

機関番号： 15101
 研究種目： 基盤研究（B）
 研究期間： 2008 ～ 2010
 課題番号： 20310120
 研究課題名（和文） ゲノムコピー数多型がもたらす表現型の解析を可能にする人工染色体ベクター操作技術
 研究課題名（英文） Generation of human artificial vector to allow the reproduction of gene copy number variation
 研究代表者
 井上 敏昭 (INOUE TOSHIAKI)
 鳥取大学・医学部・准教授
 研究者番号： 80305573

研究成果の概要（和文）：PhiC31 組み替え系は高効率部位特異的組換え系である。本研究では、遺伝子搭載サイズに上限のない人工染色体ベクターの利点を生かし、このベクター上に一度の組み換え反応で多数コピーの外来遺伝子の搭載を可能する系の構築に成功した。この系は、さまざまな形質差の原因の一つであるゲノムコピー数多型を個体および細胞レベルで再現できる系として有意義である。

研究成果の概要（英文）：PhiC31-based recombination allows the multiple introduction of transgenes when the recipient sites (attB sites) are available. We sought to apply this system to the human artificial chromosome (HAC) vector, which can carry the huge size of transgene. We successfully generated the HAC vector carrying multiple copies of attB sites (attB-HAC) in CHO cells. It was confirmed that transgenes tagged with the donor site (attP site) can be loaded onto the attB sites on the attB-HAC, in independent manner of PhiC31 integrase. Intriguingly, Southern blot analyses implicated that multiple copies of transgenes can be loaded onto the attB-HAC in one recombination-reaction in CHO cells. The present study suggests the efficacy of attB-HAC as a tool for reproduction of gene copy number variation in animal models and cell models.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2010 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
年度			
年度			
総計	13,200,000	3,960,000	17,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ゲノムコピー数多型、人工染色体

1. 研究開始当初の背景

疾患感受性、薬剤感受性などヒト形質差をもたらす現象として、1 塩基遺伝子多型 (SNP) に加え、新たに DNA コピー数多型 (CNV) が発見された。CNV はヒトゲノム上の 12%にも

及ぶ領域を覆う多型である。しかし動物個体・細胞レベルで CNV を再現し、CNV が形質差を直接もたらしているのかどうか検証できる系はなく、研究進展の障害となっている。

2. 研究の目的

本研究ではこの問題解決のため、複数遺伝子の部位特異的挿入が可能な PhiC31 組み換え系と、我々が開発した搭載可能な DNA の長さの制限がないベクターである人工染色体ベクター操作技術とを融合させ、特定ゲノムを任意のコピー数で細胞に導入し個体・細胞レベルで CNV を再現する方法論を開発し、ポストゲノム研究を推進する。

3. 研究の方法

PhiC31 組み換え系の適用が可能な人工染色体ベクターが出発資材であり、この作出が最重要課題である。まず外来遺伝子のレシピエントサイトとなる attB 配列を多数配したプラスミドを構築し、これを Cre-LoxP 系で CHO 細胞内に保持された人工染色体ベクター (HAC) 上に搭載する (attB-HAC)。つづいて、この attB 配列に対して、ドナーサイトである attP 配列を持つ外来遺伝子が PhiC31 インテグラーゼ依存的に搭載できるかどうかを検討する。さらに、一度の組み換え反応で複数コピーの外来遺伝子が搭載できるかどうかを検討することで、CNV 再現のための実験系となりうるのかどうか評価する。

4. 研究成果

34 コピーの attB 配列を持つ attB-HAC を CHO 細胞内で構築することに成功した。外来遺伝子として attP 配列を持つ Neo カセットを用いて PhiC31 インテグラーゼとともにトランスフェクションしたところ、G418 耐性の細胞の 60%以上が目的とする attB サイト上に挿入されており、attB-HAC は外来遺伝子のドナーベクターとなることが分かった。さらにサザンブロット解析の結果、一度の組み換え反応で多くの G418 耐性細胞で attB-HAC 上に複数コピー (3 コピー以上) 搭載できていることを示す知見が得られた。今後、大きなサイズの外来遺伝子で同じように一度の組み換え反応で attB-HAC 上に複数コピーを搭載できるかどうか明らかにする必要があるが、本研究で開発した attB-HAC は CNV 再現を可能にすると新たな実験システムとして期待できる。

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)

[雑誌論文] (計 10 件)

① Kojima H, Kunimoto H, Inoue T, Nakajima K. The STAT3-IGFBP5 axis is critical for IL-6/gp130-induced premature senescence in human fibroblasts. *Cell Cycle*, 2012, in press. 査読有

② Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, Kosaka N, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Kobayashi E, Yamada T, Kawai A, Inoue T, Ito H, Oshimura M, Ochiya T. MicroRNA-143 Regulates Human Osteosarcoma Metastasis by Regulating Matrix Metalloprotease-13 Expression. *Mol. Ther.* 19: 1123-1130. 2011, 査読有

③ Qi DL, Ohhira T, Fujisaki C, Inoue T, Ohta T, Osaki M, Ohshiro E, Seko T, Aoki S, Oshimura M, Kugoh H. Identification of PITX1 as a TERT suppressor gene located on human chromosome 5. *Mol Cell Biol.* 31:1624-1636, 2011, 査読有

④ Li Y, Matsumori H, Nakayama Y, Osaki M, Kojima H, Kurimasa A, Ito H, Mori S, Katoh M, Oshimura M, Inoue T. SIRT2 downregulation in HeLa can induce p53 accumulation via p38 MAPK activation-dependent p300 decrease, eventually leading to apoptosis. *Genes Cells.* 16:34-45, 2011, 査読有

⑤ Ting Y, Morikawa K, Kurata Y, Li P, Bahrudin Udin, Miake J, Yamamoto Y, Murata M, Inoue T, Nakai A, Shiota G, Higaki K, Ninomiya H, Shirayoshi, Y, Hisatome I. Transcriptional activation of SAP97 by HSF-1 stabilizes Kvl.5 in HL-1 cells. *Br J Pharmacol*, 162:1832-1842, 2011, 査読有

⑥ Osaki M, Inaba A, Nishikawa K, Sugimoto Y, Shomori K, Inoue T, Oshimura M, Ito H. Cysteine-rich protein 61 (CYR61) suppresses cell invasion via down-regulation of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression in a human gastric carcinoma cell line, MKN-45. *Mol Med Rep.* 3:711-715. 2010, 査読有

⑦ Inoue T, Nakayama Y, Yamada H, Li YC, Yamaguchi S, Osaki M, Kurimasa A, Hiratsuka M, Katoh M, Oshimura M. SIRT2 downregulation confers resistance to microtubule inhibitors by prolonging chronic mitotic arrest. *Cell Cycle.* 8:1279-1291, 2009, 査読有

⑧ Kai Y, Wang CC, Kishigami S, Kazuki Y, Abe S, Takiguchi M, Shirayoshi Y, Inoue T, Ito H, Wakayama T, Oshimura M. Enhanced apoptosis during early neuronal differentiation in mouse ES cells with autosomal imbalance. Cell Res. 19:247-258, 2009, 査読有

⑨ Hirota Y, Kurata Y, Kato M, Notsu T, Koshida S, Inoue T, Kawata Y, Miake J, Bahrudin U, Li P, Hoshikawa Y, Yamamoto Y, Igawa O, Shirayoshi Y, Nakai A, Ninomiya H, Higaki K, Hiraoka M, Hisatome I. Functional stabilization of Kvl.5 protein by Hsp70 in mammalian cell lines. Biochem Biophys Res Commun. 372:469-474, 2008, 査読有

⑩ Yamada H, Li YC, Nishikawa M, Oshimura M, Inoue T. Introduction of a CD40L genomic fragment via a human artificial chromosome vector permits cell-type-specific gene expression and induces immunoglobulin secretion. J Hum Genet. 53:447-453, 2008, 査読有

〔学会発表〕(計9件)

① 荻野由加利、松森はるか、押村光雄、中山祐二、井上敏昭、複数の遺伝子搭載が可能な人工染色体ベクターの構築、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日(ポスター発表)および15日(口頭発表)、パシフィコ横浜(横浜市)

② 李艶沢、末松知久、中山祐二、押村光雄、井上敏昭、がん治療の新たな標的分子としてのSIRT2、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月15日(口頭発表)および16日(ポスター発表)、パシフィコ横浜(横浜市)

③ 松森はるか、加藤基伸、中山祐二、押村光雄、井上敏昭、複数の遺伝子搭載が可能な人工染色体ベクターの構築、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月25日(ただし東日本大震災の影響で学会中止、誌上発表のみ)、京都会館(京都市)

④ 高橋悠、加藤基伸、香月康宏、香月加奈子、梶谷尚世、滝口正人、中山祐二、中村貴史、井上敏昭、押村光雄、麻疹ウイルスエンベロープを利用した微小核細胞融合法による染色体導入、日本農芸化学会2011年度大会、2011年3月25日(ただし東日本大震災

の影響で学会中止、誌上発表のみ)、京都会館(京都市)

⑤ Motonobu Katoh, Yasuhiro Kazuki, Haruka Takahashi, Kanako Kazuki, Naoyo Kajitani, Masato Takiguchi, Yuji Nakayama, Takafumi Nakamura, Toshiaki Inoue, Mitsuo Oshimura, Chromosome transfer via microcell fusion utilizing fusogenic envelope proteins of Measles virus, 第33回日本分子生物学会第83回日本生化学会合同大会2010年12月10日、神戸ポートピアアイランド(神戸市)

⑥ 李艶沢、井上敏昭、押村光雄、SIRT2発現低下によるp53依存性細胞死誘導とその機序、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月23日、大阪国際会議場(大阪市)

⑦ 久郷裕之、Dong-Lai Qi、大平嵩人、太田力、井上敏昭、押村光雄、ヒト5番染色体上に存在する新規テロメレース抑制遺伝子の同定、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月22日、大阪国際会議場(大阪市)

⑧ 李艶沢、押村光雄、井上敏昭、SIRT2発現低下による微小管阻害剤耐性獲得とその分子機構、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月3日、パシフィコ横浜(横浜市)

⑨ 中山祐二、井上敏昭、押村光雄、難波栄二、人工染色体システムを用いたトリプレットリピート解析系の構築、第53回日本人類遺伝学会、2008年9月27日、パシフィコ横浜(横浜市)

〔図書〕(計1件)

則兼聡子、井上敏昭、押村光雄、羊土社、実験医学別冊「実験医学別冊培養細胞実験ハンドブック」細胞融合法、2009、215-218

〔その他〕
ホームページ等

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/genome/309/> (鳥取大学医学部生命科学科ゲノム医学分野)

<http://www.med.tottori-u.ac.jp/chromosome/> (鳥取大学染色体工学研究センター)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井上 敏昭 (INOUE TOSHIAKI)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：80305573

(2)研究分担者

加藤 基伸 (KATOH MOTONOBU)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：00273904

大林 徹也 (OHBAYASHI TETSUYA)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・准教

授

研究者番号：80348804

難波 英二 (NANBA EIJI)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・教授

研究者番号：40237631

武谷 浩之 (TAKEYA HIROYUKI)

崇城大学・生物生命学部・教授

研究者番号：60222015

(3)連携研究者

()

研究者番号：