

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）分担研究報告書

創薬・疾患研究のための細胞・組織コレクション供給体制確立に関する研究  
(H25-創薬-指定-007)

研究分担者 竹田 潤二 大阪大学医学系研究科・教授

研究要旨

ハプロイド ES 細胞における遺伝子変異クローンの獲得法の確立に関する研究

A. 研究目的

ハプロイド ES 細胞は、ゲノムが1コピーしか存在しないので遺伝子とその機能の関係を探索するために適している。我々は、遺伝子機能を効率よく解析するためにはプロイド ES 細胞を宿主としたバンクを作製する。

B. 研究方法

ハプロイド ES 細胞は、ハプロイド状態からディプロイド状態に容易に推移する。そこで、ハプロイド細胞の割合が90%の細胞にバーコード付きの遺伝子トラップベクターを導入する。遺伝子トラップベクターが1コピー、ハプロイド ES 細胞に導入された細胞をバーコードと薬剤選択を組み合わせで獲得する。

C. 研究結果

条件検討を繰り返し、Neon によるトランスフェクション(1400V, 10msec, 3 pulses)が一番よいことが判明した。一方、遺伝子トラップベクターは、トランスポゾンシステムを利用しているが、その量はトランスポゼース発現ベクターが1マイクログラムでトランスポゾントラップベクターは0.1マイクログラムである。この条件で、2000 個以上のコロニーをピックアップし解析中である。予備的結果では、2000 コロニーのうち、約 20%が目的のクローンであることが判明している。

D. 考察

ハプロイド ES 細胞に遺伝子トラップベクターを効率よく、しかも1コピー導入できる条件が判明したので、今後は効率よく破壊された遺伝子を同定して行きたい。

E. 結論

条件検討が終了したので、今後は効率よくバンク作製を行ないたい。

F. 健康危険情報

(分担研究報告書は記入不要)

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1.) Umemura Y, Yoshida J, Wada M, Tsuchiya Y, Minami Y, Watanabe H, Kondoh G, **Takeda J**, Inokawa H, Horie K, Yagita K., An in vitro ES cell-based clock recapitulation assay model identifies CK2 $\alpha$  as an endogenous clock regulator. *PLoS One*. 28;8(6):e67241. doi: 10.1371/journal.pone.0067241., 2013.
- 2.) Yamanishi A., Yusa K., Horie K., Tokunaga M., Kusano K., Kokubu C. and **Takeda J**, Enhancement of microhomology-mediated genomic rearrangements by transient loss of mouse Bloom syndrome helicase. *Genome Research*. 23(9):1462-1473 doi:

10.1101/gr.152744.112., 2013

2. 学会発表

- 1.) 関西実験動物研究会 30 周年記念大会  
(第 120 回研究会)「変異 ES 細胞バンクは変異マウス作製に代替たりうるか?」、京都府京都市、2013
- 2.) 第 32 回日本認知症学会学術集会「ES 細胞は遺伝子改変マウス作製に必要不可欠の存在か?」長野県松本市、2013
- 3.) Conference on Transposon and Genome Engineering 2013, Gene discovery by transposons in diploid and haploid ES cells, Budapest, Hungary, 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定含む)

1. 特許取得           なし
2. 実用新案登録   なし
3. その他            なし