

様 式 F - 7 - 1

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成26年度）

1. 機関番号 

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学

3. 研究種目名 挑戦的萌芽研究 4. 補助事業期間 平成26年度～平成27年度

5. 課題番号 

2	6	6	4	0	0	5	8
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 細胞系譜除去マウスの網羅的作製とそのレスキュー

## 7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
1 0 2 2 1 7 5 6	イシダ ヤスマサ 石田 靖雅	バイオサイエンス研究科	准教授

## 8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

## 9. 研究実績の概要

本研究の基盤となる「テトラプロイド胚のコンプリメンテーション」を行い、マウスの発生を解析した。このテトラプロイド胚に注入するES細胞は、B6-129 F1マウス由来のKY1.1を用いた。さらに、DTrap法によって樹立されたES細胞クローンの中から&#61543;amma-E-crystallin遺伝子（眼球のレンズで特異的に発現）がトラップされたものをピックアップし、テトラプロイド胚のコンプリメンテーション実験を行った。

本研究の最終局面では、DTの発現によって除去された細胞系譜を、テトラプロイド胚に共注入する「第二のES細胞株」によってレスキュー（再建）できるかどうかテストするが、共注入するES細胞としては、野生型に加えて、特定の遺伝子をbi-allelicに破壊したES細胞株を用いる。このようなES細胞株を用意するため、まずハプロイドES細胞株を利用してランダムなポリAトラップを行い、ベクターが細胞あたり1コピーで挿入されたハプロイドES細胞株のみを迅速に選別した。ハプロイドES細胞株には、時間経過とともに自然にディプロイド化する、という性質があるため、当初は細胞あたり1コピーであったベクターが、ディプロイド化にともない、細胞あたり2コピーになる。その状態で一過性にCreを発現させた場合、一部の細胞では確率的に片方のNEO-PUROカセットのみが反転し、そのような細胞は、G418とpuromycinの両者に耐性を示すようになる。このようにして、多数の両アレル遺伝子破壊ES細胞株を樹立し、定法にしたがい、トラップされた遺伝子を判別した。この両アレル遺伝子破壊のステップは、大阪大学医学部・竹田潤二博士との共同研究によって遂行した。

## 10. キーワード

- |              |            |               |               |
|--------------|------------|---------------|---------------|
| (1) DTrap    | (2) 細胞系譜除去 | (3) ハプロイドES細胞 | (4) 両アレル遺伝子破壊 |
| (5) テトラプロイド胚 | (6)        | (7)           | (8)           |

## 11. 現在までの達成度

(区分)(3) やや遅れている。

(理由)

両アレル遺伝子破壊ES細胞クローンの樹立は非常に順調に進行している。その一方で、テトラプロイド胚のコンプリメンテーション実験には難航していると言わざるを得ない。テトラプロイド胚としては、BDF1マウス由来のtwo-cell embryoを採取し、electrofusion法にて細胞融合を行ったあと、胚盤胞期まで培養したものをを用いた。このテトラプロイド胚へは、B6-129 F1マウス由来のES細胞株KY1.1(野生型)と、 $\alpha$ -E-crystallin遺伝子(眼球のレンズで特異的に発現)がDTrapベクターによってトラップされたES細胞クローンの二種類をインジェクトしたが、いずれの場合もマウスが胎生後期まで発生しなかった。しかし、これらのコンプリメンテーション実験は、これまでに試みた回数やスケールが非常に限定的であるため、技術的な安定化を目指し、さらに試行を繰り返す必要がある。

## 12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

前年度に引き続き、野生型ES細胞(特に継代数の少ないものを選別して用いる)、あるいはDTrap法で作製したES細胞クローンによるテトラプロイド胚のコンプリメンテーションを試みる。後者による細胞系譜の除去が明らかになった場合には、次のステップとして、同じテトラプロイド胚に対して、DTrap法で作製したES細胞クローンと野生型ES細胞の共注入を行い、DTの発現によって除去された細胞系譜のレスキューを目指す。

さらに本研究の最終ステップとして、両アレル遺伝子破壊ES細胞株(ハプロイドES細胞由来)の共注入による細胞系譜のレスキューを試みる。この実験で、野生型ES細胞と同様に、両アレル遺伝子破壊ES細胞株でもDTによって除去された細胞系譜のレスキューが達成できた場合、それはbi-allelicに破壊された遺伝子「X」は、その細胞系譜の形成にとって必要不可欠ではないことを意味する。しかし逆にレスキューが達成できなかった場合には、その遺伝子は注目する細胞系譜の形成にとって必須のものであることが分かる。両アレル遺伝子破壊のためのトラップベクターでは、遺伝子破壊は可逆的なものになっているため、Flpの一過性発現により、破壊された遺伝子の活性を復活させた場合には、細胞系譜の再建が野生型ES細胞と同様に達成できることを最後に確認する。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

細胞培養実験に必要な消耗品を次年度の購入にしたため。

(使用計画)

平成27年度の細胞培養実験のために、当初は300,000円を支出する計画であったが、次年度使用額の25,851円と合わせ、325,851円を支出することにする。

## 13. 研究発表(平成26年度の研究成果)

(雑誌論文) 計(0)件 うち査読付論文 計(0)件

著者名		論文標題			
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	
掲載論文のDOI(デジタルオブジェクト識別子)					

(学会発表) 計(1)件 うち招待講演 計(1)件

発表者名	発表標題【発表確定】	
Yasumasa Ishida	Gene Discovery in Haploid ES Cells	
学会等名	発表年月日	発表場所
第66回日本細胞生物学会大会(テクニカルシンポジウム)(招待講演)	2014年06月11日~2014年06月11日	奈良県奈良市・奈良県新公会堂

(図書) 計(0)件

著者名	出版社		
書名	発行年	総ページ数	

## 14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

(出願) 計(0)件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

(取得) 計( 0 )件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15.備考

--