

氏名 渡 部 聡

学位（専攻分野） 博士（学術）

学 位 記 番 号 総研大甲第160号

学位授与の日付 平成7年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 生理科学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 A Novel Method for Production of Transgenic Mice
from Embryonic Stem Cells

論文審査委員 主 査 教 授 小 幡 邦 彦

教 授 池 中 一 裕

教 授 井 本 敬 二

教 授 岡 田 泰 伸

教 授 三 品 昌 美（東京大学）

論文内容の要旨

I developed a novel method for production of transgenic mice for the phenotypic rescue experiment of gene knockout mice with ES cells. For this experiment, I showed that puromycin, a protein synthesis inhibitor, could be used for the selection of recombinant ES cells from heterozygously gene disrupted G418 resistant ES cells. ES cells were killed by culturing with puromycin at a concentration 0.1 mg/ml for 2-days. Puromycin could function independently from G418, because G418 resistant ES cells were also killed at the same condition. ES cells could acquire puromycin resistance by introducing the *pac* gene, and the recombinant ES cells could survive against the puromycin selection. G418-puromycin double drug resistant ES cells could generate chimeric mice at high rate, and maintained high germline differentiating potency. The *pac* gene was transmitted to offsprings via chimeric mice, and the gene function was maintained among them.

For the rescue experiment by the gene-trap method, I used Fyn knockout mice as a model. GT-2 gene-trap vector was introduced into *fyn* heterozygously disrupted ES cells. The vector contained the *lacZ* gene and human *fyn* cDNA as reporter genes and the *pac* gene as a selection marker. Among puromycin resistant ES cells, *lacZ* positive clones were obtained. In these clones, Fyn was also expressed, and the insertions of the GT-2 vector were confirmed by southern blotting analysis. These results suggested that the endogenous promoter could direct the expression of introduced gene. Chimeric mice were produced with the *lacZ* positive clones by the microinjection, and germline chimeras were obtained from three clones. The mice with the subjected genotype [*fyn*(-/-), *gt*/+] were obtained among F1 offsprings between these chimeras and Fyn deficient mice.

審査結果の要旨

ES細胞を用いたジーンターゲティング法の開発によって、どのような遺伝子でも変異体を作製でき、その遺伝子の個体内での機能を解析することが可能になった。しかし、範囲あるいは発生過程の広い時期に発現する遺伝子をターゲティングすると、複数の表現型が現れることがある。これらの表現型と遺伝子欠損部位、あるいは欠損時期との関係を明らかにするために、遺伝子欠損マウス内で欠損させた遺伝子を部位、あるいは時期特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、表現型を回復させるレスキュー実験が考えられる。

申請者はFyn欠損マウスをモデルとして用い、これまでにマウスES細胞を用いた遺伝子組み換え体作成技術についての知見を詳細に検討し、それらを踏まえレスキュー実験のためのトランスジェニックマウス作製法を新たに開発した。その特徴として、(1) 遺伝子欠損マウスを作製する際に得られている遺伝子ヘテロ欠損ES細胞に遺伝子を導入する。これにより遺伝子欠損でかつ導入遺伝子を持つマウスをF1世代で得られ、野生型のES細胞を用いた場合に比べ世代時間を短くできる、(2) ジーントラップ法を用い内在性の未知のプロモーター活性により導入遺伝子を発現させる。これにより目的の部位あるいは時期特異的な発現をするプロモーターを単離せずに導入遺伝子を発現させることが可能になる、といったことがある。

この実験法を開発するために、申請者は新たにタンパク合成阻害剤、ピューロマイシンとピューロマイシン耐性(*pac*)遺伝子を用いた選択系を開発した。これにより*neo*遺伝子を導入しG418耐性で選択された遺伝子ヘテロ欠損ES細胞に対して新たに遺伝子を導入する際の組み換え体の選択することが可能になった。この方法は高い生殖細胞分化能を維持した組み換えES細胞を選択できるため注目を集めており、その結果は *Biochemical and Biophysical Research Communications* (in press) にも報告している。次に申請者はピューロマイシンによる選択法を用いたジーントラップ法によるレスキュー実験を行うために、*fyn*ヘテロ欠損ES細胞に*lacZ*遺伝子、ヒト*fyn* cDNA、*pac*遺伝子を連結したGT-2ジーントラップベクターを導入した。その結果、ピューロマイシン耐性の細胞の中に*lacZ*陽性でかつFynタンパクを発現するクローンが得られた。このことより内在性の未知のプロモーターの活性により*lacZ*と*fyn*遺伝子両方を発現させることが可能であることを明らかにした。これらのES細胞を用いてキメラマウスを作製したところ生殖系列キメラを得ることができ、キメラマウスをFyn欠損マウスと掛け合わせを行って得られるF1世代で目的の遺伝子型である*fyn*ホモ欠損で導入遺伝子を持つ個体を得られることが明らかになった。

申請者はFyn欠損マウスで認められる表現型の回復させるまでには至らなかったが、新たに開発した技術は、これまでターゲティングだけでは明らかにできない遺伝子の機能を解析するために非常に有効な方法であり、これから広く用いられることが予想され、意義が大きい研究である。論文の英語表現についても適切であり、申請者の研究の内容は博士論文に値するものであるとの結論を得た。

審査委員会は、渡部聡氏の提出論文の内容および生理学一般の知識について試問を行った。その結果、渡部氏は、本人の行った研究に関する知識、および生理学全般における知識を十分に有しており、研究の位置づけも理解していると判断された。渡部氏の提出論文の前半はすでに *Biochemical and Biophysical Research Communication* にacceptさ

れており、後半の研究も論文掲載可能であると考えられる。提出論文の英語から英語の能力も十分なレベルにあると判断された。

以上のことから、審査委員会は、渡部聡氏の論文内容、学識、語学力ともに博士（学術）を授与するに値すると判断した。