

## 論文内容の要旨

申請者氏名 白 潔

ランダムな遺伝子トラップ法は、優れた変異導入法として、マウス ES 細胞中のタンパク質コード遺伝子の変異体の作製に大きく貢献した。過去に行われた国際的ノックアウトマウス・プロジェクト (KOMP) において、従来の遺伝子トラップ法によって約 13 万株の変異導入 ES 細胞クローンが産出された。一方、マウス ES 細胞中で恒常的に発現するタンパク質コード遺伝子の約 81% が既にトラップされているのに対し、非発現遺伝子に占めるトラップされたものの割合は僅か 22% に過ぎないことが報告されている。未分化 ES 細胞中の非発現遺伝子は神経細胞や血球細胞等に特異的に発現するものが多く、重要な生物学的機能を持つことが知られている。これらの非発現遺伝子の変異体を樹立するために、KOMP のもとでは遺伝子ターゲティング法による個別破壊が大規模に実施された。しかしながら、近年、挿入型変異導入の対象細胞はマウス ES 細胞からヒト iPS 細胞や腫瘍細胞等へと急速に拡大しつつあるため、新種の標的細胞が出現するたびに、時間と労力を要する遺伝子ターゲティングに依存した大規模プロジェクトを立ち上げることは、非現実的であると言わざるを得ない。また、ゲノム編集の主流である CRISPR-Cas9 システムは変異体の樹立に大きく貢献してきたが、標的外領域へのオフターゲット効果は依然として課題となっている。

本研究では、*To12* トランスポゾンベクターのバックボーンに使用し、ジフテリア毒素 (DT) の細胞殺傷能力による「負の選択」に基づく新しい遺伝子トラップ法 DTrap を確立し、マウス ES 細胞中の非発現遺伝子、特に組織特異的遺伝子のみを対象にしたランダムかつ高効率な挿入型変異導入を実現した。特に弱毒化した DTrap ベクターを用いて遺伝子トラップを実施したところ、マウス ES 細胞中の既知の非発現遺伝子を非常に効率よく、かつランダムに破壊できることが明らかになった。さらに、DTrap 法により樹立した変異体の中に、non-coding RNA や新規遺伝子候補と推測される未知領域をトラップしたものが比較的高い割合で存在することが明らかになった。また、DTrap 法によりトラップした遺伝子のプロモーターの支配下に、ベクター内に配置されている DT や EGFP などのマーカータンパク質を発現させ、培養細胞やマウス個体レベルで cell lineage ablation 実験や cell lineage labeling 実験を遂行できることを確認した。今後、マウス未分化 ES 細胞のみならず、ほかの細胞種や個体を用いた DTrap 実験を実施することにより、既知の組織特異的遺伝子、もしくは新規の組織特異的遺伝子の機能解析と病態解明へ、大きく貢献することができると考えられる。

やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 白 潔

今から 15 年以上前、ヒトやマウスなどの主要動物のゲノム配列が解読され、タンパク質をコードする遺伝子の変異体を樹立することにより、その機能を明らかにする研究が盛んに行われて来た。変異体を樹立する手法は、内在性遺伝子のプロモーター活性を利用したプロモータートラップ法から、プロモーター活性に左右されずに遺伝子を破壊できるポリ A トラップ法へと改良が重ねられた。しかしながら、これらの従来の手法を用いた場合、生体内で重要な役割を果たす組織特異的遺伝子を、未分化 ES 細胞中でランダムに捉えることが非常に困難であった。申請者は、従来のポリ A トラップ法に更なる改良を加えることにより、これまでの手法では、ES 細胞中でのランダムな捕捉が困難だった組織特異的遺伝子の変異体モデルの樹立に取り込んだ。

申請者は、ジフテリア毒素 (DT) 遺伝子をポリ A トラップベクターに組み込み、DT の細胞殺傷能力を生かし、非発現遺伝子のみを標的にランダムな遺伝子破壊を行う DTrap 法を開発した。変異体樹立の効率を上げるために、DT の毒性を弱めた DTrap ベクターも構築した。従来のレトロウイルス型トラップベクターの代わりに、*Tol2* トランスポゾンバックボーンを使用することにより、トラップベクターが恒常的に発現する遺伝子に偏って挿入される強い傾向が改善され、頻発するベクター内の欠失や組換えの問題点も解消できた。更に、DTrap ベクターの内部に個々のベクターを識別するためのタグ配列を配置することにより、標的細胞ゲノム中に挿入されたベクターのコピー数の判別を容易にした。DTrap 法は従来のトラップ法に比べ、非常に効率よく非発現遺伝子を狙って破壊することができ、特に神経細胞、血球細胞、筋肉細胞関連の組織特異的遺伝子の変異体の樹立に貢献できることを証明した。樹立した変異体にベクターが単一コピーで挿入された ES 細胞クローンが 8 割以上を占めており、更にベクター内部構造の完全性が高いため、FLPo 部位特異的な組換えが高効率で引き起こされることを示した。さらに、オリジナルの DT 発現クローンや、組換えにより DT カセットを除去した EGFP 発現クローンを、細胞レベル及び生体レベルでの cell lineage ablation 実験と cell lineage labeling 実験に効率よく応用できることを証明した。未分化 ES 細胞を用いた組織特異的遺伝子の変異体の樹立と解析は、発生過程における形態形成等のみならず、免疫系や神経系のような多細胞群が協調して成り立つ高次生体機能の解明を目指す際にも、問題解決の重要な糸口になることが期待される。

以上のように、本論文は、未分化 ES 細胞中の非発現遺伝子を標的にした挿入型変異導入法として、新たに開発した DTrap 法が非常に有効な手法であることを報告した。DTrap 法を用いて培養細胞レベル及びマウス個体レベルで変異体を樹立することにより、既知の組織特異的遺伝子の機能解析のみならず、新規遺伝子のスクリーニングにも大きく貢献するものであることから、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。

やむを得ない事由[ 図書出版, 学術雑誌等への掲載, 特許・実用新案出願, 個人情報等の保護, その他 ( ) ]により本要旨を非公表とする。

【※該当する事由に○印をすること】