

審査論文提出者氏名

小西裕子

**【研究の背景と目的】**

遺伝子ターゲティングはヒト遺伝子の正確な機能解析を可能にする有用な実験手法であるが、一般にヒト細胞株では DNA 相同組換え効率が低いため、その技術的難易度は高い。本研究では、高効率の遺伝子ターゲティング法を開発するための第一歩として、ハイグロマイシン耐性遺伝子と EGFP の融合遺伝子を利用したヒト細胞株におけるターゲティング効率を簡便に定量しうるアッセイ系を作成した。

**【方法】**

まず、ハイグロマイシン耐性遺伝子と EGFP 遺伝子の 5' 末端側約 3 分の 2 との融合遺伝子 (Hyg<sup>R</sup>-5' EGFP) を擁するレポーターベクターを作成した。また、開始コドン除去した EGFP 遺伝子を 5' ホモロジーアームに持つターゲティングベクターをアデノ随伴ウイルスの骨格を用いて作成した。ヒト大腸癌細胞株 HCT116 と DLD-1 に上記レポーターベクターを安定導入し、クローンを単離した後、ターゲティングベクターを安定導入した。両ベクター間で DNA 相同組換えが起きた細胞では全長 EGFP が再構築され GFP 陽性となることを利用し、DNA 相同組換えの起きた細胞をフローサイトメトリーによって検出した。

**【結果・考察】**

両ベクターを順次細胞内に導入したところ、薬剤選択後の HCT116、DLD-1 細胞のうち GFP 陽性細胞の割合はそれぞれ 0.7 %、2.3 %であった。GFP 陽性細胞から単離したクローンに対して PCR およびサザンブロット解析を行い、両ベクター間で相同組換えが起きていることを確認した。また、上記の Hyg<sup>R</sup>-5' EGFP レポーターベクターを使用した場合、非融合型の 5' 末端側 EGFP 部分配列のみを持つレポーターベクターを使用した場合よりもレポータークローン樹立の効率がよい傾向が見られ、クローン樹立後 4 週間以上経過した後の検討でも、有意に高いレポーター機能を保持していた。

また、アデノ随伴ウイルスベクターをターゲティングベクターに用いた場合、プラスミドベクターを用いた場合の約 100 倍の効率で遺伝子ターゲティングを誘導することがこの系によって確認された。さらに、プロモータートラップ法を採用することにより遺伝子ターゲティング効率が約 40 倍上昇することも確認された。以上から、本研究のアッセイ系はヒト細胞株における内在性遺伝子ターゲティング効率の迅速かつ正確な定量に有用であることが示唆された。

今後、本アッセイ系を利用することにより、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の迅速な遺伝子ターゲティングの確立が可能となり、機能解析や薬剤スクリーニングへ向けた研究の進展が期待されるため、学位を授与するに値するものと判断した。