

Title	Genome-wide phenotype analysis in ES cells by regulated disruption of Bloom's syndrome gene.
Author(s)	遊佐, 宏介
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45540
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について <a>〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	遊 佐 宏 介
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 1 9 3 4 2 号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科社会医学専攻
学位論文名	Genome-wide phenotype analysis in ES cells by regulated disruption of Bloom's syndrome gene. (ブルーム症候群遺伝子の限定的破壊を利用した ES 細胞のゲノム全域の表現型分析)
論文審査委員	(主査) 教授 竹田 潤二 (副査) 教授 濱田 博司 教授 辻本 賀英

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕 遺伝学的な遺伝子機能解析を行う場合、順方向遺伝学的あるいは逆方向遺伝学的アプローチのいずれかを用いる。着目した表現型を示す変異体を収集し、その原因遺伝子を探っていくのが順方向遺伝学的アプローチであり、着目遺伝子の変異個体が示す表現型を解析していくのが逆方向遺伝学的アプローチである。ほ乳類モデル生物マウスでの機能解析はノックアウトマウスの作製を通して着目遺伝子の表現型を解析するように、専ら逆方向遺伝学的アプローチによって行われている。一方、順方向遺伝学的アプローチは大腸菌や酵母では古くから用いられ遺伝子解析が行われてきた。しかし、ほ乳類細胞は二倍体ゲノムを持つため対立遺伝子両方に変異を導入する必要があり、変異個体（あるいは細胞）を作ること自体が困難で、順方向遺伝学的アプローチでの遺伝子解析はほとんど行われてこなかった。個体レベルの順方向遺伝学的アプローチでは最近 ENU mutagenesis が広く行われるようになったが、培養細胞では二つの対立遺伝子を同時に破壊する方法がなかったためこれまで行われてこなかった。培養細胞レベルで表現型に基づいた遺伝子探索を行うためには、効率の良い両対立遺伝子への変異導入法の確立が求められていた。

〔方法並びに成績〕 培養細胞レベルで両対立遺伝子への変異導入を実現させるため、本研究では、ヒトブルーム症候群細胞が示すゲノム不安定性に着目した。ブルーム症候群は免疫不全や若年性のガンによって特徴付けられる常染色体劣性遺伝疾患であり、原因遺伝子 (*BLM*、5 つあるほ乳類 RecQ DNA helicase の一つ) もすでに同定されている。ブルーム症候群細胞では相同組換えが正常細胞に比べ亢進していて、結果、有糸分裂時に相同染色体間で組換えが起こり loss of heterozygosity (LOH) が高頻度に引き起こされるのがゲノム不安定性の要因であるとされている。逆に考えれば、化学変異原やレトロウイルスなどを用いて導入したヘテロ変異をブルーム症候群遺伝子の発現を阻害することで LOH を誘導し、ホモ変異に変換することができることを意味している。しかし、*Blm* 遺伝子を完全に欠損させると組換えが次々と起こり変異細胞が示す表現型が変わって、後の解析に支障が及ぶと考え、テトラサイクリンによる発現誘導システムを利用し可逆的に制御することとした。ジーンターゲットングによって *Blm* 遺伝子を改変したマウス胚性幹 (ES) 細胞を作製し、テトラサイクリン類似体ドキシサイクリンを添加することで *Blm* タンパク質が可逆的に発現制御できることを Western blot によって確認した。また、*Blm* タンパク質が消失している間、

ブルーム症候群細胞で特徴的にみられる姉妹染色分体交換の亢進や、さらに相同染色体間の組換え頻度が正常細胞に比べ 27 倍亢進することも確認した。

次に実際に変異細胞をスクリーニングすべく化学変異原を用いて変異を導入した後、LOH を誘導しヘテロ変異をホモ化し、ランダム変異ライブラリーを構築した。変異導入率と相同染色体間の組換え頻度から、本ライブラリーはゲノム全ての遺伝子に対する変異細胞が存在していると推定された。このことを証明するため、GPI アンカー生合成経路の変異細胞を取得することとした。GPI アンカー生合成には現在 23 遺伝子の関与が明らかとされており、スクリーニングの結果、半数の遺伝子に対する変異体の取得に成功した。さらに、二つの新規変異株も合わせて取得でき、生合成に関する新しい遺伝子の存在が示唆された。GPI アンカー生合成変異体の取得は本システムが非常に有効に機能しており、これまで不可能であった培養細胞レベルでの劣性遺伝子のゲノムワイドスクリーニングを可能とした。

〔総括〕 本システムは現在 ES 細胞において利用できる。ES 細胞は未分化を維持し、またあらゆる組織、器官の細胞へと分化することができる。そのため再生医療への応用が大きく期待されている。しかし、未だ ES 細胞の未分化維持機構、そして分化の分子メカニズムの全容は明らかとされておらず、今後の研究において明らかにしていくことが ES 細胞を安全に再生医療へ役立てる上で必須であると考えられる。今回開発されたシステムは、こうした ES 細胞に特有にみられる現象に対して、順方向遺伝学的解析という新しい遺伝子探索アプローチを提供するものである。これまでの解析法では見えてこなかった、未知遺伝子の探索が行われると期待できる。今後、ES 細胞研究において幅広く利用されることが期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究では、培養細胞レベルでの劣性遺伝子スクリーニングを可能として、網羅的遺伝子解析の新たな手法を確立することを目標とした。そのために、ヒトのブルーム症候群が示す高頻度の mitotic recombination に着目し、両アレル変異導入法に応用することとした。マウス胚性幹 (ES) 細胞を用いてブルーム遺伝子を tet-off システムにより発現制御できる細胞をジーンターゲットングにて作製した。実際、この改変細胞において mitotic recombination 頻度を検定した結果、テトラサイクリン依存的に頻度を上昇させることができた。この両アレル変異導入法と ENU mutagenesis を組み合わせることで変異細胞ライブラリーの作製を行った。GPI アンカー生合成に着目して作製したライブラリーから生合成欠損細胞のスクリーニングを行った結果、mitotic recombination を誘導することでより多くの変異細胞が取得できることが示された。原因遺伝子の同定の結果、既知 23 遺伝子のうち約半数の 12 遺伝子の変異体を取得でき、さらに新規変異株 2 株も同時に取得することができた。点変異の同定の結果、野生型アレルが失われ、両アレル変異が導入されていることが示唆された。これにより、今回構築したブルーム遺伝子の発現制御に基づく両アレル変異導入システムを利用することで、劣性変異スクリーニングが可能であることが示された。

このシステムを用いることで、培養細胞レベルで表現型に着目した網羅的遺伝子スクリーニングが可能となり、ポストゲノム時代に適した手法として大いに応用性があると評価された。以上の業績から、学位授与に値すると考えられる。