

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12608

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14573

研究課題名(和文) 転移因子LINEを利用した新規動物細胞タンパク質発現系の開発

研究課題名(英文) Development of a new protein expression system using LINE transposable elements

研究代表者

梶川 正樹 (Kajikawa, masaki)

東京工業大学・生命理工学院・講師

研究者番号：90361766

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：転移因子LINEは宿主生物のゲノム上に新たなコピーを生み出す能力を持つ。本研究では、この転移因子LINEの性質を利用して、培養細胞内での任意タンパク質大量発現系の構築を目指した。その結果、LINEの転移系を用いて、目的タンパク質をコードする遺伝子を培養細胞のゲノム中に大量に組み込むことに成功した。また、大量に組み込まれた遺伝子から、目的タンパク質が発現されることを確認した。

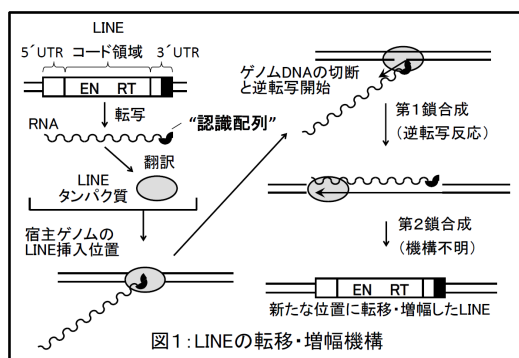
研究成果の概要(英文)：Transposable elements, called LINE, can mobilize and amplify their own copy in the host genomic DNA. Using this LINE transposable elements, we developed a novel protein expression system in cultured cells. This system will be used as a new protein expression system that can express a large amount of a certain protein you demand.

研究分野：分子生物学

キーワード：転移因子

1. 研究開始当初の背景

動物細胞タンパク質発現系は、分子生物学ならびにタンパク質医薬品分野で非常に有用なツールである。様々な手法が存在するが、より優れた発現系の開発は重要である。例えば、ある抗体タンパク質（医薬品）の動物細胞での発現量を数倍にできるだけで、より簡便・安価に医薬品タンパク質の生産が行えるだろう。本研究では、我々が先行研究で得た転移因子 LINE の転移・増幅機構に関する知見を基に、簡便で汎用性の高い、高収量新規動物細胞タンパク質発現系の構築を目指す。転移因子 LINE は、ヒトゲノム中におよそ 90 万コピー存在する（ゲノムの 20%）。また、ヒトのみならず、ほぼすべての真核生物のゲノム DNA 中に存在する。LINE の、多量のコピー数、幅広い生物種に存在、という特徴は、遺伝子導入ベクターとしての大きな可能性を示す。転移因子 LINE の転移・増幅機構を図 1 に示す。LINE は、エンドヌクレアーゼ（EN）と逆転写酵素（RT）をコードしており、EN が LINE 新規挿入位置の宿主ゲノム DNA を切断し、RT が自身 RNA の逆転写反応により DNA コピーを合成することで増幅する（図 1）。我々は、ゼブラフィッシュ LINE を研究材料に、LINE RNA の 3' 末端約 60 塩基（図 1、“認識配列”）が LINE 増幅に必須であることを発見した（Cell, v111, p433, 2002）。また、この認識配列を付加した緑色蛍光タンパク質（GFP）RNA を LINE RNA とともにゼブラフィッシュ受精卵に導入すると、GFP RNA の DNA コピー（GFP 遺伝子）がゼブラフィッシュのゲノム DNA 中に挿入されることを発見した。驚くべきことに、LINE RNA 上の認識配列を欠失させると、LINE 自身の増幅は起こらないが GFP 遺伝子の増幅が大幅に亢進し、細胞当たり 1 万コピーもの GFP 遺伝子がゼブラフィッシュゲノムに挿入される。



2. 研究の目的

(1) 本研究では、上記の知見を動物培養細胞に応用し、簡便で汎用性の高い、高収量新規動物細胞タンパク質発現系の開発を目指す。モデルケースとして、LINE RNA（認識配列欠失）と GFP RNA（認識配列付加）を動物細胞にトランスフェクションし、細胞ゲノムに多量なコピー数の GFP 遺伝子を挿

入し、高収量の GFP タンパク質生産を目指す。タンパク質複合体発現のモデルケースとして、複数種の蛍光タンパク質遺伝子 RNA に認識配列を付加し、LINE RNA と共に動物細胞にトランスフェクションし、複数種の蛍光タンパク質を同時に発現する動物細胞の作出を行う。

(2) 転移因子 LINE をツールとして利用する研究はほとんど行われていない。LINE の高い転移・増幅能を利用すれば、簡便で汎用性の高い、高収量タンパク質発現系やタンパク質複合体発現系、遺伝子導入系、順遺伝学用の変異原ツール等、様々な新規ツールの開発が可能であろう。

(3) 転移因子 LINE が宿主生物のゲノム DNA 中に莫大なコピー数で存在するという事実は、LINE が遺伝子導入ベクターとして高い能力を持つ可能性を示す。我々は LINE を用いて、細胞当たり 1 万コピーもの GFP 遺伝子をゼブラフィッシュ初期胚に導入することに成功している。この遺伝子導入は非常に簡便で、目的遺伝子 RNA に約 60 塩基の認識配列を付加し、LINE RNA とともに細胞に導入するだけで行える。動物培養細胞ゲノムに目的遺伝子を多量のコピー数で導入できれば、コピー数に比例した高収量のタンパク質生産が可能かもしれない。本研究ではこの可能性を検証する。一方で、過剰コピーの導入は、宿主遺伝子を破壊し培養細胞の生存を脅かしかねない。事実、細胞当たり約 1 万コピーの GFP 遺伝子を導入したゼブラフィッシュ初期胚は、受精後約 3 時間（1,000 細胞期）で発生が停止し死滅する。言い換えれば、本実験計画の遺伝子導入系はもろ刃の剣であり、高収量のタンパク質発現を実現し得る一方で、大過剰の遺伝子コピー導入は細胞死のリスクを大幅に上昇させる。したがって、ゲノム DNA に導入する目的遺伝子（あるいは配列）のコピー数を適切にコントロールすることが重要となる。適切なコントロールが可能となれば、動物細胞での高収量タンパク質発現系の構築のみならず、効率の良い順遺伝学的な遺伝子破壊ツールとしても利用できるであろう。本研究計画では、簡便で汎用性の高い、高収量動物細胞タンパク質発現系の構築を目指す。しかし、本研究から得られる知見はタンパク質発現にとどまらず、転移因子 LINE の順遺伝学的遺伝子破壊ツールとしての大きな可能性を示すであろう。本研究は、これまでツールとしてほとんど利用されて来なかった転移因子 LINE に着目し、その高い増幅能を利用したタンパク質発現系の構築を行うことで、今後様々な広がるであろう転移因子 LINE を利用したツール開発の先駆けとなる。

(4) 本研究は、目的遺伝子配列に約 60 塩基の LINE 認識配列を付加した後、in vitro

で RNA に転写し、この RNA と LINE RNA を細胞に導入するだけでゲノム DNA 上に多コピーの目的遺伝子配列を導入できる非常に簡便な方法である。60 塩基の認識配列を付加するだけで様々な配列の導入が可能となるので、本実験系の有効性が示せれば非常に汎用性の高い手法となるだろう。また、本手法で様々な遺伝子を同一動物細胞に導入することができれば、タンパク質複合体の簡便な生産系の構築が可能になるだろう。簡便性は実験系が普及する上で重要な要素である。この 60 塩基の認識配列を利用した遺伝子導入系は、タンパク質発現系にとどまらず、遺伝子破壊ツール等、様々な応用が期待される。類似のツールにウイルスベクターが存在する。ウイルスベクターは遺伝子導入やタンパク質発現、順遺伝学的な遺伝子破壊ツールなどに汎用されるが、本研究の“LINE ベクター”と比較し以下の短所が存在する。ウイルス粒子の作製が煩雑である、細胞当りの目的遺伝子の導入数が低い(数個から数十個)、ウイルスを利用しているので安全性を担保するため十分な注意が必要である。“LINE ベクター”は、簡便に作製できる、莫大なコピー数の目的遺伝子を導入できる、利用する LINE は宿主生物ゲノム中にもともと存在するのでウイルスよりも安全性が高い、などウイルスベクターには無い利点を有している。本研究で LINE のツールとしての有効性が示せれば、今後様々な応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) 動物細胞(当研究室で常時使用している HeLa 細胞を使用予定)に LINE RNA(認識配列無)と GFP RNA(認識配列有)をトランスフェクションし、GFP RNA の DNA コピーを動物細胞ゲノムに導入する。本研究では、細胞ゲノムに導入された GFP 遺伝子からのタンパク発現量を測定するので、トランスフェクションした RNA から GFP タンパク質が発現しないよう、GFP コード配列の相補鎖を GFP RNA に組み込む。また、この GFP コード配列がゲノムに組み込まれた後転写(翻訳)されるために必要となる CMV プロモーターと人工ポリ A シグナルも組み込む。この設計により、トランスフェクションされた GFP RNA が、LINE タンパク質によって DNA にコピーされ動物細胞ゲノム DNA に組み込まれて初めて GFP タンパク質が発現する。予備実験から、動物細胞にトランスフェクションする LINE RNA および GFP RNA の量に比例してゲノム DNA に組み込まれる GFP 遺伝子のコピー数が変化することが示唆されている。そこで、トランスフェクションする RNA 量を変化させ、様々な GFP 遺伝子のコピー数を持つ細胞を作り出す。組み込まれた GFP 遺伝子の細胞当りのコピー数は、定量 PCR で測定する。トランスフェクションした RNA 量、組み込まれた GFP 遺伝子数、細胞生存率を測定することで、細胞が生存し

たまま許容できる GFP 遺伝子のコピー数を算出する。また、GFP の発現量を蛍光量およびウエスタンにより測定し、GFP の遺伝子数、GFP タンパク質の発現量に及ぼす効果を検証する。

(2) 上記の研究と同様に LINE RNA と GFP RNA をトランスフェクションした後、様々なコピー数の GFP 遺伝子を持つ細胞クローンを作成し、各クローン株での GFP 遺伝子のコピー数と GFP タンパク質の発現量の関係性を検証する。また、GFP タンパク質の発現が、細胞の継代とともに安定に維持されるか否か解析する。予備実験から、使用するトランスフェクション試薬による細胞の RNA 取り込み率は 30~60% と高いので、RNA のトランスフェクション後、単に細胞をクローン化することで GFP 遺伝子の導入された細胞を得ることができると期待している。しかし、GFP 遺伝子コピーの挿入効率が予想に反して低かった場合、GFP タンパク質の発現(蛍光)を指標に GFP 遺伝子の導入された細胞を単離する。GFP を発現している細胞数が少ない場合、本学バイオ研究基盤支援総合センターに設置されているセルソーターを利用して単離する計画である。

(3) 動物細胞で簡便にタンパク質複合体を産生できる実験系の構築を目指す。この実験系に必要な手法として、同一細胞に複数種の遺伝子配列を簡便に組み込むことができないなければならない。本研究では、この複数種の遺伝子を同一細胞に同時に組み込むためのツールとして、LINE を利用できるか否か検証する。上記研究の GFP RNA の GFP コード配列を黄色蛍光タンパク質(YFP)コード配列、または、赤色蛍光タンパク質(RFP)コード配列に置換した RNA を作製する。これら認識配列が付加された GFP RNA、YFP RNA、RFP RNA と LINE RNA をすべて混合し、動物細胞にトランスフェクションする。その後、どの程度の細胞に 3 種の遺伝子が同時に挿入されているのか PCR で解析する。また、どの程度の細胞が 3 種のタンパク質を同時に発現しているのか FACS 装置を用いて解析する。トランスフェクションするそれぞれの RNA 量を変化させ、どの条件が最も効率よく 3 種のタンパク質を発現する細胞を作り出せるのか解析する。

(4) 上記の研究で、複数の蛍光タンパク質を発現する細胞を高効率で作出できた場合、相互作用することが既知のタンパク質を同様の方法で動物細胞に発現させ、発現させたタンパク質が細胞内で実際に相互作用を示すかどうか免疫沈降法で解析する。相互作用が確認できれば、本実験系は動物細胞でタンパク質複合体を生産する有用な実験系として利用できる可能性が高い。本実験系の最大の特徴は、簡便に多数の異なる遺伝子を同一

細胞に導入できる可能性を持つことであり、将来的に、多くのタンパク質から成る複合体の解析に威力を発揮するであろう。

4. 研究成果

(1) 転移因子 LINE は真核生物のゲノム内に存在する可動性の DNA である。転移因子は内生の変異原であり、ゲノムに有害な変異を引き起こす可能性がある。しかし、転移因子のこの可動性は、転移因子が分子生物学の有用な道具としての可能性を持つことを示している。本研究は、この転移因子 LINE を用いて、培養細胞のゲノム DNA に人工的に大量のコピーの目的遺伝子を導入する実験系の構築を目指した。本実験系が構築できれば、産生したい目的タンパク質の効率的な発現系の構築が期待できる。

(2) まず、培養細胞に転移因子 LINE の 3' 非翻訳領域を持つ緑色蛍光タンパク質コード RNA を効率的に導入できる条件の検討を行った。様々な RNA 導入試薬や RNA 濃度、導入処理時間の最適化を行い、RNA がより多くの細胞に導入される条件の探索を行った。また、この GFP コード RNA と共導入する LINE RNA の導入濃度の最適化も同時に行った。転移因子 LINE の RNA は多く導入すれば目的遺伝子がゲノムに導入されるコピー数も増加すると考えられるが、細胞の生存率が低下することが予想される。そこで、細胞の生存率の低下がほとんど起こらず、目的遺伝子が多くゲノムに導入される条件の探索を行った。これらの条件検討により、目的タンパク質の大量発現の可能性を探る条件の設定ができた。

(3) 我々は、この転移因子人工転移系の性質を利用して、転移因子配列をゼブラフィッシュ生体内で大量に増幅する実験系の構築に成功した。更には、この転移因子の 3' 末端配列を緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子の 3' 末端に付加することによって、転移因子のタンパク質により GFP 遺伝子をゼブラフィッシュのゲノム DNA 上やヒト培養細胞のゲノム DNA 上に大量に挿入することに成功した。また、宿主細胞のゲノム中に組み込まれた GFP 遺伝子から、大量の GFP タンパク質が発現されることも確認した。これらの研究は、任意のタンパク質遺伝子を、培養細胞などに導入し、そこから、目的タンパク質を大量に作り出す実験系の構築に成功したことを意味する。今後は、複合体を形成するタンパク質群をコードする遺伝子群を同時に培養細胞に組み込み、組み込まれた遺伝子群から大量のタンパク質複合体が合成できるか確かめることを計画している。

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2件)

Yamaguchi K., Kajikawa M. and Okada N. LINE retrotransposition and host DNA repair machinery. *Mob. Genet. Elements*, 5, 92-97 (2015) 査読有
doi: 10.1080/2159256X.2015.1096998

Otsu M., Kajikawa M., Okada N. and Kawai G. Solution structure of a reverse transcriptase recognition site of a LINE RNA from zebrafish. *J. Biochem.*, 162, 279-285 (2017) 査読有
doi: 10.1093/jb/mvx026.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梶川 正樹 (KAJIKAWA, MASAKI)
東京工業大学・生命理工学院・講師
研究者番号: 90361766

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し

(4) 研究協力者

無し