

Title	Sleeping Beauty Transposon-Based Phenotypic Analysis of Mice : Lack of Arpc3 Results in Defective Trophoblast Outgrowth
Author(s)	八戸, 宏二郎
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47447
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 や 八 戸 宏 二 郎

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 2 0 9 9 4 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 19 年 3 月 23 日

学 位 授 与 の 要 件 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当

医学系研究科社会医学専攻

学 位 論 文 名 *Sleeping Beauty* Transposon-Based Phenotypic Analysis of Mice : Lack of *Arpc3* Results in Defective Trophoblast Outgrowth
(*Sleeping Beauty* トランスポゾンを用いて作製した変異マウスの表現型解析 : *Arpc3* 遺伝子欠損は、栄養膜細胞のアウトグロースに異常がある。)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 竹 田 潤 二

(副査)

教 授 板 見 智 教 授 木 村 正

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

モデルマウスの作製は、遺伝子解析及びゲノムの理解に重要な役割を持っている。現在そこで、*Sleeping Beauty* (SB) トランスポゾンを用いて作製した変異マウスにおいて表現型の解析が行えるか調べるために、約 100 ラインのマウスを作製した。それらのトランスポゾンの転移部位を同定し、そのうちの 1 ラインにおいて phenotype の解析を行った。

[方法ならびに成績]

研究方法として、*Sleeping Beauty* とよばれるトランスポゾン内にジーントラップベクターが組み込まれた配列を変異原とし、そのトランスジェニックマウスとトランスポゼースのトランスジェニックマウスを掛け合わせトランスポゾンとトランスポゼースを両方持つマウスを作製し、seed mouse とした。トランスポゾンは、この seed mouse の生殖細胞でトランスポゾンは転移する。また、トランスポゾン内の CAG-GFP-SD 配列が転移先の内在遺伝子の polyA 付加シグナルを利用して発現する構築になっており、遺伝子の中にトランスポゾンが挿入された場合に GFP が発現する仕組みになっている。そこで、Seed mouse と野生型の ICR と交配させると、一腹に約 1 匹の割合で GFP 陽性マウスが得られた。この GFP 陽性マウスを約 100 匹作製し、ligation mediated PCR を用いてトランスポゾンの周囲のゲノムの配列を Sequence した。また、3'-RACE 法によって、下流遺伝子の配列も読み、両方のデータを on line public data base で検索することによりトランスポゾンのゲノム内の挿入部位のマッピングを行った。

トランスポゾン挿入変異マウスの中で胎生致死を示す 1 系統に着目し更なる解析を行った。まず、この遺伝子欠損ホモマウスは、Genotyping で確認したところ産まれてこなかった。受精後 3.5 日の初期胚の段階では、PCR によりメンデルの法則に従って胚は形成されているが、3.5 日以降において homozygote は確認できなかった。RT-PCR により、トランスポゾンベクターによって *Arpc3* 遺伝子の全長の mRNA が発現されていない事も確認した。

次に、Blastocyst を ES medium で培養し、着床を in vitro で見る系を行った。その結果、WT の卵は将来胎盤と成る栄養膜細胞が outgrowth するが、ホモの blastocyst では、それが起こらない。これにより致命傷となる栄養膜細

胞の移動に障害が起きていると考えられた。現在までに、*Arpc3* をサブユニットにもつ Arp2/3 複合体は、細胞の末端でアクチンの再構成を行うことが知られている。そこで、ローダミン-ファロイジンによるアクチン骨格の染色及び、接着斑分子マーカー (Vinculin, Paxillin) の免疫染色を行った。WT では、この時期の栄養膜細胞には、接着斑につく豊富なアクチン骨格が見られるが、変異体においてはその形成が見られなかった。さらに、レプリカ電顕による細胞末端の細胞骨格の構造も著しく障害されていた。また、Bacterial artificial chromosome (BAC) のリコンビニアリングを用いて、Exon2 を Neo 遺伝子に置き換えるためのターゲティングベクターを作製した。これにより得られた *Arpc3* KO 変異マウスも同じ表現型を示すことを証明できた。これらの結果、トランスポゾンの挿入変異マウス作製が、個体レベルでの遺伝子解析に使える事を示している。

[総 括]

これらの結果、トランスポゾンの挿入変異マウス作製が、安定して個体レベルでの遺伝子解析に使える事を示した。また、*Arpc3* の変異はマウス初期胚において 3.5 日で致死となる事も突き止めた。今回の表現型は、最も初期に起こる細胞遊走の現象であり、この遺伝子産物を含む Arp2/3 複合体は着床時の細胞遊走に必須であった。この複合体の活性化因子として知られる Wasp ファミリーは、複数因子存在し、それぞれの KO マウスでは、3.5 日より後に致死が起こる。今回の解析の結果、*Arpc3* 変異体が、個別の Wasp 変異体の表現型よりもシビアである事から、この遺伝子を含む Arp2/3 複合体は細胞遊走時における Wasp ファミリーの単一の Executor である考えを in vivo においても示唆する結果となった。

論文審査の結果の要旨

Sleeping Beauty トランスポゾンを用いて変異マウス作製し、*Arpc3* 遺伝子にトランスポゾンの挿入が見られるマウスの表現型解析を行った。*Arpc3* 遺伝子欠損ホモマウスは胎生致死であった。5.5 日胚、7.5 日胚、8.5 日胚、10.5 日胚では、ホモ胚が認められなかったが、3.5 日胚 (胚盤胞) では、ホモ胚がメンデルの法則に近い数で認められた。野生型とホモの胚盤胞を培養した。ホモの栄養膜細胞は野生型に比べて *outgrowth* が著しく障害されていた。そこで、アクチン骨格の染色及び、接着斑分子マーカーの免疫染色を行った。野生型では、この時期の栄養膜細胞には、アクチンに富む接着斑構造が見られるが、ホモにおいてはその形成が著しく減少していた。レプリカ電顕による細胞末端の細胞骨格の構造も著しく障害されていた。この表現型が *Arpc3* 遺伝子に起因する事を確かめるために、従来の方法でノックアウトマウスを作製し Genetic complementation test を行った。その結果、*Arpc3* ノックアウトアレルは、トランスポゾン挿入による表現型をレスキューするが出来なかった。このことから、トランスポゾン挿入による表現型は *Arpc3* 遺伝子が原因であることが確かめられた。これらの結果から、トランスポゾンの挿入変異マウスの作製が、個体レベルでの遺伝子解析に有用である事を示している。これらの業績は博士 (医学) の学位授与に値する。