

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658290

研究課題名(和文)動物細胞内での遺伝子増幅速度を支配する分子機構と、その活用

研究課題名(英文)Control of gene amplification-rate in animal cells, and its application

研究代表者

清水 典明(Shimizu, Noriaki)

広島大学・生物圏科学研究科・教授

研究者番号：10216096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳動物複製開始に関与するIR/MAR配列が、Mtxにより誘導される遺伝子増幅を、どのように加速するかを検討した。その結果、IR/MAR配列を持つと、初期に染色体外で多量体化して一定期間維持されるために、プラスミドの比較的大きな反復配列となり、それが染色体上の多数の場所に挿入されることが明確となった。その結果、染色体の脆弱部位に近接する確率が高くなり、BFBサイクルにより伸長して長大なHSRを形成する確率が高くなることが示唆された。本研究により、発がん過程での遺伝子増幅現象を明確に出来たとともに、卓越した蛋白質医薬品の製造方法に関して、その機構を明確に出来た。

研究成果の概要(英文)：We examined how the IR/MAR sequence, which promote replication initiation, accelerate the gene amplification that was stimulated by the Mtx treatment. Consequently, we uncovered that the IR/MAR sequence enable the initial extrachromosomal maintenance and multiplication of the introduced sequence, which allowed its integration to the multiple chromosomal loci that might be proximity to the chromosomal fragile sites. Thus, the target sequence might efficiently be amplified at the chromosomal context by the BFB cycle, after the Mtx treatments. Our study uncovered the gene amplification mechanism during cancer development. Furthermore, it provided the mechanistic base for the efficient production of protein pharmaceuticals.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：遺伝子増幅 組換え蛋白質生産 染色体外遺伝因子 細胞がん化 細胞工学 哺乳動物複製開始

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子増幅はヒトがんの悪性化に深く関与する。高度に増幅した遺伝子は分裂期染色体標本にみられる2種類の構造のいずれかを形成する。その1つは染色体外のDMであり、もう一つは染色体中のHSRである。がん細胞における遺伝子増幅の機構に関して、代表的なものには breakage fusion bridge(BFB)サイクルモデルがある。このモデルは、染色体上に DNA2 本鎖切断が生じる事により開始される。この染色体が複製された後、姉妹染色分体間で末端が結合すると、2 動原体性染色分体が形成され、これが分裂後期に架橋構造(anaphase bridge)を形成する。そのような架橋構造は両極から作用する紡錘系の張力によって不均等に引きちぎられ、2 つの娘細胞の片方で遺伝子数が増加する。引きちぎられた染色体は次の間期で複製された後、姉妹染色分体間の末端結合によって再び2 動原体性染色分体を形成する。このようなサイクルを繰り返すことで、anaphase bridge 切断点の近くの遺伝子が増幅していく。その際、姉妹染色分体間の末端結合の結果として逆位反復配列が形成される。一方で、エピソームモデルも遺伝子増幅機構を説明するうえで影響力の強いモデルのひとつである。このモデルでは、まず、染色体から数 10 から数 100 kbp の環状 DNA(エピソーム)が切り出される。このエピソームが複製開始点をもつ場合、それは自律的に複製され、互いに組換えを起こして巨大化することで、顕微鏡でも検出できる DM となる。その環状 DNA が再び染色体へと組み込まれると、それが HSR となるか、HSR 形成のきっかけとなる。

以前我々は、哺乳動物複製開始領域 (initiation region ; IR)と核マトリックス結合領域(Matrix attachment region ; MAR)の両方をもつプラスミドをヒトがん細胞へ導入すると、それはきわめて効率よく DM や

HSR のような遺伝子増幅構造を形成することを見出した。このことは、この実験系がエピソームモデルを培養細胞内で効率よく再現する系であることを示唆している。そのため、我々は、IR/MAR プラスミドが増幅構造を形成する機構について、ヒト COLO 320 細胞を用いて解析を行ってきた。以下にその結果の要点を列記する。

- (1) IR/MAR プラスミドは、染色体外で、直列反復へと多量体化する。
  - (2) プラスミドが増幅するには、IR からの複製開始が必要である。
  - (3) 染色体外での多量体化が進行して、顕微鏡で見えるようになると DM になる。
  - (4) 染色体腕に組み込まれた IR/MAR プラスミドの反復配列は、プラスミド反復配列部分で進行する BFB サイクルによって伸長する。
- 以上をまとめてモデルが得られた。このモデルは、ヒト大腸がん COLO 320 細胞中で多数の DM や、染色体内の均一な HSR を形成することをよく説明する。一方、ハムスター CHO 細胞内では、DM が形成されることは極めてまれであり、COLO 320 細胞とは全く異なる ladder type や fine ladder type の HSR が形成された。このような構造は、生体内のヒト細胞で、がん化にともなって形成される HSR と類似していた。

従来、人工的に遺伝子増幅構造を形成させる方法としてよく用いられた実験系は、*DHFR* (dihydrofolate reductase) 遺伝子をもつプラスミドをメソトレキセート (methotrexate; Mtx) 処理により CHO 細胞内で増幅させる Dhfr/Mtx 法である。具体的には、*DHFR* 遺伝子を組み込んだプラスミドを *DHFR* 欠損細胞である CHO DG44 細胞に導入した後、*DHFR* 酵素蛋白質の阻害剤である Mtx を、段階的に濃度を高めて処理することにより、導入したプラスミドを増幅させる。この方法で形成される HSR は fine ladder 状の HSR である。この実験系は、長年多くの基礎研究者

により遺伝子増幅機構のモデル実験系として利用されてきた。Dhfr/Mtx 法で用いる Mtx は、細胞内のヌクレオチド濃度を減少し、2本鎖切断が生じやすくなる。特に切断されやすい染色体脆弱部位 (chromosomal fragile site) が切断され、BFB サイクルが起動することにより遺伝子増幅が進行することが提唱されている。この Dhfr/Mtx 法は有用蛋白質の生産系として、現在広く工業的に利用されている。しかし、この系は適用できる細胞が CHO 細胞にほぼ限定されることや、高度に遺伝子増幅した細胞を取得するために長い時間と多大な労力を必要とすること、および、増幅した構造が不安定であることが大きな欠点である。

我々は以前、IR/MAR 法と Dhfr/Mtx 法を融合した方法を検討した。すなわち、IR/MAR 配列と Dhfr 遺伝子を両方持つプラスミドを構築し、CHO DG44 細胞へ導入した。このような細胞を、ヌクレオチド不含培地で Mtx 処理を行った。このような方法を、IR/MAR-Dhfr 融合法と呼ぶ。その結果、IR/MAR 配列が存在することにより、従来の DHFR/Mtx 法よりも遺伝子増幅が早く効率よく進行し、組み換えタンパク質を高いレベルで安定して発現し続ける細胞を効率よく取得することができた。しかし、なぜ、IR/MAR 配列が DHFR/Mtx 遺伝子増幅法にこのような影響を及ぼすのかは、不明であった。

## 2. 研究の目的

IR/MAR 配列が、どのような機構で、従来からの Dhfr/Mtx 遺伝子増幅法を加速させ、安定で高レベルな発現細胞を効率よく形成するのか、を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

3種類のプラスミド (p BN.AR1、pSFV-V-dhfr、p BN.AR1-dhfr) を用いた。1番目と2番目のプラスミドはIR/MAR配列を持ち、2番目と3番目のプラスミドはDhfr遺伝子

発現カセットを持つ。IR配列としては、チャイニーズハムスターDHFR遺伝子由来の4.6 kbpのIRを用いた。このDHFR IRは内にMAR活性を示す配列が存在する。さらに、強力なMAR活性を持つAR1配列 (Ig k イントロン由来) を用いた。全てのプラスミドは、プラストサイジン耐性遺伝子を持つ。細胞株としては、dhfr遺伝子座を完全に欠失したCHO DG44細胞株を用いた。形質転換は、Lipofectamine 2000 Reagent (インビトロジェン、11668-027) を用いて、リポフェクション法により行った。FISH (fluorescence *in situ* hybridization) 法によるプラスミド配列の検出は、定法に従って行った。Inverted repeatの検出は、PCRを用い、同方向の配列をプライマーとして用いた。

## 4. 研究成果

IR/MAR 配列を持つプラスミドは、高い形質転換効率を示し、初期に効率よく多量体化した。 pSFV-V-dhfr、p BN.AR1、p BN.AR1-dhfr をそれぞれ CHO DG44 細胞へ導入した後、プラストサイジン (BS) で選択した。遺伝子導入から 10 日後に検討すると、IR/MAR 配列を持つプラスミドを導入した細胞は、IR/MAR 配列を持たないプラスミドを導入した細胞と比べて、大きなコロニーを多く形成していた。さらに、BS 選択によって取得した安定な形質転換体について、FISH によってプラスミド配列を検出した。その結果、IR/MAR 配列を持つプラスミドを導入した細胞は、持たないプラスミドに比べて、プラスミド配列からなる比較的大きな遺伝子増幅構造が形成されていた。この結果から、IR/MAR 配列を持つプラスミドは、細胞内に導入後、染色体外で多量体化した後に、染色体腕に組み込まれることが示唆された。

IR/MAR-Dhfr 融合法は Dhfr/Mtx 単独法よりも、長い HSR を早期に形成した。 pSFV-V-dhfr、p BN.AR1-dhfr をそれぞれ CHO DG44 細胞に導入し、BS 処理によって安定な形質転換体を取得した。次に各細胞を、ヌク

レオチドを含まない培地で培養した後、メソトレキセート(Mtx)を5 nM 加えて培養した。それぞれのステップで分裂期染色体標本を調製し、FISH によってプラスミド配列を検出した。その結果、IR/MAR 配列を用いた細胞では、長いHSRを持つ細胞が約30%みられたが、IR/MAR 配列を持たないプラスミドを用いた細胞では、そのような長いHSRを持つ細胞はほとんどみられなかった。

染色体内のプラスミド配列は、Mtx 処理により、BFB サイクルで伸長した。Mtx 存在下で培養している細胞では、分裂後期でプラスミド配列が Anaphase bridge を形成している細胞が観察された。このような場合、プラスミド配列は片方の娘細胞に偏って分配されている場合が多くみられた。このことは、HSR の伸長が BFB サイクルで生じていることを示唆している。一方、形成された HSR は、多くの場合染色体の末端に位置していた。これは BFB cycle によって形成されたことと一致する。しかし、染色体の中央に位置している HSR もあった。そのような場合、HSR は染色体の長軸方向で対称な構造をしていた。これは、BFB cycle によって形成された 2 動原体染色体が、不分離によって安定化したことを示唆していた。さらに、千切れた anaphase bridge の末端に、リン酸化 H2AX (gamma H2AX) が検出された。以上のことから、DG44 細胞で形成される fine ladder HSR は BFB cycle によって伸長していることが示唆された。

IR/MAR 配列により、微小核の形成頻度が低下した。IR/MAR-Dhfr 融合法での微小核の形成頻度は、プラスミド配列を含む微小核についても含まない微小核についても、Dhfr/Mtx 法の場合よりも低いという結果が得られた。微小核には、動原体を欠失した染色分体や、anaphase bridge の千切れた断片が、取り込まれることが知られていることから、IR/MAR 配列により増幅構造が安定化され

ることが示唆された。

IR/MAR 配列を持つプラスミドは、1 つの細胞内で多数の HSR を形成した。IR/MAR 配列を用いない Dhfr/Mtx 単独法では 1 細胞中に 1 個の HSR のみが形成されている細胞が多くみられたのに対し、IR/MAR 配列を用いる融合法では 1 細胞中に多数の HSR が形成されている細胞が頻繁に見られた。

クローンレベルで、Mtx 処理による HSR の変化が理解できた。BS で選択した安定形質転換体から、細胞をクローン化し、Mtx 5 nM 存在下で培養して安定に増殖する細胞を得た。そのような Mtx 処理前後の細胞について、それぞれ FISH によりプラスミド配列の増幅状態を検討し、HSR の変化について以下のような 4 つのパターンに分類した。さらに、抽出した DNA について、PCR によりプラスミド配列内の Inverted repeat を検出した。その結果をまとめる。

Pattern 1; Mtx 処理の前後で、プラスミドシグナルが見えなかったパターン。増幅しなくとも染色体に組み込まれた場所が発現に適していたため、Mtx 5 nM に適応できたと考えられる。Inverted repeat は Mtx 前後で、どちらも多数のバンドが検出された。にもかかわらず増幅は見られなかったことから、プラスミド配列内での切断・再結合は、遺伝子増幅に寄与しないことが示唆された。

Pattern 2; Mtx 処理により HSR が短くなったパターン。Mtx 処理によって 2 本鎖切断が誘導されて HSR の一部が切り出されたことを示唆している。そのことに対応し Mtx 処理により Inverted repeat の数が減少した。さらに、fine ladder HSR で構成された Ring chromosome が、Mtx 5 nM で培養している細胞中に検出された。切り出されても発現が高く Mtx 5nM の環境に適応できたと考えられる。

Pattern 3; Mtx 処理により HSR の伸長が見られたパターン。このようなクローンは、遺伝

子増幅が生じ、Mtx 5 nM の環境に適応したと考えられる。Mtx 処理の前後で、Inverted repeat の数にほとんど変化は無かった。このことは、プラスミド配列での切断・再結合は HSR の伸長に寄与せず、プラスミド配列外での切断・再結合が、fine ladder HSR の伸長に寄与していることを示唆している。

Pattern 4; Mtx 処理により死んだパターン。発現がもともと高くなく、さらなる遺伝子増幅ができなかったため、Mtx 5 nM の環境に適応できなかったと考えられる。

IR/MAR(-)の細胞; Mtx 処理の前後で、全てのクローンで増幅しておらず、プラスミドシグナルが見えなかった。一方、Mtx 処理の前後で inverted repeat が多数検出された。このことは、IR/MAR 配列がなくてプラスミドのコピー数がかくわずかではかなくとも、Mtx 処理と無関係に、プラスミド配列内で 2 本鎖切断が生じることを示唆している。

プラスミド増幅配列のクロマチン修飾状況の検討 BS で選択したステップにある細胞は H3K9 トリメチル化がアセチル化よりも高かった。一方、Mtx5 nM で増殖している細胞は、H3K9 アセチル化がトリメチル化よりも高かった。一方、Pattern 3 のクローン化細胞は、Mtx 処理前に、H3K9 アセチル化がトリメチル化よりも高かった。一方、Pattern 4 のクローン化細胞は、H3K9 トリメチル化がアセチル化よりも高かった。このことから、後者はプラスミド配列付近のクロマチンがヘテロクロマチン化しているのに対し、Pattern 3 のクローンでは、クロマチンが脱凝縮していたことが、その後の Mtx 処理に対する応答の違いとなったと考えられる。

( 考察と意義 )

IR/MAR 配列を持つプラスミドを導入すると、初期に多量体化して薬剤耐性遺伝子が増幅するので、遺伝子導入後の細胞の増殖速度が早くなり、形質転換効率が大きく上

昇すると考えられた。そのような多量体化プラスミドが、染色体の多数の場所に組み込まれるため、chromosomal fragile site 近傍に組み込まれる確率が高まり、BFB cycle が効率よく進行すると考えられる。

本研究では、CHO DG44 細胞で Dhfr/Mtx 法により誘導される遺伝子増幅が、どのように IR/MAR 配列の存在によって加速するのかについて詳細に検討することで、より広汎な細胞とより広汎なタイプの遺伝子増幅について、その機構を明らかにすることができた。このような成果により、がん化過程で起きる複雑な遺伝子増幅についての理解を深めることができた。さらには、組み換え蛋白質生産に有用な IR/MAR-Dhfr 融合法の遺伝子増幅機構を理解することに貢献できた。

## 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 3 件 )

### 1. Naoya Okada, Noriaki Shimizu (2013)

Dissection of the Beta-Globin

Replication-Initiation Region Reveals Specific Requirements for Replicator Elements during Gene Amplification. *PLoS ONE* (IF=4.351) **査読有**、 Volume 8, Issue 10, e77350 (全10ページ, Figure 8).

<http://www.plosone.org/article/metrics/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0077350>

### 2. Yoshio Araki, Tetsuro Hamafuji, Chiemi

Noguchi and Noriaki Shimizu (2012) Efficient Recombinant Production in Mammalian Cells Using a Novel IR/MAR Gene Amplification Method. *PLoS ONE* (IF=4.351) **査読有**、 Volume 7, Issue 7, e41787 (全 10 ページ).

10.1371/journal.pone.0041787

<http://www.plosone.org/article/metrics/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0041787>

### 3. Chiemi Noguchi, Yoshio Araki, Daisuke Miki,

Noriaki Shimizu (2012) Fusion of the

Dhfr/Mtx and IR/MAR gene amplification methods produces a rapid and efficient method for stable recombinant protein production.

**PLoS ONE** (IF=4.351) **査読有**, Volume 7, Issue 12, e52990 (全 14 ページ, Figure 9, Suppl. Fig. 1). 10.1371/journal.pone.0052990  
<http://www.plosone.org/article/metrics/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0052990>

さらに、2 年間の本研究の成果そのものは、現在、以下の論文を英文査読誌に投稿中。  
Shun-suke Tanaka, Sho-hei Mitsuda and Noriaki Shimizu “How a replication origin and matrix attachment region accelerate gene amplification under replication stress in mammalian cells.”

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 田中 俊介, 満田 祥平, 清水 典明  
「複製ストレスにより誘導される遺伝子数増減の分子機構と、IR/MAR 配列の影響」第 36 回日本分子生物学会、2013 年 12 月 3 日～6 日、神戸ポートアイランド
2. 清水典明 「動物細胞内で組み換え遺伝子を高度に増幅させる IR/MAR (アイ・アール/マー) 法と、蛋白質生産」2013 年 9 月 11 日；第 86 回日本生化学会大会 Bio-industry Seminar パシフィコ横浜
3. 清水典明 「IR/MAR 遺伝子増幅法と、蛋白質生産への応用」**日本動物細胞工学会 2013 年大会** シンポジウム 4 「日本発、世界を目指すバイオ医薬生産」オーガナイザー：平島 親 (中外製薬工業株式会社) 大政健史 (徳島大学) 清水典明 (広島大学) 2013 年 7 月 18-19 日、福井
4. Noriaki Shimizu, Yoshio Araki, Chiemi Noguchi and Tetsuro Hamafuji “Recombinant protein production in CHO cells using the IR/MAR-amplification based technology” The 25<sup>th</sup> Annual and International Meeting of the Japanese

Association for Animal Cell Technology (JAACCT 2012), Nov.30.2012 ) Nagoya Congress Center, Nagoya, Japan

5. 田中俊介、野口千笑、荒木義雄、清水典明「IR/MAR-Dhfr 融合遺伝子増幅法・・・安定な高発現細胞を早く生じる新規方法による、遺伝子増幅の機構」12 月 14 日 (金) (**第 35 回日本分子生物学会**) 2012 年 12 月 11 日～14 日、マリンメッセ福岡

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
清水 典明 (SHIMIZU, Noriaki)  
広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授  
研究者番号：10216096

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：