

論 文 内 容 要 旨

題目 4-Fragment Gateway cloning format for MosSCI-compatible vectors integrating Promoterome and 3' UTRome libraries of *Caenorhabditis elegans*

(線虫のプロモーターームと 3' UTR オームライブラリーを組み込んだ MosSCI 対応ベクターのための 4 断片 Gateway クローニングフォーマット)

著者 Toshiaki Kogame

平成 27 年 8 月 4 日発行 The Journal of Medical Investigation  
第 62 巻第 3, 4 号に掲載予定

内容要旨

線虫はこれまでゲノムワイドの研究に用いられたモデル生物であり、そのため数多くの研究により遺伝が機能単位毎に体系立ててクローニングされ、ライブラリーとして線虫コミュニティに公開されている。これらクローニングされた DNA 断片を用いたトランスジェニックの手法として、*Mos1* トランスポゾンを用いたプラスミド 1 コピー挿入法 (*Mos1*-mediated Single Copy Insertion; MosSCI 法) が発表され、今や線虫におけるトランスジェニック動物作成において必須の技術となっている。挿入される遺伝子はプラスミドと呼ばれる環状 DNA 上に組み込まれ、個体のゲノムに挿入されるのであるが、大規模実験を前提にした場合、従来の制限酵素に依存したプラスミド作成には多くの時間を費やす事になる。一方、Gateway クローニングはファージの遺伝子組み換えの研究から発展した全く異なるタイプのプラスミド作製法であるが、組み替えの際に DNA 断片に変異が起こらない事や、既存の技術では不可能であった複数の断片をデザイン通りにくみ上げられるなど、プラスミド作製の時間短縮に大いに寄与するため、前述の線虫実験には Gateway クローニングが取り入れられている。しかし、Gateway クローニングには旧型の 3 つの断片を挿入可能なフォーマットと、それに対して新型の 4 断片用のフォーマットがあり、ゲノムワイドライブラリーや MosSCI 対応のベクターはその時代背景から 3 断片用フォーマットを採用しており、複雑なプラスミド作製には適さない。

今回申請者は、Gateway クローニングの 3 断片用フォーマットであるプロモーターライブラリーと 3' UTR 用ライブラリーを取り入れて 4 断片挿入可能に拡

## 様式(8)

張出来る新規の線虫のトランスジェニック動物作成に適した新フォーマットの確立が出来るのではないかと考えた。

MosSCI 対応バックボーンベクターと、プロモーターと 3' UTR をコードするライブラリーと同じ形式のそれぞれのエントリークローンに加え、市販の Gateway クローニングの 4 断片用フォーマットから pDONR-P1-P5r と pDONR-P5-P2 のベクターを入手し、これらを用いて組み換えを行い目的のプラスミドを作成した。サンガーシーケンスを用いて、遺伝子組み換え時に遺伝子の欠損、重複、変異などが起きていないことを確認した後、同じ方法を用いて、合計 14 の MosSCI 用のプラスミドを作成に成功した。更に、新規手法で作成されたプラスミドをもちいれば、既存の MosSCI 法のプロトコールでトランスジェニック動物を作成出来る事を示した。

申請者は、線虫コミュニティーの膨大な遺産を組み込むこの新規の手法を LeGaSCI (Library-enhanced Gateway for MosSCI) と名付けた。この手法はこれまで試した全てのエントリークローンの組み合わせで問題なく組み替え反応を行っているため、ライブラリーからの全てのエントリークローンをプラスミド作成に使用可能と考えられる。最も安定した遺伝子発現が見込める新しい MosSCI 法にこの新しいプラスミド作成法は直接組み入れることが可能であり、より複雑なトランスジェニックテクニックを伴った実験系をゲノムワイドで行うことが可能になると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第1248号	氏名	小亀 敏明
審査委員	主査 坂口末廣 副査 高橋 章 副査 立花 誠		

題目 4-Fragment Gateway cloning format for MosSCI-compatible vectors integrating Promoterome and 3'UTRome libraries of *Caenorhabditis elegans*  
 (線虫のプロモテロームと 3' UTR オームライブラリーを組み込んだ MosSCI 対応ベクターのための 4 断片 Gateway クローニングフォーマット)

著者 Toshiaki Kogame  
 平成 27 年 8 月 4 日発行 The Journal of Medical Investigation  
 第 62 巻第 3, 4 号に掲載予定  
 (主任教授 福井 清)

要旨 線虫はこれまでゲノムワイドの研究に用いられたモデル生物であり、多くの遺伝子が機能単位毎にクローニングされライブラリーとして公開されている。また、線虫での遺伝子改変の手法として、*Mos1* トランスポゾンを用いたプラスミド 1 コピー挿入法 (MosSCI 法) が、線虫におけるトランスジェニック動物作製において必須の技術となっている。プラスミド作製法としては、ファージの研究から発展した配列特異的遺伝子組換えを用いたクローニング法 (Gateway クローニング) が用いられている。

申請者はこのクローニング法の 3 断片用フォーマットであるプロモーターライブラリーと 3' UTR 用ライブラリーを取り入れて 4 断片挿入可能に拡張出来る、線虫トランスジェニック動物作製に適したプラスミド作製のための新規手法の開発を行った。

プロモーターと 3' UTR をコードするエントリークローンを、それぞれのライブラリーと同じ形式で作製し、また *attP1-attP5R* と *attP5-attP2* の組換え配列をそれぞれ持つ 2 つのベクターを入手し、これらのプラスミド間で Gateway クローニング法を用いて組換えを行い、4 断片を挿入したプラスミドを作製した。このように作製されたパイロットコンストラクトが MosSCI 法に適応可

能を確認した。さらに、この新規手法を用いて、種々のプラスミド作製を行った。得られた結果は以下のとおりである。

1. 市販の Gateway クローニングの 3 断片用フォーマットに *attP1-attP5R* と *attP5-attP2* の組換え配列を有する 2 つのベクターを加えることにより 4 断片挿入できることを見出した。
2. このように作製したコンストラクトは、1 塩基の変異もなく、デザイン通りに組換えが行なわれていた。また、この新規手法が普遍的に機能することを確認するため、他のエンタリークローンをを用いて計 14 のコンストラクトを作製し、どれもがデザイン通りに作製されたのを確認した。
3. このように作製されたコンストラクトを線虫に導入し、コードされた GFP タグ付きの uracil phosphoribosyltransferase が線虫の咽頭で発現していることを蛍光顕微鏡で確認した。

以上の結果は、モデル生物の線虫を用いたゲノムワイドの研究において、翻訳融合タンパク質を発現するコンストラクトを効率よく作製する新規手法を開発したことを示すものであり、その学術的意義は大きく、学位授与に値すると判定した。