

平成 31 年 4 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08144

研究課題名(和文) ヒトゲノム由来の染色体外因子・その基礎的理解から、革新的細胞工学技術へ

研究課題名(英文) Extrachromosomal elements of human genomic origin-----from its basic understanding to the innovative cell technology

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子増幅は発がんの原因であり、産業応用もされている。増幅した遺伝子は、染色体外因子であるDMに局在する。本研究では、DMに関する我々の長年の成果を利用して、新たに以下の成果を挙げた。DM特異的に2本鎖切断を誘導することにより、DMの核内での凝集、修復、微小核形成を介したDMの排出や構造変換、といった、DMの動態を明確にできた。異種間細胞融合を用いて、染色体の断片化によりDMが形成することを培養条件で明確にした。ゲノム中で高度反復配列となった場合に、遺伝子発現が抑制される配列と、逆に高める配列が存在するを見いだした。マウス人工染色体特異的に目的配列を増幅させる方法を樹立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DMは、増幅遺伝子を運ぶことによつてがん細胞悪性化の鍵となる構造である。その動態を明らかにし、その形成機構を実証した本研究の成果は、がんの理解と治療に重要な意義を持つとともに、遺伝子増幅を産業応用する際にも重要な知見となる。一方、遺伝子増幅の結果、反復配列となった際に、発現抑制されることは知られていたが、逆に活性化される場合があることは予想外で、蛋白質生産に応用する上で重要である。さらに、標的の人工染色体特異的に遺伝子増幅することは、人工染色体が細胞間で移動できることから、産業応用上重要な技術であり、さらに一般的な細胞工学技術として発展可能である。

研究成果の概要(英文)：Gene amplification plays a pivotal role in carcinogenesis. It also is used in manufacture. Amplified genes frequently reside on the extrachromosomal DMs. We obtained the following achievement from this grant. We have clarified the intracellular behavior and elimination of DMs by introducing DM-specific breakage. We have shown that chromosome pulverization actually generates DMs in culture. We have found that the repeat sequence may be silenced or activated, which is depending on the sequence that make repeat. We have developed a method that amplify the target sequence at the targeted artificial chromosome.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：遺伝子増幅 染色体外因子 Double Minutes 組み替え蛋白質生産 反復配列

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

哺乳動物細胞内での遺伝子増幅は、がん遺伝子等の増幅を介して細胞悪性化の決定的な原因になるとともに、ゲノム進化の中心的な駆動力となってきた。さらに、これまで遺伝子増幅を人工的に誘導する技術 (DHFR/MTx 系) は、蛋白質医薬品等の製造に汎用されてきた。増幅した遺伝子は、ゲノム由来の染色体外因子である double minutes (DMs) に局在する 경우가多いが、その細胞内動態と排出機構に関して、研究代表者は 4 半世紀近くにわたって独創的な研究を続け、世界をリードしてきた。さらにそのような研究に端を発して、まったく独自の IR/MAR 遺伝子増幅法を見だし、動物細胞内での遺伝子増幅に関して詳細な分子機構を明らかにしてきた。また、そのような IR/MAR 遺伝子増幅法を、組み替え蛋白質生産系へと産業応用する道を切り拓いてきた。

#### 2. 研究の目的

研究代表者がこれまで独自に進めてきた最先端の研究を、さらに高度に進めて、産業応用可能な技術にする。すなわち、(A) 増幅した遺伝子が局在する染色体外因子である DM について、その形成と細胞内維持、排出、について理解するとともに、その研究を介して DM 自体の性状に関する理解を深める。(B) そのような基礎研究に立脚し、独自の細胞内遺伝子増幅技術 (IR/MAR 遺伝子増幅法) を、組み替え蛋白質生産を中心とした多様な分野に応用可能な、汎用的な細胞工学技術として発展させる。

#### 3. 研究の方法

「4. 研究成果」の欄に併せて記載する。

#### 4. 研究成果

(A-1) 増幅した遺伝子が局在する染色体外因子 DM の動態について、DM 特異的に 2 本鎖切断を誘導することにより、DM の核内での凝集、修復、細胞分裂後の微小核形成を介した DM の排出や構造変換、といった、がん生物学上極めて大事な現象を明確にすることができた。すなわち、数種類の細胞を用い、CRISPR/Cas9 実験系を用いて DM 特異的に 2 本鎖切断を誘導すると、4 時間以内に核内で凝集することを明確に示した。このような凝集は、G1 期では生じず、S 期でのみ生じたことから、相同な配列からなる多数の DM が 2 本鎖切断を受けると、相同組み換えの機構により凝集することが示された。2 本鎖切断により核内で凝集した DM は、修復が終了した後も凝集した状態が持続し、そのために細胞分裂後に細胞質に取り残されて微小核となることが示された。最近の世界の研究により、微小核内ではクロマチンの切断・再結合が生じた後、細胞分裂後に主核と合体することが示されている。我々の結果は、凝集した DM が微小核を形成した後、さらに分裂をすると、増幅した遺伝子が細胞から排出された細胞が出現する一方で、DM が巨大化したり、染色体に組み込まれて HSR になることが示唆された。遺伝子増幅構造の変換や排出に至る機構を明確にしたこのような研究成果は、がんの理解と治療に貢献するとともに、遺伝子増幅を利用した蛋白質生産技術の向上につながる。このような成果は、投稿準備の最終段階で、来週にも学術誌へ投稿する予定でいる。

(A-2) DM を培養条件で形成させる世界初の実験系を樹立した。すなわち、ヒト細胞と齧歯類細胞を融合すると、ヒト染色体が選択的に失われることが知られていた。我々は、この条件でヒト染色体が選択的に微小核に取り込まれ、そこで分断化されることを見いだした。そのような条件で、ヒト染色体の断片の組み合わせから、新たに DM が形成されることを見いだした。このような DM はセントロメアを持たずに、細胞増殖に伴って安定に維持された。このような

成果は、BMC molecular and cell biology 誌に 2019 年掲載された。

(B-1) ゲノム中で高度反復配列となった場合に、遺伝子発現が抑制される配列と、逆に高める配列が存在することを見いだした。すなわち、様々な配列をスクリーニングすることにより、反復した場合にどのような配列が発現を高めるのか、逆にどのような配列が低くするのかのリストを得た。具体的に後者としてはプラスミド、ファージ、等、原核細胞由来配列や、ヒトゲノム中の SINE, LINE 等が含まれ、前者にはヒトゲノム中の複製開始領域、核マトリックス結合領域、独自にヒトゲノムから単離した B-3-31 配列等が含まれた。このような配列は、それ自体が分子生物学上重要な発見となるとともに、動物細胞工学への応用が期待される。このような成果は、PlosONE 誌に 3 報の学術論文として発表したとともに、現在さらに投稿準備中である。

(B-2) マウス人工染色体特異的に目的配列を増幅させる方法を樹立した。具体的には、IR/MAR 配列と、標的配列との相同配列の 2 者を持つプラスミド DNA を、相同配列特異的に切断する Cas9/guide RNA と同時に細胞に導入する方法である。さらに、この方法でなぜ標的配列に特異的に組み込まれるのかについての分子機構を明確にするとともに、人工染色体上で Lactose operator 配列を増幅させることで、lactose repressor-GFP 発現細胞内で人工染色体を生細胞可視化することに成功した。このような成果は、現在投稿中で、revision を送った段階にある。さらにこの方法は、標的とする染色体配列特異的に目的配列を増幅させる方法として、より広範な適用範囲を持つ動物細胞工学技術として発展途中である。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

1. Miki Fukuma, Yuto Ganmyo, Osamu Miura, Takashi Ohyama and **Noriaki Shimizu** (2016) Cloning and characterization of a human genomic sequence that alleviate the repeat-induced gene silencing. *PLoS ONE* 11(4):e0153338. doi:10.1371/journal.pone.0153338 (全20 ページ, Figure 9, Supplementary Fig. 3).
2. Sho-hei Mitsuda and **Noriaki Shimizu** (2016) Epigenetic Repeat-Induced Gene Silencing in the Chromosomal and Extrachromosomal Contexts in Human Cells. *PLoS ONE* 11(8): e0161288. doi:10.1371/journal.pone.0161288 August 15, 2016 (全 16 ページ, Figure 6, Supplementary Fig. 1).
3. Kiwamu Ohsaki, Yusuke Ohgaki, **Noriaki Shimizu** (2017) Amplification of a transgene within a long array of replication origins favors higher gene expression in animal cells. *PLoS ONE* 12(4): e0175585. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175585> April 12, 2017 (全 17 ページ, Figure 8, Supplementary Fig. 1, Table 1).
4. Koichi Utani, Haiqing Fu, Sang-Min Jang, Anna B. Marks, Owen K. Smith, Ya Zhang, Christophe E. Redon, **Noriaki Shimizu** and Mirit I. Aladjem,\* (2017) Phosphorylated SIRT1 associates with replication origins to prevent excess replication initiation and preserve genomic stability. *Nucleic Acids Research* Volume 45, Issue 13, 27 July 2017, Pages 7807–7824, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx468>

5. Noriaki Shimizu\*, Rita Kapoor, Shuhei Naniwa, Naoto Sakamaru, Taku Yamada, You-ki Yamamura and Koh-ichi Utani (2019) Generation and maintenance of acentric stable double minutes from chromosome arms in inter-species hybrid cells. BMC Molecular and Cell Biology 20:2 Mar. 2019. 15 pages, 7 Figures, 3 Supp. Figs. <https://doi.org/10.1186/s12860-019-0186-3>

〔学会発表〕(計 13 件)

- (The 29<sup>th</sup> Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology; JAACT2016 Kobe) 2016, November 9-12  
Kobe International Conference Center, Kobe, Japan  
Noriaki Shimizu (Hiroshima University)  
“Improvement of the IR/MAR gene amplification technology for the recombinant protein production” (Oral 15 min)

### 【第 3 9 回日本分子生物学会大会 ; BMB2016】

2016 年 11 月 30 日～12 月 2 日、パシフィコ横浜

2P-0834 動物細胞内で増幅した遺伝子が受けるrepeat-induced gene silencing (RIGS)の性状と解除法

福間 美樹、元明 優人、満田祥平、大崎究、清水 典明 (広島大・院・生物圏)

2P-0835 ヒト染色体の断片化による、増幅がん遺伝子を運ぶ安定な染色体外因子の形成

山村勇貴、山田卓、坂丸 直人、浪花 修平、Rita Kapoor、宇谷 公一、清水 典明 (広大・院・生物圏)

### 【第 4 0 回日本分子生物学会・生命科学系学会合同年次大会】

2017 年 12 月 6 日～9 日、神戸ポートアイランド

- マウス人工染色体ベクター上で目的遺伝子を増幅させるための研究  
Amplification of the gene of interest on the mouse artificial chromosome vector  
阿蘇品愛美(Manami Asoshina), 多田奈津子(Natsuko Tada), 田地野浩司(Koji Tajino), 清水典明(Noriaki Shimizu) 広島大学大学院生物圏科学研究科 Graduate school of biosphere science, Hiroshima university  
株式会社 chromocenter chromocenter Inc.
- 種間細胞融合による、ヒト染色体の断片化と、安定な染色体外因子 (DM) の形成  
山村勇貴、山田卓、坂丸 直人、浪花 修平、Rita Kapoor、宇谷 公一、清水 典明 (広大・院・生物圏)
- 配列特異的 2 本鎖切断が遺伝子増幅と染色体外因子の動態に与える影響  
「Effect of targeted double strand break on gene amplification and behavior of extrachromosomal element」  
大畠 吉裕・鈴木 航太・清水 典明 (Ohbatake Yoshihiro・Suzuki Kouta・Shimizu Noriaki) 広島大学 生物圏科学研究科 生物機能開発学専攻
- 反復配列による遺伝子発現抑制 (RIGS) と、遺伝子発現活性化 (RIGA) 』  
Repeat-induced gene silencing (RIGS) and repeat-induced gene activation (RIGA) and activation of gene expression」  
大垣祐介、福間美樹、大崎究、清水典明

Yusuke Ogaki, Miki Fukuma, Kiwamu Ohsaki, Noriaki shimizu

- **染色体外因子の安定性と遺伝子増幅に与える SIRT1 の影響**

**Effect of SIRT1 on the stability of extrachromosomals and the gene amplification**

谷口諒之介<sup>1</sup>, 大岡佑司<sup>1</sup>、宇谷公一<sup>2</sup>、Mirit Aladjem<sup>2</sup>、清水典明<sup>1</sup>

(Ryonosuke Taniguchi, Yuuji Ooka, Koichi Utani, Mirit Aladjem<sup>2</sup> Noriaki Shimizu<sup>1</sup>)

<sup>1</sup>広島大学 生物圏科学研究科 (Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Japan)<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Pharmacology, Center for Cancer Research, NCI, NIH, USA

#### 第 41 回日本分子生物学会年会

2018 年 11 月 28 日～30 日、パシフィコ横浜

- **染色体外因子の安定性と遺伝子増幅に与える SIRT1 の影響**

**Effect of SIRT1 on the stability of extrachromosomes and the gene amplification**

谷口諒之介<sup>1</sup>、宇谷公一<sup>2</sup>、Mirit Aladjem<sup>2</sup>、清水典明<sup>1</sup> (Ryonosuke Taniguchi, Koichi Utani, Mirit Aladjem, Noriaki Shimizu)

<sup>1</sup> 広島大学 生物圏科学研究科 (Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Japan)

<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Pharmacology, Center for Cancer Research, NCI, NIH, USA

- **反復配列による遺伝子発現抑制 (RIGS) と、遺伝子発現活性化 (RIGA) Repeat-induced gene silencing (RIGS) and repeat-induced gene activation (RIGA) and activation of gene exoression**

大垣祐介、福間美樹、大崎究、清水典明

Yusuke Ogaki, Miki Fukuma, Kiwamu Ohsaki, Noriaki shimizu

- **染色体外因子の排出に關与する細胞質ブレッピングと遺伝子増幅 Cytoplasmic blebbing, which mediate the elimination of extrachromosomal elements, and gene amplification,** 大岡佑司<sup>1</sup>、宇谷公一<sup>2</sup>、Mirit Aladjem<sup>2</sup>、清水典明<sup>1</sup>(Yuji Ooka, Koichi Utani, Mirit Aladjem<sup>2</sup> Noriaki Shimizu<sup>1</sup>)<sup>1</sup>

広島大学 生物圏科学研究科 (Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University, Japan)<sup>2</sup>Laboratory of Molecular Pharmacology, Center for Cancer Research, NCI, NIH, USA

- **配列特異的 2 本鎖切断が遺伝子増幅と染色体外因子の動態に与える影響** 「Effect of targeted double strand break on gene amplification and behavior of

extrachromosomal element」大畠 吉裕・鈴木 航太・清水 典明 (Ohbatake

Yoshihiro・Suzuki Kouta・Shimizu Noriaki) 広島大学 生物圏科学研究科 生物機能開発学専攻( Hiroshima university Graduate School of Biosphere Science Biofunctional Science and Technology )

- **マウス人工染色体特異的な目的遺伝子の増幅と、人工染色体の生細胞可視化 Amplification of the gene of interest on the mouse artificial chromosome vector, and live-cell imaging of the artificial chromosome.** 阿蘇品愛美 (Manami Asoshina), 苗佳棋 (Genki Myo)、榎本耀太(Yohta Masumoto)、多田奈津子 (Natsuko Tada), 田地野浩司 (Koji Tajino), 清水典明 (Noriaki Shimizu) 広島大学大学院生物圏科学研究科 Graduate school of biosphere science, Hiroshima university、株式会社 chromocenter

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：哺乳動物細胞内の標的染色体部位で目的遺伝子を含むポリヌクレオチドを増幅させる方法およびベクター、ならびにその利用

発明者：清水典明

権利者：株式会社 chromocenter (広大90%、chromocenter10%)

種類：特許

番号：特願 2017-218640

出願年：2017

国内外の別：国内

取得状況(計 1件)

名称：哺乳動物細胞内で増幅された目的遺伝子の発現を高めるポリヌクレオチド

発明者：清水典明

権利者：広島大学長

種類：特許

番号：特許 6370226 (特願 2015-003690)

取得年：平成30年7月20日登録

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。