The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Efficient biallelic mutagenesis with Cre/loxP-mediated inter-chromosomal recombination
Author(s)	小池, 裕子
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43979
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

【9】

氏　　名	小　池　裕　子（こいけ ひろこ）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　17273　号
学位授与年月日	平成14年9月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系専攻
学　位　論　文　名	Efficient biallelic mutagenesis with *Cre/loxP*-mediated inter-chromosomal recombination （*Cre/loxP* システムを用いた ES 細胞への両アレル変異導入法の開発）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　杉田　義郎 （副査） 教　授　武田　雅俊　　教　授　竹田　潤二

論　文　内　容　の　要　旨

［目的］

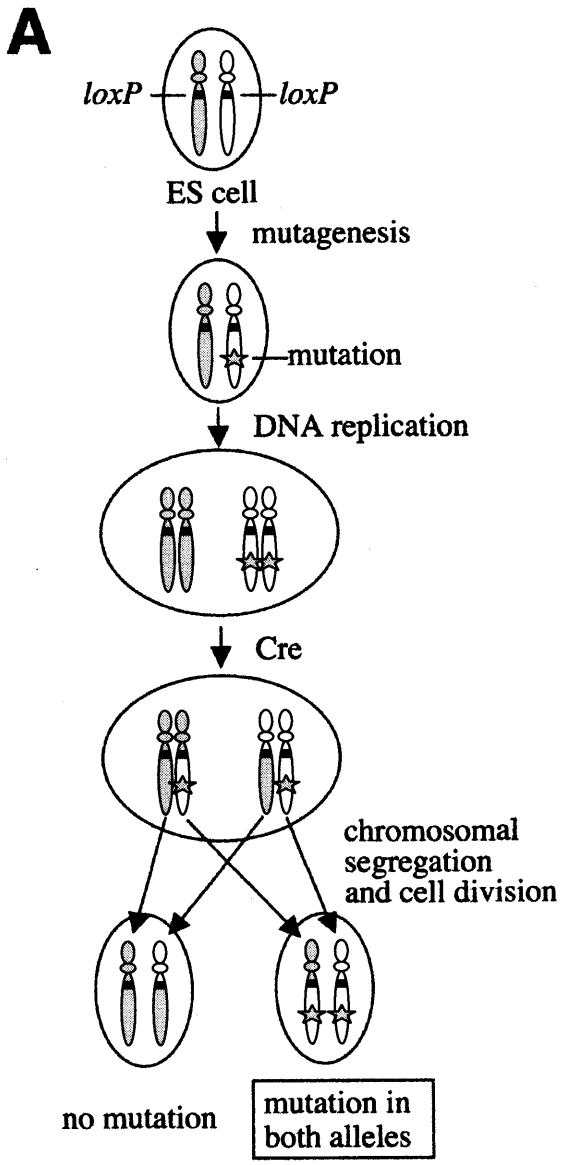
マウス胚性幹細胞（ES 細胞）を用いた遺伝子破壊法により、個体レベルでの遺伝子機能の解析が進んでいる。しかし、マウスのような哺乳動物では染色体が２倍体であるため両アレルを破壊せねばならず多くの労力を要する。私は遺伝子破壊による遺伝子機能解析を迅速化するために、ES 細胞レベルで両アレルに変異を効率よく導入する方法の確立を試みた。本研究では *Cre/loxP* システムによる相同染色体間組み換えを利用して、片方の染色体上の変異を両アレルへ導入し、その変異導入率を検討した。

［方法ならびに成績］

本研究における概念を図 A に示す。まず始めに Cre タンパク質の認識配列である *loxP* 配列を両染色体上の相同性領域に挿入する（図 A；上段）。さらに、それよりテロメア側に変異を導入し（図 A；２段目）その後細胞分裂の G2 期（4n）に Cre タンパク質が発現すると相同染色体間で組み換えが起こる（図 A；４段目）。そして染色体の分配後、変異を両アレルに持った細胞が得られる。

一番染色体を用い、そのセントロメア近傍の遺伝子座（オピオイド k レセプター遺伝子）へジーンターゲッティング法にて *loxP* 配列を挿入した。その後、組み換えベクター内にあった *neo* 遺伝子を一過性 Cre タンパク質の発現により排除し、さらに同じ組み換えベクターを用い同様の方法にてもう一方の染色体に *loxP* 配列を挿入した。

さらに、*loxP* 配列よりもテロメア側に位置する FasL 遺伝子座へ *neo* 遺伝子をジーンターゲッティング法にて挿入した。この *neo* 遺伝子は変異型であり通常より耐性が弱く G418 高濃度下では１コピーでは死滅し、２コピー以上を持つ細胞が耐性を持つ。次に Cre タンパク質を構成的に発現させ、2×10^6 の細胞を高濃度 G418 下で培養したところコントロールに比べて約 100 倍の耐性コロニーが出現した。さらにサザンブロット法により高濃度 G418 耐性細胞は両アレルに *neo* 遺伝子を持っており、*Cre/loxP* システムに依存して両アレル変異が導入されていたことを確認した。さらに fluctuation analysis を用いて変異導入率を求め、コントロールに対しおよそ 15 倍の効率で両アレル変異が導入できることが明らかとなった。



［総括］

本研究ではES細胞において両アレル変異を、*Cre/loxP*システムによる相同染色体間組み換えを利用することにより効率よく導入できることを明らかにした。遺伝子機能解析を迅速に進める1つの方法として有用であると考えられる。近年、別のグループが*Cre/loxP*システムを用いた両アレル変異導入法を報告した（Liu et al., 2002)。薬剤選択法や*loxP*配列の挿入領域が異なるが、本研究とともにこの両アレル変異導入法が有用なものであるといえる。

今後の応用として、このシステムと遺伝子破壊法を組み合わせることにより両アレル変異クローンを作製することが可能となる。つまり、1番染色体に*loxP*配列と*neo*遺伝子が1コピー挿入されたES細胞を化学変異処理する。その後、Creを発現させて高濃度G418選択すると、*neo*遺伝子を持つアレルの変異が両アレル変異を有するようになり、1番染色体遺伝子の変異ライブラリーの作製が可能となる。

さらにマウス個体での、本システムの応用が考えられる。近年マウス個体でトランスポゾンが動くことが証明された（Dupuy et al., 2001；Fischer et al., 2001；Horie et al., 2001)。ES細胞での効率が今だ確定されていないが、本システムと組み合わせることにより、マウス個体でランダム変異を両アレルに導入できることも今後の発展として想定できることである。

Refereces

Dupuy, A. J., Fritz, S. and Largaespada, D. A. (2001)

Transposition and gene disruption in the male germline of the mouse. Genesis, 30, 82-8.

Fischer, S. E., Wienholds, E. and Plasterk, R. H. (2001)
Regulated transposition of a fish transposon in the mouse germ line. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 6759-64.

Horie, K., Kuroiwa, A., Ikawa, M., Okabe, M., Kondoh, G., Matsuda, Y. and Takeda, J. (2001)
Efficient chromosomal transposition of a Tc1/mariner-like transposon Sleeping Beauty in mice. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 98, 9191-9196.

Liu, P., Jenkins, N. A. and Copeland, N. G. (2002)
Efficient Cre-loxP-induced mitotic recombination in mouse embryonic stem cells. Nat. Genet., 30, 66-72.

論文審査の結果の要旨

本論文における研究は、ポストゲノム計画において遺伝子とその機能を解析するという大きな枠組みの中、一つの新たな方法を開発したと考えられる。ノックアウトマウスの作製法が発見されてから遺伝子の機能解析が進み、さらに現在ヒトゲノムなどのゲノム配列を用いた研究が発展してきている。遺伝子機能を解析する目的で多くのノックアウトマウスが作製されてきているが、一遺伝子についての機能を明らかにするまでには多くの時間と労力を要している。

本研究は独創的な発想に基づいて、両アレル変異細胞を従来より効率よく作製するための方法を開発したという点において、今後の分子生物学の発展に大きく貢献すると考えられ学位研究論文に値する。