



Title	Bloom's syndrome gene-deficient phenotype in mouse primary cells induced by a modified tetracycline-controlled trans-silencer
Author(s)	早川, 朋子
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46370
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 早 川 朋 子

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 19920 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 2 月 20 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 Bloom's syndrome gene-deficient phenotype in mouse primary cells induced by a modified tetracycline-controlled trans-silencer
(改変型テトラサイクリン依存性トランスサイレンサーにより誘発されたマウス初代培養細胞におけるブルーム症候群遺伝子欠損の表現型)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 竹 田 潤 二

(副査)

教 授 岡 部 勝 教 授 片 山 一 朗

論 文 内 容 の 要 旨

〈目的〉

テトラサイクリンにより可逆的な遺伝子発現調節を行うことのできる Tet-Off system では、テトラサイクリン非存在下で tTA (tetracycline-controlled trans-activator) がオペレーター配列 (tetO) に結合して目的遺伝子の発現が誘導される。本研究では Tet-Off system を用いてブルーム症候群遺伝子 (Blm) の発現制御を厳密かつ可逆的に行うことにより Blm 欠損表現型である両アレル変異導入を効率よく行うことを目標とした。

〈方法ならびに成績〉

tTA と tetO を有する Tet-Off カセットを Blm 遺伝子にノックインしたマウス ($Blm^{tet/tet}$) では、Blm 遺伝子の強い leaky expression が観察された。中でも脾臓における leaky expression が強く見られ、組織間において発現パターンの違いが見られた。そこで Blm 遺伝子の leaky expression を減少させるために、テトラサイクリン存在下で tetO に結合し、しかも転写抑制能がある rtTS (reverse tetracycline-controlled trans-silencer) を作製した。tTA は 2 量体形成により tetO に結合する事が知られており、同一の tetO 結合モチーフを有する rtTS も同様に 2 量体を形成すると予想される。よって、rtTS と tTA を同時に作用させる事により、rtTS と tTA のヘテロ 2 量体形成とそれに伴う tTA の転写活性阻害が予想された。そこで、2 つの rtTS をリンカーで連結させた sc rtTS (single-chain rtTS) をさらに構築し、rtTS 間のホモ 2 量体形成の促進と、その結果としての tTA 活性の阻害の回避を試みた。

HeLa 細胞に対し、tTA、tetO 配列を持つレポーター遺伝子、および rtTS または sc rtTS のいずれかを、transient, stable に導入した。rtTS、sc rtTS は共に leaky expression を低減したが、rtTS ではヘテロ 2 量体形成によると考えられる tTA による転写活性化阻害を認めた。一方、sc rtTS は tTA を阻害しなかった。これより sc rtTS は rtTS に比べて、tTA による転写活性化を阻害せずに leaky expression を低減させる事がわかった。次に $Blm^{tet/tet}$ マウスより調製した mouse embryonic fibroblast に対し sc rtTS を stable に導入し RT-PCR を行ったら、Blm 遺伝子の leaky expression が低下した。さらに $Blm^{tet/tet}$ マウスより調製した脾臓リンパ球に対し sc rtTS を stable に導入したところ、Blm 欠損の代表的表現型である sister chromatid exchange (SCE) の増加が観察された。最も leaky

expression が強く見られた脾臓において sc rtTS による SCE の増加が観察された事、また stable な sc rtTS の導入によって Blm 遺伝子の leaky expression の減少が観察された事から、sc rtTS によってマウス個体における Blm 遺伝子の厳密な発現制御が可能になると考えられた。

〈総括〉

SCE の増加と相同染色体間の組換え率の上昇や loss of heterozygosity (LOH) の増加は相関する事から、Blm 遺伝子発現抑制による両アレル変異導入が可能になり、マウス個体を用いた遺伝子機能のスクリーニング系確立が可能になることが期待される。

論文審査の結果の要旨

可逆的な遺伝子発現調節が可能な Tet-Off system を用いてブルーム症候群遺伝子 (Blm) の発現制御を厳密にし、両アレル変異導入を効率よく行うことを目標とした。Tet-Off system を構成する tTA と tetO を Blm 遺伝子にノックインしたマウス (Blm^{tet/tet}) は、テトラサイクリン投与後でも Blm 遺伝子の強い leaky expression が観察された。そこでテトラサイクリン存在下で tetO に結合し、しかも転写抑制能がある rtTS を作製した。しかし rtTS と tTA はヘテロ 2 量体形成が予想されたので、2 つの rtTS をリンカーで連結させた sc rtTS をさらに構築した。HeLa 細胞に対し、tTA、rtTS または sc rtTS と、tetO を持つレポーター遺伝子を導入したところ、sc rtTS は rtTS に比べて、tTA を抑制せずに leaky expression を低減させる事ができた。さらに、Blm^{tet/tet} マウスより調製した脾臓リンパ球に対し sc rtTS を導入したところ、Blm 欠損の代表的表現型である sister chromatid exchange の増加が観察された。既に sc rtTS 発現 Blm 変異マウスも作製しており、今後はこのマウスを用いて Blm 遺伝子発現制御による両アレル変異導入が可能になり、マウス個体を用いた遺伝子機能のスクリーニング系確立が可能になることが期待される。

これらの研究成果は学位に値するものと認める。