

# 論文内容の要旨

申請者氏名 Mayasari Ni Luh Putu Ika

全てのタンパク質コード遺伝子をマウス ES 細胞中で破壊することを目指す国際的なノックアウトマウス・プロジェクト (KOMP) において採用されている挿入型変異導入法の中で、ランダムな遺伝子トラップは大きな役割を果たしているが、それは同法が単純、迅速、かつ安価であるからに他ならない。遺伝子トラップで破壊できなかった遺伝子に関しては、遺伝子ターゲティング実験を敢行することにより、個別に破壊することが急がれている。申請者は、KOMP ではポリ A トラップ法 (標的細胞中で恒常的に発現される遺伝子のみならず、全く発現されない遺伝子をも破壊することが可能な手法として開発されたもの) が活用されているにも拘らず、これまでに樹立されたおびただしい数の細胞株の中で、マウス ES 細胞中で発現されない遺伝子がトラップされた ES 細胞クローンの割合が極めて小さいことを示した。また申請者は、研究者の間で広く使われるレトロウイルスの骨格を持った申請者らの条件的遺伝子破壊型ポリ A トラップ・ベクターは、標的細胞中で恒常的に発現される遺伝子に強く偏って挿入されることを見出した。最も重要な点は、そのレトロウイルスの骨格を持つ条件的遺伝子破壊型ポリ A トラップ・ベクターで遺伝子トラップを実行した場合、ベクター内で予期せぬ欠失や組換えがあまりにも高頻度で発生するため、条件的な遺伝子破壊を達成することが事実上不可能になってしまうということである。申請者は、カット & ペースト型 DNA トランスポゾンのひとつ *Tol2* が、レトロウイルスが持つ上記の欠点を全く有しておらず、ES 細胞中で発現されない遺伝子や遺伝子候補を含む広範囲の遺伝子群を同定し、条件的に破壊することを保証する遺伝子トラップ・ベクターのための理想的なプラットフォームとして機能することを見出した。また申請者は、単一細胞のゲノム中に多数のベクターが挿入されることによって引き起こされる厄介な難問を、異なるタグで標識された 15 種類の *Tol2* トランスポゾンを混合して遺伝子トラップ実験に応用することにより完全に解決した。申請者が今回新たに開発した戦略は、標的細胞中の遺伝子の条件的破壊アレルを大量生産するための極めて有効な手段であると考えられる。

# 論文審査結果の要旨

申請者氏名 Mayasari Ni Luh Putu Ika

マウス ES 細胞中で全タンパク質コード遺伝子を挿入型変異導入法によって破壊し、樹立された多数の ES 細胞クローンを無条件で研究者に供給することを目指し、現在欧米ではノックアウトマウス・プロジェクト(KOMP)が推進されている。この KOMP の中で、遺伝子トラップ法は重要な役割を果たしており、今日までに遺伝子トラップ法により、45 万株以上の ES 細胞クローンが樹立されている。しかしながら申請者は、このおびただしい数の ES 細胞クローンの大半では、同細胞中で恒常的に発現される遺伝子がトラップされており、転写活性を全く持たない遺伝子(組織特異的遺伝子など)がトラップされたものは極めて限られていることを見出した。

また申請者は、遺伝子トラップに最も広く利用されているレトロウイルス型ベクターの場合は、たとえポリ A トラップを実行したとしても、恒常的に発現される遺伝子に好んで(偏って)挿入される強い傾向があり、さらに、ベクター内で欠失や組換えが非常に高頻度で発生するため、特に標的細胞中で発現されない遺伝子群を条件的に破壊する実験目的には、全く適していないことを見出した。

一方で申請者は、カット&ペースト型 DNA トランスポゾンのひとつ、*Tol2* を遺伝子トラップベクターの骨格に用いれば、レトロウイルス型ベクターが持つこれらの欠点を殆ど全て克服することができ、標的細胞中で発現されない遺伝子を含む広範囲の遺伝子群を条件的に破壊することが可能になることを見出した。

*Tol2* 型遺伝子トラップベクターの唯一の欠点として、ひとつの ES 細胞のゲノムに挿入されるベクターのコピー数を厳密にコントロールすることが困難な点が最後に残ったが、申請者は、異なるタグで標識された 15 種類の *Tol2* トランスポゾンを混合して遺伝子トラップ実験に応用する新しい手法を開発し、ひとつの ES 細胞のゲノムに複数のベクターが挿入された場合でも、簡単にそれぞれのベクター挿入部位を特定することを可能にした。

以上のように本論文は、マウス ES 細胞中で広範囲の遺伝子群を条件的に破壊することを目的として、ランダムな遺伝子トラップに関する新たな手法を開発したもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士(バイオサイエンス)の学位論文として価値あるものと認めた。