

論文の要約

報告番号	① 乙 第 1248 号	氏名	小亀 敏明
学位論文題目	4-Fragment Gateway cloning format for MosSCI-compatible vectors integrating Promoterome and 3'UTRome libraries of <i>Caenorhabditis elegans</i>		
<p>論文の要約</p> <p>※「目的・問題提起・考察・まとめ」のように論文の構成に沿ったかたちでまとめられたもので、論文の中身が分かるもの</p> <p>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、<i>Mos1</i> トランスポゾンを用いたプラスミド 1 コピー挿入法 (<i>Mos1</i>-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。</p> <p>今回我々は、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。</p> <p>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。サンガーシークエンスを用いて、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。</p> <p>我々は、線虫コミュニティ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。</p>			