

L17**Cre-loxPによる染色体ホットスポットへ逐次遺伝子導入可能なES細胞の作製**

- (学) 大林 弘和¹、(学) 亀山 雄二郎²、(学) 黄 碩豪³、(学) 山元 秀晃²、(正) 河邊 佳典²、
(正) 井藤 彰²、(正) 上平 正道^{*2,3} (¹九大工、²九大院工・化工、³九大院・シス生命)

1. 緒言

ES細胞は再生医療の細胞源として注目されているとともに、外来遺伝子を導入することで、遺伝子改変動物の作製を行うことができる。しかし、ES細胞からのトランスジェニックマウス作製において、複雑な発現ベクターコンストラクトの構築やターゲットクローンの選定、さらにキメラマウスから子孫への遺伝子伝播確認など、煩雑かつ不確実なことが問題となっている。このため、子孫で確実に導入遺伝子発現が確認される染色体部位において、発現ベクターを効率的に染色体へ導入することが望ましい。一方、我々はこれまでに Cre および変異 loxP 配列を用いて、Cre 依存的かつ動物細胞染色体上のターゲットサイト特異的に目的遺伝子を逐次遺伝子組込みする方法を開発してきた (1)。

本研究では逐次の遺伝子組込みシステムを用いて、マウス染色体上において導入遺伝子を安定発現させるための部位（ホットスポット）特異的に、目的遺伝子を導入することが可能な ES細胞株の作製を試みた。

2. 実験方法

染色体ホットスポットの一つとして知られている ROSA26 遺伝子座への相同組換えベクターには、rtTA 遺伝子および、その下流に両端を野生型 loxP および変異 loxA に挟まれたレポーター遺伝子 (IRES-neo) を組込んだ (pR26/rtTA-loxP-IRES/neo-loxA)。次に、エレクトロポレーション法を用いて、作製したベクターをマウス ES細胞 (ES 129 Sv) に遺伝子導入した。その後、抗生物質ネオマイシンのアナログである G418 で選抜した細胞株から、ゲノムDNAを抽出しPCR およびサザンプロット法により解析することで、ROSA26 遺伝子座特異的に目的遺伝子を有する ES細胞株を得た。ES細胞の未分化維持は、アルカリフィオスマーカー (AP) 染色により評価した。

3. 実験結果及び考察

マウス ROSA26 遺伝子座は6番染色体上に存在しており、機能不明な3種類の non-coding RNA を転写している。まず、ROSA26 遺伝子のエキソン1および2間に目的遺伝子を導入するための相同組換え用ベクター (pR26/rtTA-loxP-IRES/neo-loxA) を作製した。目的遺伝子として、テトラサイクリン依存的に発現することができる転写活性化因子 (rtTA) 遺伝子および両端を loxP 配列に挟まれたレポーター遺伝子 (IRES-neo) を用いた。目的遺伝子は、rtTA 遺伝子の上流にスプライシングアクセプター (SA) を導入することで、染色体へ導入後、内在性の ROSA26 遺伝子プロモーターで発

現制御させることとした (Fig.1)。

まず、目的の相同組換用ベクターが作製できたことを、種々の制限酵素により切断することで確認した。次に、エレクトロポレーション法による ES細胞への遺伝子導入の導入条件を検討した。その結果、1200V、20ms でパルス数2回において、最も高い遺伝子導入効率が得られることがわかった (Fig. 2)。そこで、作製したプラスミドベクターをリニアライズし、マウス ES細胞へ遺伝子導入した。遺伝子導入後、G418 によるセレクションを行い、得られた細胞クローンを AP染色したところ、未分化が維持されていることが確認できた (Fig. 3)。現在、ゲノムPCR およびサザンプロットによる遺伝子導入解析および逐次遺伝子組込みを進めしており、その結果についても報告する。

(1) Kameyama et al. Biotechnol. Bioeng. 2010, in press.

*phone: 092-802-2743, FAX: 092-802-2793

e-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

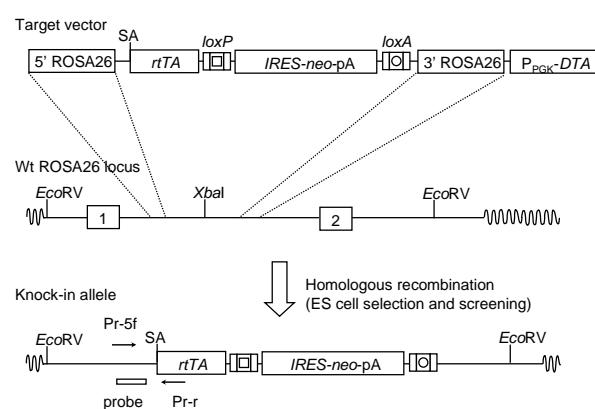


Fig.1. ROSA26 遺伝子座での相同組換えスキーム

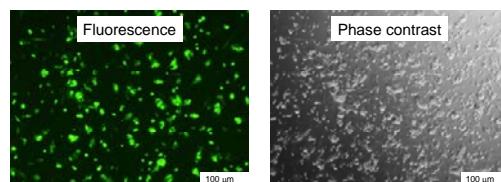


Fig.2. ES細胞への遺伝子導入条件最適化

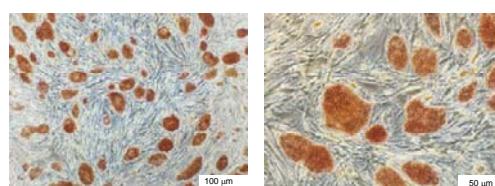


Fig.3. 遺伝子導入細胞クローンにおける AP 染色