

令和 4 年 11 月 4 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18401

研究課題名（和文）モデルラット作製に利用可能な新規人工染色体ベクターの開発

研究課題名（英文）Development of a novel rat artificial chromosome vector that can be used for human model rat.

研究代表者

香月 加奈子（KAZUKI, Kanako）

鳥取大学・染色体工学研究センター・特命助教

研究者番号：00774043

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000 円

研究成果の概要（和文）：本研究では、汎用的なラット人工染色体の開発を目的とした。まず、ラット染色体へ薬剤耐性遺伝子と赤色蛍光マーカー遺伝子を導入後、マウスA9細胞と融合させ1クローンを取得した。次に相同組み換え頻度の高いニフトリB前駆細胞へラット染色体の移入を試み、2クローンの細胞を獲得した。獲得した細胞内において、相同組み換えによるラット染色体の改変を試みた。テロメア配列による染色体切断を利用し、9クローンの細胞においてラット染色体上の遺伝子をすべて除去する事ができた。さらに、遺伝子を除去した染色体へ任意の遺伝子搭載用のloxP配列と評価用の緑色蛍光マーカー遺伝子の挿入を行い、ラット人工染色体ベクターを開発する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ラットは幅広い分野の研究に使われており、医薬品や農薬等の安全性評価試験においても重要な役割を果たしている。血液などの生体材料を得やすく、経時的かつ大量の材料を要する実験に非常に有用な実験動物である。しかし、ラットへの巨大な遺伝子、複数遺伝子の安定導入は、ゲノム編集が技術革新する現在でも依然困難である。本研究ではこの課題を解決すべく、ラットへ巨大な遺伝子や複数遺伝子を安定に導入するためのラット人工染色体(RAC)ベクターを開発した。RACベクターによるモデル動物開発は、ラットの汎用性を更に広げ、多様な分野への貢献が期待される。特に医学界、薬学界へもたらすインパクトは大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a novel and stable rat artificial chromosome vector. First, a drug resistance gene and a red fluorescent marker gene were transfected into rat chromosome. And then, as a result of fusion of the rat cells and mouse A9 cells, one clone was obtained. Next, the rat chromosome was transferred to chicken B precursor cells with high frequency of homologous recombination, and 2 clones were obtained. In the chicken B precursor cells, the rat chromosome was modified by homologous recombination. It was possible to remove all genes on the rat chromosome in 9 clones using chromosomal truncation by insertion of the telomere sequences. Furthermore, the insertion of the loxP sequence for arbitrary gene loading and the green fluorescent marker gene for evaluation to the rat chromosome in which the gene was removed.

研究分野：染色体工学

キーワード：実験動物学 染色体工学 人工染色体 遺伝子工学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでにヒト人工染色体(HAC)ベクターを用いたヒト化モデルマウスの作製に成功しており、従来のトランスジェニック技術では不可能であったマウスへの Mb 単位の遺伝子導入が可能となった。しかしながら、HAC ベクターの保持率がマウス組織・個体間でばらつきがあることが明らかとなった。この問題はモデルラット作製においても同様に起こることが想定される。近年の研究により、標的動物種と同種の染色体を利用して人工染色体ベクターを構築する事でこの課題を解決できる可能性が示唆されていた。例えば、マウス人工染色体(MAC)ベクターを導入したマウス個体の組織間において、MAC ベクターの保持率はばらつきなく高保持であった。これをふまえ、汎用性の高いラットに対し、ラット組織間でばらつきなく高い保持率を示すラット人工染色体(RAC)ベクターを構築する事で、有益なヒト型モデルラット作製技術の開発が可能になる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

汎用性の高いモデルラットの開発を目指し、ラットへの巨大な遺伝子および複数遺伝子の安定導入を可能にするラット人工染色体(Rat Artificial Chromosome: RAC)ベクターの開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、以下に示す方法でラット人工染色体(RAC)ベクターの開発を行った(図1 参照)。

(1)単ーラット染色体の単離；
まず、薬剤耐性遺伝子および赤色蛍光遺伝子を染色体ヘランダムに導入したラットES細胞と、マウスA9細胞を融合し雑種細胞を作製した。マウスA9細胞は染色体導入において効率の高いドナー細胞であり、ラット染色体を保持したA9様細胞を取得した。

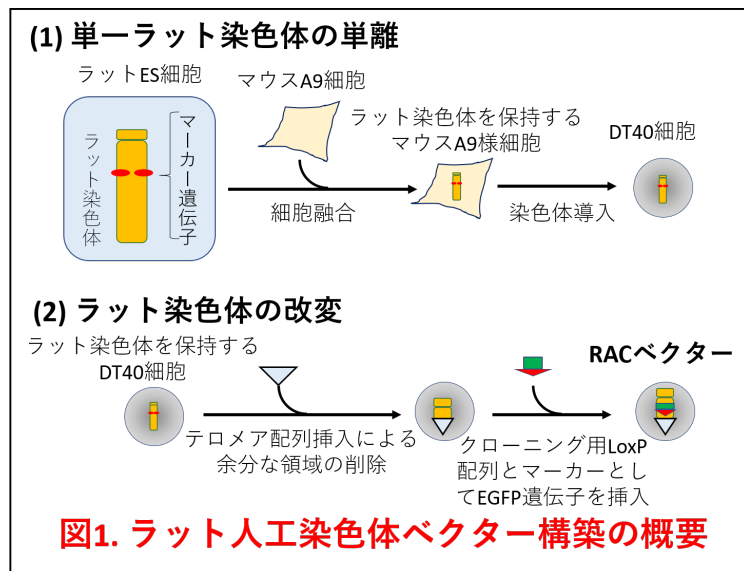
次に、mFISH(multicolor fluorescence in situ

hybridization)法を用いてラットの染色体を同定し、微小核細胞融合法(Microcell-mediated Chromosome Transfer: MMCT)により、薬剤耐性遺伝子および赤色蛍光遺伝子が挿入されたラット染色体をマウスA9様細胞からニワトリB前駆(DT40)細胞へ移入した。以後すべてのステップにおいてFISH解析、ゲノムPCRを行いラット染色体の構造が維持されていることを確認した。

(2)ラット染色体の改変；まず、ラット染色体の遺伝子領域を除去するためのベクターと、遺伝子搭載用のベクターを構築した。ラット染色体の改変は相同組換え頻度の高いニワトリB前駆(DT40)細胞内で行った。ラット染色体の長腕の任意配列に人工テロメア配列を挿入して遺伝子領域を除去し、遺伝子搭載用のloxP配列と保持率を簡便に評価するマーカーとしてEGFP遺伝子発現ユニットを相同組換えにより挿入してRACベクターを開発した。

4. 研究成果

(1)ラット染色体へ薬剤耐性遺伝子と赤色蛍光マーカー遺伝子を導入後、マウスA9細胞と融合さ



せ雑種細胞を1クローン取得した。得られた細胞の染色体をmFISH法により同定した結果、ラット4番染色体を保持していた。ラット染色体は末端動原体染色体(染色体短腕が反復配列とテロメア配列で構成されているもの)と中部動原体染色体(短腕と長腕染色体の長さがおおよそ似ている)で構成されている。今回得られた細胞が保持していたラット4番染色体は、末端動原体染色体であり、短腕部分を改変する必要がないため、開発時間が短縮できた。

次にMMCT法により、マウスA9細胞から相同組み換え頻度の高いニワトリB前駆(DT40)細胞へラット染色体の移入を試みた。その結果、ラット染色体を保持したDT40細胞を2クローン獲得した。

(2)獲得したDT40細胞内において、相同組み換えによるラット染色体の改変を試みた。テロメア配列による染色体切断を利用し、9クローンの細胞においてラット染色体上の遺伝子をすべて除去する事ができた。さらに、遺伝子を除去した染色体へ任意の遺伝子搭載用のloxP配列と評価用の緑色蛍光マーカー遺伝子の挿入を行い、ラット人工染色体ベクターを開発する。

今後、ラット人工染色体ベクターによるヒト化モデル動物を開発する事で、ラットの汎用性を更に広げ、医学、薬学をはじめ、毒性学、生理学、腫瘍学など幅広い範囲での研究に役立てたい。特に医薬品開発のスピードアップと成功率の向上に大きく貢献できるものと考えられる。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（８桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。