

平成21年 6月 3日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18770161
 研究課題名（和文） 新規システムを用いた遺伝子増幅の分子機構の解析とその応用
 研究課題名（英文） Analysis and application of molecular mechanism responsible for gene amplification by using a novel amplification system.
 研究代表者
 渡邊 孝明（WATANABE TAKAAKI）
 基礎生物学研究所・ゲノム動態研究部門・助教
 研究者番号：20421365

研究成果の概要：

遺伝子増幅現象は薬剤耐性現象、癌の悪性化、ゲノム進化等、多様な生物現象に関わり、タンパク質医薬の生産にも応用されている。しかし、その分子機構は未だ不明なままである。本研究では、代表者らが酵母を用いて初めて確立した優れた特徴をもつ人工増幅系を利用して、増幅機構の理解を深め、動物細胞に同様の系を構築することに成功した。これにより天然の増幅現象を詳しく解析しタンパク質生産を効率化する手がかりが得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	360,000	3,960,000

研究分野：分子生物学、遺伝子増幅

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：遺伝子増幅、バイオテクノロジー、ゲノム、生体機能利用、癌

1. 研究開始当初の背景

ゲノムには発生過程、疾病、環境変化等において絶えず構造変化が生じている。しかし、その原因や機構について解明されたものはごく僅かである。私はこのゲノム変動の内、遺伝子増幅現象について研究を行っている。遺伝子増幅とは生きた細胞内である遺伝子領域のコピー数が増加することを意味し、薬剤耐性現象、癌の悪性化、ゲノム進化等、多くの生物現象に関わっている。さらにこの現

象はタンパク質医薬の生産にも応用されている。しかし、遺伝子増幅の分子メカニズムは未だ不明なままであり、非効率的なタンパク質生産過程は高額なコストを抱えている。これは増幅産物の複雑な構造から機構を解析しようとする従来の方法に限界があることと、染色体改変や遺伝学的解析の容易なモデル生物での増幅系が存在しなかったことに起因している。

そこで私はデザインした構造を基に出芽酵母の染色体上に人工的に遺伝子増幅を誘

導する系を世界に先駆けて確立した。これは出芽酵母・動物細胞の両方で機能すると考えられ、高速な増幅が可能な double rolling-circle replication(DRCR)に基づいている。この DRCR を誘導するために、多くの遺伝子増幅の開始に関わると考えられている DNA 切断を利用した系(EMBO Journal, 24:190-198, 2005)および動物細胞での機能性を重視した Cre-lox 部位特異的組換え反応を利用した系(論文投稿準備中)を考案した。これらの増幅系は、天然の動物細胞の遺伝子増幅と多くの共通点を有する増幅産物を形成できる初めてのモデル系であり、また生物種が異なるものの Cre-lox 増幅系はタンパク質生産に用いられる動物細胞の系の 10~100 倍以上の頻度で高度な増幅産物を形成できた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子増幅機構を分子レベルで理解するために DRCR 増幅系の分子機構を詳細に解析することと、タンパク質生産の高効率化を目指して動物細胞に DRCR 系を応用することである。出芽酵母系の利点を生かして、遺伝学的解析と網羅的なトランスクリプトーム解析を組み合わせて迅速に分子機構の解析を行い、さらにそこから得られた情報を駆使して動物細胞へ増幅系を応用し、増幅頻度を従来の 10 倍以上に高め、現行では半年以上を要する細胞の薬剤選択期間を 1/10 程度まで短縮することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 動物細胞への DRCR 増幅系の応用

特許戦略上の理由からまず Cre-lox 組換え反応による DRCR 系の動物細胞への応用に取り組んだ。

- ① Flp-FRT 部位特異的組換え系を用いて染色体の特定部位に効率よく目的配列を挿入する系(Invitrogen 社)を応用して、CHO (Chinese hamster ovary)細胞に DHFR 遺伝子、その近傍に見出された複製開始点 DHFR Ori β と 2 組の lox 配列からなる基本構造を配置した。続いてこれに Cre 発現 vector を導入して増幅を誘導し、MTX で増幅細胞を選択した。
- ② 得られた薬剤耐性株を Fluorescence in situ hybridization (FISH)法等により解析した。
- ③ southern blot 法により増幅産物の構造解析を試みた。

(2) 酵母増幅系による分子機構解析

DNA microarray 解析により増幅の影響を受

ける遺伝子群を、遺伝学的解析により増幅に影響を与える遺伝子群を見いだすことを目指した。

- ① DNA microarray により Cre-lox 組換え反応による DRCR 系での増幅前後の遺伝子発現変化を調べた。
- ② DNA 切断を用いた DRCR 系について相同組換えに関わる *RAD59*, *RAD52* の欠失株、サイレンシングに関わる *SIR2*, *SIR3* の過剰発現株を作成し解析を行った。

(3) 天然の DRCR 増幅モデルの検証

Cre-lox-DRCR は DNA 複製と組換えの協調反応として捉えることができ、Cre-lox 組換えを一般の相同組換え反応で置き換えることができれば、癌悪性化や薬剤抵抗性獲得に伴う遺伝子増幅を説明できる可能性がある。

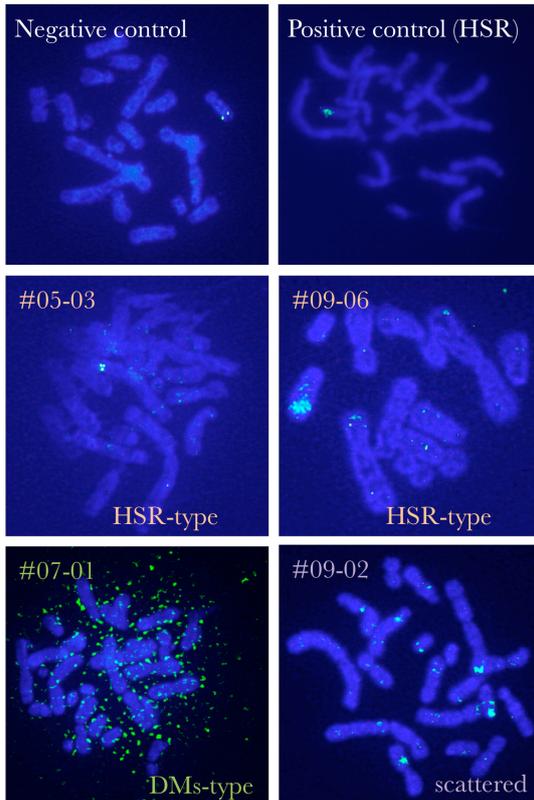
- ① 酵母及び CHO 細胞のゲノム上に DRCR 誘導のための逆位反復配列を構築することに着手した。
- ② 構築が完了した酵母系では southern blot 法により増幅産物の構造解析を行った。

4. 研究成果

(1) 動物細胞への DRCR 増幅系の応用

- ① 計画通りに CHO 細胞に Cre-lox 系を構築し MTX 耐性株を得た。本研究では DRCR 増幅が余裕をもって進行すること、短い反復配列で見られる強度の silencing を回避することを目指して、増幅のための構造を ~100kb に及ぶ BAC(bacteria 人工染色体)に構築し部位特異的に挿入した。この手法はこれまで例が無く、多様な構造を自在に配置できる柔軟性、それを位置効果の影響を受けずに評価できる正確性から今後優れたゲノム工学的手法として用い得ると思われる。
- ② 耐性株を調べた結果、増幅細胞は存在するが多数の非増幅細胞が混在し検出を困難にしていることが示唆された。そこで多数の細胞を個々に評価するため、間期 FISH 法を行った。その結果、各耐性株の集団中の少数(約 0.5-1.0%)の細胞に増幅領域とみられるシグナルが見いだされた。次にこの増幅細胞の存在を確証づけ、増幅様式を理解するため、限界希釈法により細胞純度を高めて分裂期 FISH を行った。その結果、各クローンの約半数以上の細胞に増幅が見られ、染色体上の増幅産物(HSR)、染色体外因子(DMs)、複数の染色体に点在する産物が観察された(次頁の図参照)。これらは動物細胞の遺伝子増幅でよく観察され、本来は細胞種により特定の種類が形成されることが知られている。これより本 DRCR 増幅系は多様な増幅現象に共通す

る分子機構を解く鍵となる可能性を有し、また様々な細胞種が選択的に特定の産物を形成する現象を理解するためにも有用であると思われる。



③ southern blot 法により染色体上の増幅産物の構造を解析した結果、ゲノム再編成により薬剤耐性に必要な増幅マーカー近傍のみが高度に増幅しており、Cre-lox 増幅で予想される構造の検出は困難であることが判明した。今後は今回の実験をもとに増幅選択期間を短縮しゲノム再編成の影響を最小限に留めて Cre-lox 増幅を構造から証明したい。

(2) 酵母増幅系による分子機構解析

- ① DNA microarray による解析の結果、増幅単位に含まれる遺伝子の発現量の増加が確認され、増幅領域でのゲノム不安定性に関わると思われる DNA 傷害チェックポイント・組換え修復、増幅領域の維持や凝縮に関わる核小体・染色体凝縮等に関わる遺伝子群の発現変化が見られた(表を参照)。今後、これらの情報を分子機構の理解や増幅効率の向上に役立てたい。
- ② DNA 切断を用いた DRCCR 系を $\Delta rad59$ 株、 $SIR2$ 過剰発現株に構築した場合には、DNA 切断末端が高い頻度で他の染色体と相互作用し転座を引き起こすことが見出された。 $\Delta rad52$ 株については今後解析を進める。また $SIR3$ 過剰発現は増幅可能な構造が存在する際にその増幅頻度を著しく高めることが分かった。

	gene expression			
	increased		decreased	
Cell-cycle	TEL1	2.99		
checkpoint	MEC1	2.57		
P=0.035	DDC1	2.49		
	RAD17	2.44		
	RAD53	2.30		
	BUB3	2.18		
	DPB11	2.13		
Nucleolus	RPA34	4.14	LSM4	0.47
P=0.000039	RPA135	3.45	NOP1	0.37
	RRN6	3.00		
	RPA12	2.48		
	RRN7	2.22		
Recombinational	RAD54	2.47	SAE2	0.50
repair	MEI5	2.13	RAD52	0.48
P=0.077				
Condensed	BRN1	2.60		
chromosome				
P=0.53				

(3) 天然の DRCCR 増幅モデルの検証

- ① 酵母では増幅系の構築が完了し、CHO 細胞については、長い逆位反復配列を配置するための 2 種類の部位特異的組換え系を用いた系の作動確認を行っている。今後その反復配列を DRCCR 誘導可能な構造とするゲノム工学的手法についても確認し、薬剤選択による増幅細胞の検出を試みる。
- ② 酵母系の southern blot の結果、予想通り染色体上の増幅産物・染色体外因子を検出することに成功した。現在より詳細な解析を進めている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

- ① 渡邊孝明、堀内嵩
誘導可能な新規遺伝子増幅系の開発
日本遺伝学会第 80 回大会
2008 年 9 月 4 日
名古屋大学工学部 IB 電子情報館
- ② 渡邊孝明、堀内嵩
Cre-lox 系を利用した出芽酵母による
新規遺伝子増幅系の開発
BMB2007 (第 30 回日本分子生物学会年会
・第 80 回日本生化学会大会合同大会)
2007 年 12 月 13 日
パシフィコ横浜

- ③ 渡邊孝明、堀内嵩
新しい高速遺伝子増幅系
-タンパク質医薬低コスト化を目指して
イノベーション・ジャパン 2006
新技術説明会
2006年9月14日
東京 国際フォーラム

[産業財産権]

○取得状況 (計1件)

名称：遺伝子増幅法
発明者：堀内嵩、渡邊孝明
権利者：自然科学研究機構
種類：特許権
番号：W0/2007/060764
取得年月日：2007年5月31日
国内外の別：国外

[その他]

ホームページ等
<http://www.nibb.ac.jp/gene2/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 孝明 (WATANABE TAKAAKI)
基礎生物学研究所
・ゲノム動態研究部門・助教
研究者番号：20421365

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者