

## 科学研究費助成事業 (科学研究費補助金) 研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21770194

研究課題名 (和文) 遺伝子増幅現象の意義と分子機構の実験的検証

研究課題名 (英文) Experimental validation of the significance of and molecular mechanism for gene amplification phenomena

研究代表者

渡邊 孝明 (WATANABE TAKAAKI)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：20421365

研究成果の概要 (和文)：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っているが、その分子機構は未だ不明なままである。本研究は代表者らが酵母を用いて初めて確立した増幅系から得られた知見を基に癌遺伝子の増幅機構を解く手がかりを得ることに成功した。また遺伝子進化と増幅の関係をj知るツールとして増幅に伴う変異導入を高感度に検出できるマーカー遺伝子の構築に取り組んだ。

研究成果の概要 (英文)：Gene amplification is involved in a variety of biological phenomena, including malignant progression, drug resistance, and gene evolution. However, details of the molecular mechanisms remain to be determined. Based on our findings of gene amplification system in yeast, we have obtained a clue to elucidate the mechanism for oncogene amplification. We also work on the construction of marker gene that sensitively detect the introduction of mutations involved in gene amplification.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：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。本研究の対象となる遺伝子増幅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、遺伝子増幅の分子機構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 J, 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 (NAR, 39:e106, 2011) 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系の 100~1000 倍の頻度で高度な増幅産物を形成した。さらに最近 Cre-lox 増幅系は動物細胞 (Chinese hamster ovary cell) においても機能することが確認できた (NAR, 39:e106, 2011)。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子増幅の分子機構を理解するために DRCR 増幅をより天然に近い状況で動物細胞に誘導すること、増幅の可否を決める要素を知るため多様な細胞に DRCR 誘導を試みることで、増幅と進化の関係を探るための DRCR 系を構築することである。

## 3. 研究の方法

(1) 動物細胞での天然の遺伝子増幅現象における DRCR 増幅の役割

癌や薬剤耐性に関わる増幅機構をより理解するため、これまでの研究より BFB cycle により生じる 4 つ以上の長い単位からなる inverted repeat (IR) から DRCR が誘導されると考え、この実証を試みた。私はこの構造を double IR と名付け、BAC (バクテリア人工染色体)、2 種類の部位特異的組換え系 (Flp-FRT・Cre-lox)、ゲノムを特異的に切断しヘアピン構造を形成する系 (tos-TelN, Mol Microbiol, 33:895, 1999) を利用して構築した。以上の構造に、増幅により薬剤 MTX への耐性を与える dihydrofolate reductase 遺伝子を配置し、細胞を MTX で選択して増幅の成否について解析した。

(2) 遺伝子増幅と遺伝子進化の関係

出芽酵母の適応変異の解析に用いられたフレームシフトにより活性が低下した *lys2* 遺伝子を利用する予定であったが、これでは塩基置換を検出できないため、より優れ

た変異検出マーカーの確立を試みた。つまり薬剤に依存してタンパク質分解を制御できるタグ配列を汎用のマーカー遺伝子に接続し、タグ配列への変異導入により分解を免れて生育可能となる系の確立に取り組んだ。

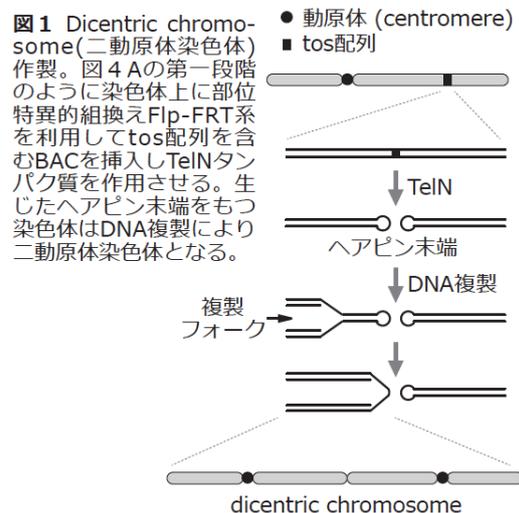
(3) 増幅を起こす細胞種と起こさない細胞種の相違

当初多様な細胞に DRCR 誘導を試みる予定であったが、動物細胞の培養には長期間を要するため残された研究期間での完遂は難しいと考え、出芽酵母 double IR 系での重点的な遺伝学的解析を行った。具体的には、チェックポイント機構に関わる CHK1、RAD9、DDC1、MEC1、相同組換えに関わる RAD51、RAD52、MRE11、複製フォークの進行阻害に関わる SGS1、RAD27、RAD18 等の遺伝子変異株を作製し遺伝子増幅頻度への影響を調べた。

## 4. 研究成果

(1) 動物細胞での天然の遺伝子増幅現象における DRCR 増幅の役割

まず初めに *tos*-TelN 系が機能するかを検証した。大腸菌に感染する N15 と呼ばれる溶原化ファージの感染・溶原化により生産されるタンパク質 TelN は、*tos* と呼ばれる DNA 配列を認識して DNA の 2 重らせんを切断しその端がヘアピン状に折り返された後、切断面を繋ぎ直す能力を有している。CHO 細胞ゲノム上にこの *tos* 配列を含む BAC を挿入



し TelN 発現ベクターを導入することで、ヘアピン状末端を形成し DNA 複製によって二動原体染色体を形成できるかを調べた (図1)。分裂期 FISH 法により *tos* 配列を含む構造を蛍光標識した結果、通常の染色体と比べ *tos*-TelN 系を働かせた場合に特徴的な染色体像が現れた (図2)。これらは *tos* 配列の領域を中心に動原体を含む領域が倍加した対

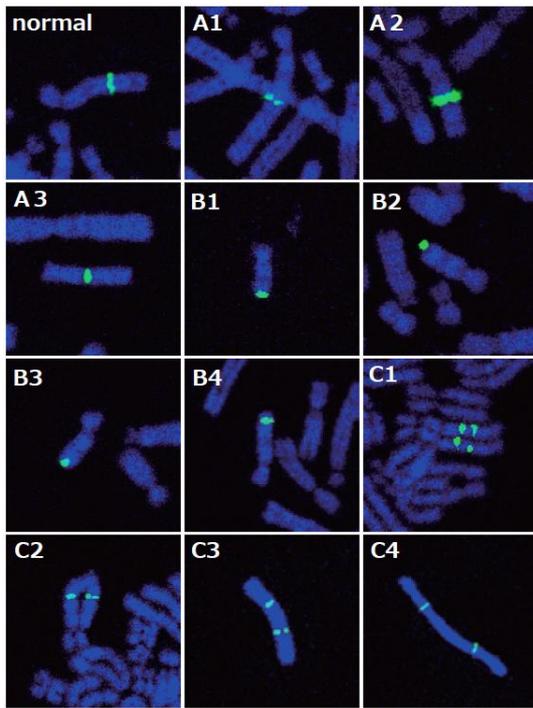


図2 Dicentric chromosome(二動原体染色体)の形成。分裂期FISH法により挿入した構造が緑に蛍光標識され、染色体がDAPIで青に染色されている。通常の染色体と比べるとtos-TelN系を働かせた場合(A-C)には特徴的な像が現れる。A1~A3はtos-TelN系により動原体を含む領域が倍加し対象性のある染色体像の中央に蛍光シグナルが見られる。B1~B4はtos-TelN系が作用した直後の像で末端の蛍光シグナルの部分はヘアピン構造をとっていると思われる。C1~C4は二動原体染色体が形成されたことで増幅プロセスが開始していると思われる。以上は薬剤選択等を行っていないにもかかわらず、全体の数%の分裂期像に見られる。従って自然の増幅現象と比較して極めて高い頻度で二動原体染色体が生じていると言える。

象構造をとる二動原体染色体(A1~A3)、TelNが作用した直後のヘアピン状末端をもつ中間体(B1~B4)、二動原体染色体形成により増幅を開始した二動原体染色体(C1~C4)であると思われる。以上は薬剤等により二動原体染色体を積極的に選択していないにもかかわらず、全体の1~5%程度の分裂期像に見られた。従って自然の増幅現象より相当高い頻度で二動原体染色体が生じていると考えられた。

次に tos 配列、増幅選択マーカーDHFR 遺伝子、複製開始領域、増幅のリアルタイム検出のための TetR-EYFP 遺伝子、タンパク質増産を指標に増幅を検出するためのインスレーター配列に挟まれた G-CSF 遺伝子等を CHO 細胞染色体に BAC を介して挿入した。細胞は転写が活発なゲノム領域に予め FRT 配列が挿入された CHO 細胞を利用し、第一段階では Flp-FRT 組換えによりハイグロマイシン耐性遺伝子を活性化し BAC に配置した GFP 遺伝子の発現を指標に単離した。第二段階では変異型 lox 配列を用い挿入反応が優先的に起こるよう工夫し、組換えによるブラストサイジン耐性の活性化と mCherry 赤

色蛍光タンパク質を利用して単離した。

しかし、その染色体構造を分裂期 FISH 法により解析したところ、予想される BAC 挿入染色体に加え、二動原体染色体と思われる対称性のある像にシグナルが得られた(図3)。

TelN 発現誘導前のこの時点では二動原体染色体は形成されないはずであるが、BAC 挿入により形成

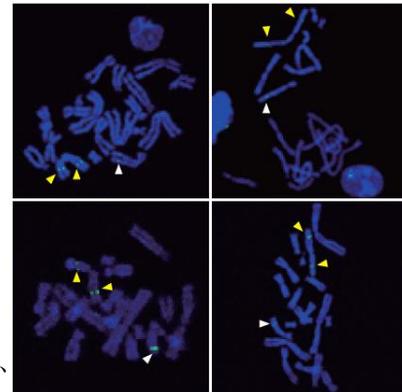


図3 BAC挿入細胞の染色体。分裂期FISH法により挿入したBACが緑に蛍光標識され、染色体がDAPIで青に染色されている。予想されたBAC挿入位置(白の矢頭)に加え、2カ所にシグナル(黄の矢頭)が見られる。染色体像やシグナル位置に対称性があり、TelN誘導前にも関係考えられる。わずら dicentric chromosome形成が起非組換え細きたと考えられる。

胞を確実に除くため 30 $\mu$ g/mL のブラストサイジンで選択を行ったが、初期の選択以降はその濃度を半減する等して染色体再編成の出現を避けるべきであった。今回の結果は増幅初期に形成される構造がさらなる増幅を促す高いポテンシャルをもつこと、想定よりも高い頻度でゲノム不安定化を引き起こす可能性があること、を示唆した初めての例である。本来このような染色体再編成を起こしていない細胞に対し MTX による増幅選択を開始すべきであるが、予想される BAC 挿入位置に加え二動原体染色体の少なくとも一方にも tos 配列が含まれる可能性が高く、TelN 発現誘導によりさらなる遺伝子増幅が期待できることから、この細胞を基に増幅選択を試みた。

上記細胞に TelN 発現ベクターを導入し、二日後に 0、200、350、500nM で MTX 選択を開始した。350、500nM では生存細胞が少なく増殖を継続できなかったが、200nM では選択可能であった。TelN 発現誘導により生存細胞が僅かに増加する傾向は見られたが明確な差異は無かった。これは blasticidin 選択時点で DHFR 遺伝子を含む BAC 挿入領域が最大 3 コピーまで増幅したため(図3)、MTX 耐性のバックグラウンドが上昇してしまったためと考えられる。200nM 選択下では増殖速度が低いため、細胞集団を集めて 2~3 週間を目安に改めて 100、200、300nM で継代培養を行い馴化させた。MTX 濃度、

TelN 発現誘導の有無が異なる計 6 点の細胞集団と、MTX 選択前の細胞の培養上清を回収し、市販の ELISA キットを用いて G-CSF 生産性を評価した。その結果、TelN 発現誘導により生産性が向上すること、200nM 以上で生産性が増すことが分かった(図 4)。MTX 選択前に既に最大 3 コピーまで増幅したため、MTX 選択による生産性の増加幅は大きくないが、インスレーターの利用によりいずれの細胞群でも安定したタンパク質発現が実現していた。

以上のように double IR 構造の作成に染色体再構成を伴ったものの、一定期間を要する増幅選択まで実施することができた。

### (2) 遺伝子増幅と遺伝子進化の関係

まず FKBP12 タンパク質変異体を膜透過性リガンド Shield1 により安定化し可逆的な調節ができる系に取り組んだが、出芽酵母では Shield1 非存在

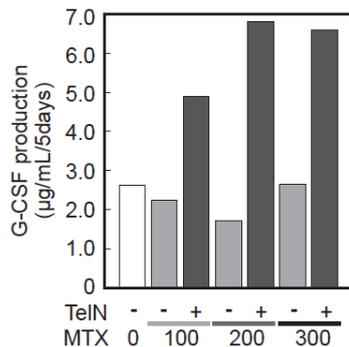


図 4 G-CSF 生産性。TelN 発現誘導により生産性が向上している。

下でも効率良く分解されないことが判明し、平成 23 年 9 月に他のグループからも同様の報告がなされた(Bioorg Med Chem Lett. 2011, 21:4965)。これは変異導入以前に多数の細胞が高いバックグラウンドとして生存できることを意味し致命的な問題である。そこで我々はお出芽酵母での実績がある Auxin 依存的分解ドメイン(AID)の利用に着手した(図 5)。現在 kanamycin、hygromycin の耐性遺伝子に AID を融合させて解析し、我々の出芽酵母株では一般的な 50µM よりも高濃度

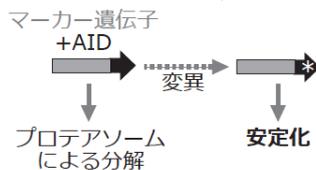


図 5 変異検出系。マーカー遺伝子(hphNT等)のC末側に不安定化ドメイン(Auxin-induced degraon, AID)を融合させる。AIDへの変異により構造が変化し分解効率が低下したコピーをもつ細胞が選択される。

の Auxin が分解に必要であることが判明しつつある。

### (3) 増幅を起こす細胞種と起こさない細胞種の相違

出芽酵母系での重点的な遺伝学的解析の結果、まず増幅頻度が *rad18*、*rad27*、*mus81* で各々約 10、55、80 倍に増加し、これらの

分子が double IR 構造で停滞する複製フォークの維持や再生に重要な働きをしていることが示唆された(表 1)。さらに複製フォーク進行を把握するための二次元電気泳動を行ったところ、double IR 構造でのフォーク進行阻害が検出できた(図 6)。

表 1

	Induction	Leu <sup>+</sup> -Trp <sup>+</sup> colonies
wt	1.00	4.3±2.0 x10 <sup>-6</sup>
(FRFR)		
FR	0.15	
<u>Checkpoint</u>		
chk1	2.93	
rad9	<b>0.39</b>	
ddc1	<b>0.74</b>	
<u>Recombination</u>		
rad52	<b>0.45</b>	
rad51	1.11	
<u>Post replicational repair</u>		
rad18	<b>9.98</b>	
<u>Structure-specific endonuclease</u>		
slx1	1.52	
rad27	<b>54.80</b>	
mus81	<b>79.60</b>	

一方、*rad9*、*ddc1* では 39、74%に増幅頻度が低下した。本来、染色体異常を防ぐ役目をするチェックポイント機構が増幅活性化に必要である結果は以外であるが、これらがフォーク進行阻害を感知することが増幅を引き起こす誤った修復に繋がっていると考えられる。また *rad52* で 45%に増幅頻度が低下したことは、増幅に組換え反応が関与することを示唆している(表 1)。最後に MEC1、SGS1、MRE11 の欠失株は得られず、AID 系での条件的破壊株を構築した。増幅への影響

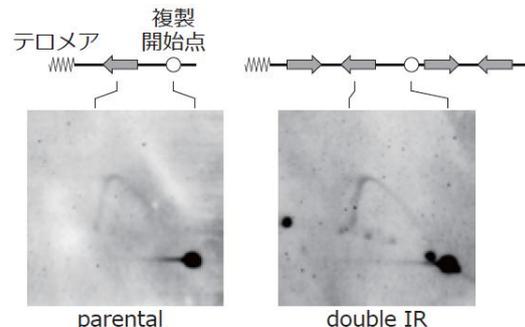


図 6 二次元ゲル電気泳動法。double IR構造を有する染色体ではrepeat上で複製フォークの進行が遅れていることが分かる。

は未確認であるが、遺伝子増幅との強い関わりが疑われているこれらの分子は double IR 構造の維持に不可欠であるのかもしれない。

#### 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 2 件)

- ① 岡本治子、渡邊孝明、堀内嵩  
Double rolling circle replication (DRCR) is recombinogenic.  
Genes to Cells、査読有、2011  
16: 503-513
- ② 渡邊孝明、田辺秀之、堀内嵩  
Gene amplification system based on double rolling-circle replication as a model for oncogene-type amplification.  
Nucleic Acid Res、査読有、2011  
39: e106  
DOI: 10.1093/nar/gkr442

[学会発表] (計 9 件)

- ① 渡邊孝明  
CHO 細胞で高速・確実なタンパク質生産を可能にするシステム  
新技術説明会  
2012 年 2 月 10 日  
JST 東京別館 (東京都)
- ② 渡邊孝明、堀内嵩  
ダブルローリングサークル複製を中心とする包括的な遺伝子増幅モデル  
日本遺伝学会第 83 回大会 (招待講演)  
2011 年 9 月 20 日  
京都大学農学部 (京都府)
- ③ 渡邊孝明、堀内嵩  
A comprehensive model of gene amplification centering on double rolling-circle replication (DRCR)  
FASEB Summer Research Conferences  
2011 年 7 月 26 日  
Steamboat Grand Resort (USA)
- ④ 渡邊孝明、堀内嵩  
ダブルローリングサークル複製を中心とする包括的な遺伝子増幅モデル  
第 33 回日本分子生物学会年会  
2010 年 12 月 7 日  
ポートピアホテル (兵庫県)
- ⑤ 渡邊孝明、堀内嵩

A comprehensive model of gene amplification centering on double rolling-circle replication (DRCR)

The 7th 3R symposium

2010 年 10 月 28 日

富山国際会議場 (富山県)

- ⑥ 渡邊孝明、堀内嵩  
A comprehensive model of gene amplification centering on double rolling-circle replication (DRCR)  
The 57th NIBB Conference  
2010 年 10 月 15 日  
岡崎コンファレンスセンター (愛知県)
- ⑦ 渡邊孝明、堀内嵩  
ダブルローリングサークル複製を中心とする包括的な遺伝子増幅モデル  
日本遺伝学会第 82 回大会  
2010 年 9 月 20 日  
北海道大学高等教育機能開発総合センター (北海道)
- ⑧ 渡邊孝明、堀内嵩  
Development of novel inducible gene amplification systems  
第 32 回日本分子生物学会年会  
2009 年 12 月 10 日  
パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑨ 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 81 回大会  
2009 年 9 月 17 日  
信州大学理学部 (長野県)

#### 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

・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：20421365