

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21790289

研究課題名（和文）

遺伝子ノックインによる体細胞内在性 mRNP 複合体動態の解明

研究課題名（英文）

Analysis of mRNP complex using gene knockin in mammalian cells

研究代表者

山下暁朗 (YAMASHITA AKIO)

横浜市立大学・医学研究科・講師

研究者番号：20405020

研究成果の概要（和文）：

VEGF, IL6, IL5, IFNbeta, IFNgamma 遺伝子のノックイン用領域（終止コドン周辺2-2.5 kbp）をクローニングした。さらに、IFNbeta 遺伝子についてノックインベクターを構築した。続いて、数十 kbp の遺伝子の導入が可能な FRT site を1コピー持つ HeLa TetOff, HeLaTetOnAdvanced, HCT116, N2A, MDCKII, BEAS-2B TetOff FRT 細胞を作成した。また、BoxB 配列を含む・含まない IL-6, IFNbeta, IL28B, IL-5 遺伝子全体を pTRETight-FRT ベクターに導入した。

研究成果の概要（英文）：

I cloned genomic regions of VEGF, IL6, IL5, IFNbeta and IFNgamma. I constructed IFNbeta gene knockin vector for the insertion of BoxB sequence at downstream of termination codon. Next, I generate cell lines (HeLa TetOff, HeLaTetOnAdvanced, HCT116, BEAS-2B TetOff) which containing a single FRT recombination site. I also constructed the pTRE-Tight-FRT IL-6, IFNbeta, IL28B, and IL-5 full length genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：細胞医化学

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子の発現過程において、転写とその制御の解析が先行して進んできた歴史がある。近年になり、遺伝子発現の転写後調節の重要性が再認識され、その基本装置の解明が始まっている。遺伝子発現における転写後調節として、mRNA 選択的スプライシング、mRNA 輸送、mRNA 分解、mRNA 翻訳、タンパク質分解などの多段階の複雑な制御機構が存在している。

本研究では mRNA レベルでの転写後調節に焦点を当てる。mRNA レベルでの転写後調節は、mRNA 上の特異配列に結合する RNA 結合タンパク質によって制御されている。転写された mRNA は RNA 結合タンパク質と mRNA-タンパク質 (mRNP) 複合体を形成し、転写産物固有の転写後調節を受ける。動物細胞において、85% 以上のサイトカインや原癌遺伝子 mRNA には mRNA を不安定化すると同時に翻訳を制御す

るシス配列が存在しており、遺伝子発現の転写後制御がその機能発現において重要な機能を果たす。近年の研究により、シス配列に結合するタンパク質の同定や、リン酸化制御が報告されつつあるが不明な点が多い。また、動物細胞内から mRNP を精製する方法は確立されていなかった。これまでにを行った研究により、動物細胞内からの高精度 mRNP 複合体精製システムを新たに構築することに成功した。具体的には、mRNP 精製のためのタグである BoxB 配列を挿入した beta-globin 遺伝子由来の mRNA (翻訳型 mRNA) とその 5' 非翻訳領域に翻訳開始を阻害する強固なステムループを形成する配列を挿入した遺伝子由来の mRNA (非翻訳型 mRNA) を mRNP 精製アフィニティータグを用いて精製する。mRNP 精製アフィニティータグとして、BoxB 結合ペプチドであるバクテリオファージ N タンパク質 (N ペプチド) に Streptavidin binding peptide (SBP) と Flag epitope tag を融合した物を使用する。

## 2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究により樹立した動物細胞内からの mRNA-protein(mRNP) 複合体の分離精製技術と新たに導入する体細胞での遺伝子ノックインシステムを組み合わせることで、細胞内在性サイトカイン mRNA の転写後動態を生化学的、細胞生物学的に解析し明らかとすることを目的とする。また mRNA 精製タグのノックインと同時にルシフェラーゼもしくは GFP をサイトカイン遺伝子のタンパク質コード領域に導入し、mRNA の翻訳効率および翻訳産物の安定性をモニターするための細胞株を樹立する。この細胞株は、全く新しい概念のサイトカインの発現制御薬の高効率スクリーニングシステムともなることも期待される。

## 3. 研究の方法

a) アデノ随伴ウイルスベクターを用いた体細胞での遺伝子ノックインによる BoxB 配列および Luciferase/GFP の挿入システムの確立

サイトカイン遺伝子にノックインによりサイトカイン mRNA の 3' UTR に 4 つの BoxB 配列からなる mRNA アフィニティータグを挿入する。また、同時にサイトカインタンパク質コード領域の C 末端に Luciferase/GFP を挿入した細胞株を樹立する。この、新規内在性 mRNP 複合体精製システムの開発により、サイトカイン遺伝子の mRNA スプライシング、mRNA の分解、翻訳制御輸送などのすべての転写後制御システムの解析が飛躍的に進むことが期待される。ヒト体細胞での相同生組み替えによるノックインはマウス ES 細胞に比べ非常に効率が悪い。最近 Bunz 博士らによ

り樹立されたアデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子ノックアウト/ノックインシステムでは多くの遺伝子で 0.3%程度(プラスミドベースの 25 倍)のターゲティング効率が得られる。このシステムのもう一つの利点は、ターゲティングベクター作成に 2.1~2.8kbp の遺伝子領域しか必要としないことである。これにより、ターゲティングベクター作成のためのゲノム DNA クローニングが非常に簡易である。

b) レンチウイルスベクターを用いたゲノム中に 1 コピーの Flp recombination target (FRT) site を持つ培養細胞樹立システムの確立

アデノ随伴ウイルスを用いた遺伝子ノックインが期待通りに進まない可能性を考慮し、BoxB および Luciferase/GFP で標識した発現誘導型プロモーターにより転写されるサイトカイン遺伝子を細胞株を樹立する。また、遺伝子ノックインがうまくいった場合にはネイティブプロモーターと外来性プロモーターによる転写と mRNP 形成の因果関係を解析することが可能となる。遺伝子によって 10kbp 以上の物がありプロモーター、薬剤耐性遺伝子発現領域を含むとプラスミドベクターサイズが 15kbp を超す。このサイズのベクターを動物細胞へ単に導入してもプラスミドのランダムインテグレーションによる安定発現株を得ることは難しい。そのため、数十 kbp の遺伝子の導入が可能 FRT site を 1 コピー持つ培養細胞を作成する。

市販の FRT site 導入用ベクターである pFRT-LacZeo2 による基礎実験により、1 コピーの FRT site を持つ培養細胞を樹立するのに多くの労力が必要とされることが分かっている。本研究では、新たにレンチウイルスベクターシステムを用いた FRT site 導入ウイルスベクターを作成する。これまでに pLenti-LacZeo2 を作成し、HeLa 細胞をモデル細胞として樹立を試みたが、Zeocin に対する耐性が非常に高くクローンの樹立に成功していない。本研究ではこれにさらに改良を加え、EGFP-BSD (プラストシジン耐性遺伝子) 融合タンパク質による FRT site 導入ウイルスベクターを作成し、1 コピーの FRT site を持つ培養細胞の簡易樹立システムを確立する。

## 4. 研究成果

a) アデノ随伴ウイルスベクターを用いた体細胞での遺伝子ノックインによる BoxB 配列および Luciferase/GFP の挿入システムの確立

モデルシステムとして使用する VEGF, IL6, IL5, IFNbeta, IFNgamma, IL28B 遺伝子のノックイン用領域 (終止コドン周辺 2-2.5 kbp) を HCT116 細胞より取得した genomic

DNA をテンプレートに PCR により増幅、クローニングした。さらに、IFNbeta 遺伝子のノックイン領域（終止コドン周辺 2-2.5 kbp）をと BoxB 配列を用い、ノックインベクターを構築した。

様々なサイトカインの遺伝子発現制御を解析するためには、解析に適切な培養細胞系を用いることが必須である。IFNbeta, IFNgamma, IL28B はウイルス感染に応答するサイトカインである。様々な呼吸器ウイルスに高感受性な正常細胞として、MRC-5 細胞（ヒト胎児胚由来）の不活化をおこなった。不活化を誘導する為、pLenti\_TERT, pLenti\_HPVI6-E7, pLenti\_sh-p16, pLenti\_TERT\_sh-p16 を新たに作成した。TERT と E7 もしくは TERT と sh-p16 を発現するレンチウイルスベクターを組み合わせ、MRC-5 細胞に感染させることで、MRC-5 細胞の不活化に成功した。さらに、ヒト気道上皮細胞、ヒト尿管上皮細胞、ヒト前立腺細胞について不活化を進めている。

b) レンチウイルスベクターを用いたゲノム中に 1 コピーの Flp recombination target (FRT) site を持つ培養細胞樹立システムの確立

新規に作成した pLenti\_FRT-GFP-BSD レンチウイルスベクターを用い、数十 kbp の遺伝子の導入が可能な FRT site 持つ HeLa TetOff, HeLaTetOnAdvanced, HCT116, MDCKII, BASE-2B-TetOff, N2A 細胞を作成した。BASE-2B-TetOff, N2A 以外の細胞については、サザンブロットにより、1 コピーの FRT を持つことを確認した。解析した全てのクローンで複数コピーの FRT を有する物はなく、レンチウイルスにより、高頻度に 1 コピーの FRT 細胞を樹立するシステムを確立できた。また、BoxB 配列を含む・含まない IL-6, IFNbeta, IL28B, IL-5 遺伝子全体を pTRETight-FRT ベクターに導入した。現在、BEAS-2B-TetOff 細胞を用いた安定発現株の構築を進めている。

#### 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)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Arias-Palomo E, Yamashita A (co-first author), Fernández IS, Núñez-Ramírez R, Bamba Y, Izumi N, Ohno S, Llorca S: Nonsense-Mediated mRNA Decay SMG-1 kinase is regulated by large-scale conformational changes controlled by SMG-8. *Genes and Development*. *Genes Dev*. 25(2):153-64. 2011.

2. Usuki F, Yamashita A, Fujimura M: Methylmercury-induced relative selenium deficiency causes oxidative stress through its post-transcriptional effect. *J Biol Chem*. 286(8):6641-9. 2011.

3. Fernández SI, Yamashita A (co-first author), Arias-Palomo E, Bamba Y, Bartolomé RA, Canales MA, Teixidó J, Ohno S, Llorca O: Characterization of SMG-9, an essential component of the nonsense-mediated mRNA decay SMG1C complex. *Nucleic acid research*. 39(1):347-58. 2011.

4. Cong W, Hirose T, Harita Y, Yamashita A, Mizuno K, Hirano H, Ohno S: ASPP2 regulates epithelial cell polarity through the PAR complex. *Curr Biol*. 20(15):1408-1414. 2010.

5. Izumi N, Yamashita A (corresponding author), Iwamatsu A, Kurata R, Nakamura H, Saari B, Hirano H, Anderson P, Ohno S: AAA+ family ATPases, RUVBL1 and RUVBL2, coordinate PIKK family and play critical roles in Nonsense-mediated mRNA decay. *Science signaling (Science 姉妹誌)*. (3):ra27. 2010.

6. Yamashita A (corresponding author), Ohno S. Analysis of Nonsense-mediated mRNA decay by the monitoring of mRNA half lives in mammalian cells. *CSH protocol*. (2):pdb.prot5386. 2010.

7. Yamashita A (corresponding author), Izumi N, Kashima I, Ohnishi T, Saari B, Katsuhata Y, Muramatsu R, Morita T, Iwamatsu A, Kurata R, Hachiya T, Hirano H, Anderson P, Ohno S. SMG-8 and SMG-9, two novel subunits of the SMG-1 complex, regulate remodeling of the mRNA surveillance complex during nonsense-mediated mRNA decay. *Genes and Development*. 23(9): 1091-1105. 2009.

[学会発表] (計 9 件)

1. 山下暁朗. mRNA 監視機構制御因子 SMG-1 の構造と生理機能. BMB2010. 2010, 12.

2. 安部開人, 山下暁朗, 馬場しほ, 岡田一平, 石上友章, 梁明秀. IL-6 遺伝子発現における mRNA 転写後制御機構の解析. BMB2010. 2010, 12

3. 馬場しほ、山下暁朗、大野茂男. 微量 RNA からの次世代シーケンサーライブラリー構築法の改善. BMB2010. 2010, 12

4. 山下暁朗. mRNA 監視機構と疾患. 日本環境変異原学会第 39 回大会 (招待講演). 2010, 11.

5. Yamashita A, Izumi N, Ohno S. HSP90 regulates PIKK family together with the conserved protein complexes. Cold spring harbor laboratory meeting 2010 translational control. 2010, 9

6. 山下暁朗、泉奈津子、岩松明彦、平野久、大野茂男. RUVBL1/RUVBL2 複合体による NMD 制御. 第 1 2 回日本 RNA 学会年会. 第 1 2 回日本 RNA 学会年会. 2010, 7

7. 泉奈津子、山下暁朗、倉田理恵、平野久、大野茂男. RNA ポリメラーゼサブユニット RPB5 は NMD に関与する. 第 1 2 回日本 RNA 学会年会. 第 1 2 回日本 RNA 学会年会. 2010, 7

8. Yamashita A, Izumi N, Okada-Katsuhata Y, Kutsuzawa K, Muramatsu R, Sarri B, Iwamatsu A, Hirano H, Hirahata F, Anderson P, Ohno S. THE REMODELING OF MRNA SURVEILLANCE COMPLEX DURING NONSENSE-MEDIATED MRNA DECA. Cold spring harbor laboratory meeting 2009 mRNA processing, New York, 2009, 8.

9. 山下暁朗、泉奈津子、勝畑有紀子、沓沢慧、番場由美、大野茂男. 異常終止コード認識複合体とその制御メカニズム. 第 1 1 回日本 RNA 学会年会. 2009, 7

[図書] (計 3 件)

1. 山下暁朗、臼杵扶佐子. mRNA surveillance の分子機構と生命現象、疾患との関わり. 実験医学. 28(10): 1606-1613. 2010.

2. 臼杵扶佐子、山下暁朗. NMD と疾患. 細胞工学. 29(2):155-160. 2009

3. 山下暁朗、臼杵扶佐子. mRNA 品質管理システムと疾患. タンパク質核酸酵素. 54(16):2219-2225. 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~saikin/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山下暁朗 (YAMASHITA AKIO)  
横浜市立大学・医学部・講師  
研究者番号: 20405020

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号: