

## 審査の結果の要旨

近藤 小貴

本研究は部位特異的組換え酵素 Cre 及び FLP 発現アデノウイルスベクターを用いた動物細胞での目的遺伝子連続発現制御系について検討を行い、また ES 細胞への高効率アデノウイルス感染法を確立することで本制御系の応用例を示している。

単一遺伝子、複数遺伝子の連続発現制御用細胞株を各々樹立化し検討を行った結果、FLP及びCre発現組換えアデノウイルスを用いることにより動物細胞での高効率で厳密性の高い目的遺伝子連続発現制御が可能であることを示した。しかしFLPは100%の細胞で目的の組換えを行うことが可能であったがCreのおよそ10倍量のウイルスを感染する必要があった。また、Creは細胞への毒性が報告されていたが各々の至適ウイルス量を検討することで連続ウイルス感染後も細胞毒性を回避することができた。しかしCre発現ウイルス単独感染に比べ至適ウイルス量の範囲は非常に狭かった。

OFF制御において、発現単位全体を切り出す系はcDNAのみを切り出す系に比べてOFFに要する時間が長かったが、これは切り出された環状分子からの発現が持続していたためと考えられたため、迅速なOFF制御を要求する実験においてはcDNAのみを切り出すか発現単位中に標的配列を追加するなどの改良が必要と考えられた。

ES細胞と共に培養しているfeeder細胞を極力除去し、更に浮遊系細胞への感染方法を応用することでES細胞への高効率アデノウイルス感染法を確立した。またウイルス感染後のES細胞は3回継代することにより完全に感染性のウイルスが除去できることを確認したため、遺伝子組換え生物実験の法律上重要な知見を得ることが出来たと考える。また、ES細胞でも至適ウイルス量を検討することで、未分化状態を維持したままFLP発現ウイルスによる高効率な薬剤耐性遺伝子の除去が可能であったことから本系によりコンディショナルノックアウトマウスの作出がより簡便になると考えられた。

以上、本論文はマウスES細胞を含む動物細胞におけるFLP及びCre発現アデノウイルスベクターによる目的遺伝子の高効率連続発現制御を確立した。本研究は、未知遺伝子の詳細な機能解析や発生、再生研究への応用のみならず今まで煩雑であったコンディショナルノックアウトマウスの簡便な作出法となり得ることから学位の授与に値するものと考えられる。