

別紙様式 8

研 究 主 論 文 抄 録

論文題目 変異マウス作成における技術開発とバイオイメージングへの応用
(Developing technologies for mutant mice production and its application to
bio-imaging)

熊本大学大学院自然科学研究科 理学 専攻 生命科学 講座
(主任指導 安部 眞一 教授)

論文提出者 清成 寛
(Hiroshi Kiyonari)

主論文要旨

《本文》

変異マウスは遺伝子の機能を知る為の重要かつ必須なツールの 1 つであり、変異マウスの作成技術は今日まで目覚ましい発展を遂げている。しかし、改善すべき点も数多く残されている。本研究では変異マウス作成における新たな技術開発とその技術を利用したバイオイメージングへの応用について検討した。

変異マウス作成において大きな問題点の 1 つは作成に多大な時間を要する事であり、中でも最も時間を要する過程の 1 つにターゲティングベクターの作製が挙げられる。従来は BAC DNA から必要な領域のゲノム DNA だけを制限酵素で切断・精製後ライゲーションしていたが、この作業には高い技術と時間を要していた。本研究では、PCR 法を活用する事でその工程を簡略化することに成功した。しかし、その後、PCR 法による増幅にはいくつかのエラーが入ることが示唆され、その事による相同組換え効率の低下が懸念された。そこで大腸菌の中でプラスミド同士の組換えを起こさせる技術を利用する事で、ES 細胞内での相同組換え効率を低下させることなく、従来の方法よりも大幅な時間短縮と工程を簡略化したターゲティングベクターの作製技術を開発した。

変異マウス作成における、もうひとつの大きな問題点は ES 細胞を生殖細胞への分化能を保持したまま培養することの難しさである。ES 細胞は一般的に継代を繰り返すとその能力が低下する。この原因は継代を重ねる内に生殖細胞分化能を持たない一部の細胞が分化能をもつ細胞に影響を与え、徐々に分化能を持たない細胞の割合が増えていく事にあると私は考え、生殖細胞分化能を持たない細胞のみを分離する技術の開発に取り組んだ。数回継代を繰り返した ES 細胞を低密度でディッシュへ播種し、single cell からコロニーを形成させた。形成されたコロニーをピックアップし、それぞれ独立して培養後、マウスの初期

胚へ注入し、マウスへの寄与率および生殖細胞分化能を判定し、リクローニング株とした。このリクローニング株は安定してキメラマウスになることができた。このリクローニング法により、継代を繰り返した ES 細胞からも高率に生殖細胞へ分化する ES 細胞を得る事に成功した。

現在 C57BL/6 系統マウスは各種の実験に広く利用されている標準系統であり、また BAC ライブラリーなど様々なリソースが最も豊富な系統である。このことから C57BL/6 由来の ES 細胞株を樹立することが期待されているが、従来の方法では C57BL/6 胚から効率良く ES 細胞株を樹立することは極めて困難であった。そこで私は近年 Ying ら (Nature 453, 2008) によって開発された 3 つの阻害剤 (3i) を培地内に添加する方法を用いて、C57BL/6N 由来の ES 細胞株の樹立を試みた。C57BL/6N の 8 細胞期胚を血清の代わりに 3i を添加した培地にて 3 日間培養後、feeder 上で同様に 3i 添加培地にて 3~7 日間培養した。増殖した ICM を単離しトリプシン処理後さらに 3~5 日間の培養を行い、10 ラインの ES 細胞株を樹立した。キメラマウスを作成するため、樹立した ES 細胞株をそれぞれ ICR 系統の 8 細胞期胚へ注入した。得られたキメラマウスについて、ES 細胞の毛色への寄与率を判定すると共に、野生型マウスと交配することで生殖細胞への寄与についても観察した。そうしたところ、従来の方法よりも効率よく C57BL/6N 由来の ES 細胞株が樹立できた。この樹立した ES 細胞株からは高率に寄与したキメラマウスを多数得ることができ、そのキメラマウスは生殖細胞への高い寄与率を示した。以上の実験から、今まで困難であった C57BL/6 系統から容易に、かつ、高率に生殖細胞に寄与する能力を安定して保持している ES 細胞を樹立する技術の開発に成功した。

さらに私はこれらの新開発した変異マウス作成技術を駆使し、ROSA26 遺伝子座にレポーター遺伝子を導入して様々な細胞小器官でそのレポーター遺伝子を発現するマウスを作成した。まず作成したこれらのマウスについて正しく目的の場所でレポーター遺伝子を発現しているかどうかを確認する為に、初期胚での発現解析を行った。2 細胞期胚から blastocyst までの受精卵を連続観察すると各細胞小器官においてレポーター遺伝子の発現を確認できた。また、着床前後の胚における細胞小器官の経時的観察を可能にする為、着床前から 6.5 日目胚近くまでの連続した全胚培養技術を確立した。

本研究で確立した技術は、変異マウスを迅速かつ安定に作成する事を可能にした。また、レポーター遺伝子を用いたバイオイメージングは、初期発生中の遺伝子の働きや細胞の動きを明らかにする重要な手段になる事が期待される。