらに支持するものであった。

3) 相同領域の長さの選択効率への影響：1) および2) の結果は、ベクターDNAの exonucleolytic な分解を示唆したが、endonucleolytic な分解の存在を否定するものではない。仮に endonucleolytic な分解が影響しているならば、neo 遺伝子と HSV-tk 遺伝子との距離を短縮すれば、GANCによる濃縮効果は上昇するはずである。しかし、同時に相同領域も短くなるため、相同組換え頻度が低下する可能性もある。結果は、neo 遺伝子と HSV-tk 遺伝子との距離を4.6kbから1.5kbまで短縮したところ、GANCによる濃縮効果は2.5倍上昇したが、G418耐性株に占める相同組換え株の割合は1/9に低下した。よって、endonucleolytic な分解の存在は示唆されたものの、それ以上に相同組換え頻度の低下が著明であることがわかった。

4) HSV-tk 遺伝子の数と位置の影響：基本としたベクターでは、HSV-tk 遺伝子は3'側のみに連結されていたが、5'側のみ、もしくは両側に連結したベクターを作製して、GANCによる濃縮効果への影響を調べた。その結果、いずれの場合もGANCの効果は上昇しなかった。ベクターの分解が、ベクターの両末端より速やかに生じるためと考えられた。

【総括】

以上より、細胞内へ導入されたベクターの exonucleolytic、もしくは endonucleolytic な分解が、ターゲティングの効率を低下させる大きな要因と思われた。これより、細胞へ導入後のベクターの安定性を高めることにより、ターゲティングの効率が高まる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

現在のジーンターゲティング法では、目的とする相同組換え株を単離する効率が低く、実験を進める上での最大の障害となっている。本研究ではこの困難を克服するために、ベクターの構造とジーンターゲティングの効率との関係を、系統的に解析している。その結果、細胞内へ導入されたベクターDNAは exonucleolytic、もしくは endonucleolytic な分解を受け、そのために選択マーカーが欠失して、相同組換え株を単離する効率が低下することを明らかにした。また、この結果をもとに、選択マーカーの分解を防ぐ構造を持つベクターを構築することによって、ジーンターゲティングの効率を高められることが示された。

これまでに、ベクターの構造とジーンターゲティングの効率との関係を詳細に検討した研究は極めて少なく、種々の報告間でのジーンターゲティングの効率の差が何によって生じているのかを説明することは困難であった。本研究で得られた結果は、ベクターの構造とジーンターゲティングの効率との関係を統一的に説明するための基礎データになるとともに、効率の良いベクターの持つべき構造を考える上でも極めて有用である。細胞内へ導入されたベクターDNAの分解を防ぐ工夫をすれば、ジーンターゲティングの効率を上げ得ることが実証されており、学位の授与に値する研究と判断した。