

サブテーマ名：B 相同組換えによる高速ゲノム進化法の開発

小テーマ名：B2 マウス ES 細胞における相同組換えクローン単離技術の改善

フェーズ I<2-b>

[概要]

マウスES細胞における相同組換え・ジーンコンバージョンを、ECFP蛍光タンパク質をコードする遺伝子の発現から、EGFPの発現に変換により検出するシステムを構築し、そのシステムを用いて、ジーンコンバージョンを誘導する物質を同定することを試みた。

ES細胞を用いた相同組換えは、ロックアウトマウス作成において、必須なステップである。哺乳動物等の高等生物における相同組換えは、酵母等の場合と比べ、一般にその頻度が極めて低く、かつ、1つの細胞の中でも、遺伝子座によって、その頻度に大きなばらつきが見られる。また、ES細胞を用いた再生医療の実現にとって、疾患の原因遺伝子を相同組換えにより、正常遺伝子と効率よく交換できるようになることが必要条件の一つである。但し、ターゲティングベクターを工夫することでES細胞における相同組換えの頻度を上昇させようといった試みは行われているものの、相同組換えの頻度を上昇させる効果を持つ物質の探索を目的とした研究は皆無であり、本研究はそのことを目標としている点で独自性があるといえる。

[フェーズ I の研究成果]：

tTA 転写アクティベーター依存性のプロモーターにつないだ ECFP 遺伝子と、転写ユニットを持たない EGFP 遺伝子の両方を持ったプラスミドをマウス ES 細胞に導入し、テトラサイクリン依存性に ECFP を高発現する細胞株を得た。そして、ニワトリの細胞である DT40 においてジーンコンバージョンを誘導することが示されているトリコスタチン A を添加することで、ECFP の発現が EGFP の発現へと移行する細胞の分離を試みた。

[今後の展開]：

哺乳動物由来の細胞株として、私たちにとって取り扱いが慣れている ES 細胞を用いて、全ての実験を行ったが、結論として、この細胞からは、ジーンコンバージョンを起こした細胞を得ることができなかった。遺伝子のジーンコンバージョンは、B 細胞等の免疫系の細胞の方が高い可能性があるため、それらの細胞を用いて今後は実験していきたいと考えている。