

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2007～2008
課題番号：19510204
研究課題名（和文） ヒト人工染色体上に遺伝子発現変動のセンサーローカスを構築する
研究課題名（英文） Construction of a sensor locus for monitoring gene expression on a human artificial chromosome
研究代表者
加藤 基伸（KATO MOTONOBU）
鳥取大学・医学部・助教
研究者番号：00273904

研究成果の概要：

我々はこれまでに染色体を自在に改変する技術を開発して、ヒト人工染色体（HAC）ベクターを構築してきた。HAC ベクターは、宿主細胞（ヒト/マウス）内で内在の染色体から独立して安定に維持され、部位特異的組み換えシステムを利用して BAC サイズ（100～200kb）のゲノム DNA が搭載できる。これらの特徴から、HAC は「センサーローカス」のプラットフォームとしての可能性を持つ。そこで本研究では、BAC クローンを改変して発現制御領域の下流にレポーター遺伝子を組み込み、これを HAC ベクターに搭載することで、生細胞内の遺伝子発現動態が解析できる実験系の確立を試みた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：染色体工学、細胞工学、ゲノム医工学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：ヒト人工染色体、遺伝子発現変動、センサーローカス

1. 研究開始当初の背景

個体の発生過程、環境への応答など、生物現象は細胞内での遺伝子発現が組織/時期特異的に変動することによって引き起こされる。遺伝子発現を検出する手法として使われるのは、RNA レベルでは *in situ* ハイブリダイゼーション、タンパク質レベルでは免

疫染色である。しかしこれらの手法では組織/細胞の固定によって時間軸を「固定」してしまうため、生細胞を対象として遺伝子発現を経時的に追跡することはできない。特定の細胞における遺伝子発現の変動を連続的に検出するには、着目する遺伝子座において内在のプロモーター制御下に標識遺

伝子(蛍光タンパク質 GFP など)を挿入する方法が考えられる。このとき標識遺伝子を挿入する位置に応じて、内在の遺伝子をノックアウトする場合と、蛍光融合タンパク質が発現する場合があります。前者の場合、遺伝子のコピー数を 2 から 1 に減らすことになり、後者の場合は融合によってタンパク質の構造が変化し正常機能を損なう可能性がある。内在の遺伝子機能を損なうことなく、なおかつその遺伝子座の発現変動を追跡するためには、内在の遺伝子座から独立した「センサーローカス」の構築が望ましい。

我々はこれまで染色体工学の技術を駆使してヒト人工染色体 (Human Artificial Chromosome: HAC) ベクターを構築し、1) ヒト体細胞およびマウス ES 細胞の分裂に際して安定に保持され、2) 幹細胞の分化能を損なわず、Cre/loxP システムを利用して BAC サイズ (100~200kb) のゲノム DNA が搭載でき、搭載した遺伝子の発現は生理的、人為的に制御されることを明らかにした。これらの特徴から、HAC は「センサーローカス」のプラットフォームとしての可能性を持つ。

ヒトゲノムプロジェクトは BAC ライブラリーを基盤として進められた。任意の遺伝子座を含んだ全塩基配列既知の BAC クローンは、テータベース検索により容易に特定でき、なおかつ公共の DNA バンクから入手できる。加えて大腸菌内での組換えを利用した BAC 改変技術が開発された (Lee2001)。疾患の罹患し易さや薬剤に対する感受性などの個体差は、SNP など塩基配列多型に起因することが明らかになりつつある (Hoehe 2003)。しかし非翻訳領域の多型が発現に及ぼす影響を経時的に検証するための有効な手法がないのが現実である。これらの経緯から、ゲノムワイドに整備された BAC 資材とその改変技術を HAC ベクターの特性とを融合することによって、遺伝子発現の生理的な発現動態の解析と塩基配列多型がこれに及ぼす影響を評価できる新規の実験系を構築するという着想に至った。

Hoehe MR et al. *Curr Pharmateut Biotech* 4, 351-378,2003.

Lee EC et al. *Genomics*; 73: 56-65, 2001.

2. 研究の目的

BAC クローンの改変により目的の遺伝子座にセンサー遺伝子を挿入したコンストラクトを作製し、これを HAC に搭載して、遺伝子発現変動のセンサーローカスを構築する一連の実験系を確立する。野生型ローカスと共に変異ローカスを構築し、発現に及ぼす影響を評価できることを示す。

本研究の目的はヒト遺伝子発現を経時的にモニターできるセンサーローカスを保持した「レポーター細胞」の作製にあり、BACゲノムクローンを効率よく改変し、これをHACベクターに搭載するための基盤技術を確立する。このため2つの課題を設定した。

(1) 遺伝子発現の時空変動が既に解析されているHoxB4遺伝子座をモデルとして実験系の妥当性を検証する

HoxB4遺伝子座には隣接してmiRNA(miR10a)が存在し、両者は発生過程において同一の発現パターンを示す (Mansfield 2004)。miR10aは標的となる転写物に相補的に結合し、これを分解する。miR10aに相補的な配列をセンサー遺伝子 (RFP) の3'端に繋いでおくと、miR10aの発現に伴って転写物が分解され、構成的に発現していたRFPの発現が消失する。そこでHoxB4を含むBACにおいてコード領域をGFPに置換し、一方でmiR10aセンサーコンストラクトを作製し、これらをHACベクターに搭載する。内在のHOXB4遺伝子の発現に同調してGFPが発現すると同時に、それまで発現していたRFPは新たに発現した内在のmiR10aによる転写物の分解によって発現が抑制されることを検証する。

(2) 塩基配列多型とレポーター発現量との相関について薬物代謝酵素をコードするCYP3A4遺伝子座を例として検証する。

肝臓における薬物代謝酵素シトクローム450のうちCYP3A4の活性には個体差があるが、これは遺伝子上流約11kbに存在するエンハンサー領域内の塩基配列多型 (-11,129_-11,128ins TGT) によることが示唆されている (Matsumura 2003)。またSNP (-290A/G) は nifedipine 投与による発現誘導と代謝に関与するとの報告がある (Johnson 2005)。CYP3A4 を GFP に置換し、制御領域に多型を持つ 2 つのセンサーローカスアレルを作製し、多型と発現量との相関を検証する。

Johnson AD et al. *Pharmacol Therapeut* 106, 19-38, 2005.

Mansfield JH et al. *Nat Genet* 36, 1079-1083, 2004.

Matsumura K et al. *Mol Pharmac* 65, 328-334, 2004.

3. 研究の方法

(1) 目的遺伝子を含むBACクローンの取得

米国 UCSC のデータベース (Human genome browser gateway) にて検索した目的遺伝子を含む BAC クローンは、遺伝子バンク (米国 CHORI, BACPAC resources center;) から入手する。はじめに STS マー

カーを用いた PCR 解析と制限酵素地図作製によって目的の遺伝子座を含むことを確認する。

(2) BACクローンの改変

λ -ファージの組み換え機構は、RecBCD nuclease の放出を抑制する Gam、相同組み換え反応を進める *exo* および *bet* からなる。これらを温度感受性の *ci857-repressor* 制御下に配した λ -ファージを導入した大腸菌株 DY380 では、32°C から 42°C に培養温度を変えることで、高頻度に相同組み換えが誘導できる。そこで初めに目的の BAC を抽出して DY380 株を形質転換する。第一段階としてガラクトース不含培地での培養によって標的領域に選択マーカー *galK* を導入しておく。次に両端に約 50bp ずつの組み換え標的配列を備え、GFP 遺伝子を含んだ組み換えコンストラクトを作製し、これを線状化して BAC を保持した DY380 株を形質転換し、2-デオキシガラクトース含有培地での培養によりネガティブ選抜を行って組み換え体を得る。遺伝子上流の発現制御領域への点変異導入についても同様に行い、変異導入した DNA 断片の組み換え挿入体を得る。

(3) HAC搭載のための供与サイト導入

既に構築済みのヒト 21 番染色体由来 HAC ベクターには、外来遺伝子受容サイトとして *loxP* および *FRT* 配列が搭載してある。HOXB4 および CYP3A4 センサーコンストラクトには、これに対応する供与 *loxP* 配列を Recombineering により導入する。HOXB4 実験の場合、miR10a センサーコンストラクトには供与 *FRT* 配列を導入する。

(4) レポーターコンストラクトの HAC ベクターへの搭載

HOXB4 ないし CYP3A4 センサーコンストラクトは、Cre 酵素の発現により HAC ベクター上の受容 *loxP* サイトに、miR10a センサーコンストラクトは Flp 酵素の発現により HAC ベクター上の受容 *FRT* サイトに挿入する。

(5) 受容細胞への HAC ベクター移入と発現の解析

HAC ベクターの細胞への移入は、微小核細胞融合法により行う。HOXB4-HAC はマウス ES 細胞に移入し、キメラマウスを作製する。発生過程におけるセンサー遺伝子の発現変動を観察し、内在の HOXB4 遺伝子の発現パターンと比較する。Hox4 は造血幹細胞の自己複製にも関与しており、活性型 *b-catenin* の過剰発現によって Wnt シグナル経を活性化すると、HOXB4 の発現が上昇することが報告されている (Reya 2003)。セン

サーローカスからの蛍光発現を指標に造血系細胞分画を取り、自己複製能との相関を検討する。

CYP3A4-HAC は肝細胞株 (HepG2) に移入する。内在の CYP3A4 アレルについては予めタイピングをしておく。センサーローカスの多型と蛍光発現との相関を調べるとともに、nifedipine 投与に対する発現応答を検索する。

Reya T et al. *Nature* 423, 409-414, 2003

4. 研究成果

はじめに HAC ベクター上の遺伝子搭載部位が、遺伝子発現に関し再現性を示すことを確認する目的で、CHO 細胞内の HAC ベクター上に CMV プロモーターで制御される GFP 発現コンストラクトを導入した。クローン間の発現量の差は、宿主染色体上へのランダムな挿入と比較して均一であることが確認された。ランダムインテグレーションによる遺伝子導入の場合、クローン間に生じる発現量の差が大きい。このため多数のクローンを単離し、その中から最適のものを選別した上で実験に用いるという煩雑さが避けて通れない。これに対し HAC ベクターでは、クローン間で発現量の差が一定の幅に収まることが明らかになった。この結果は、HAC ベクターのひとつの利点を示すものである。

センサーローカスの構築は、BAC 改変によるレポーターコンストラクトの構築と、これを染色体ベクターに搭載する、2 つの段階から成る。はじめに選んだ HOXB4 遺伝子ローカス (ヒト 17 番染色体長腕 q21.3 領域) について、米国 UCSC のゲノムデータベース (Human genome browser gateway) にて検索した目的遺伝子を含む BAC クローンを、遺伝子バンク (米国 CHORI, BACPAC resources center) から入手した。インサート両端の塩基配列解析、STS マーカーを用いた PCR 解析、および制限酵素地図作製を行い、当該 BAC クローンには目的の遺伝子座が含まれることを確認した。

次にこの BAC を宿主大腸菌 (DH10B) から単離し、これを培養温度変化によって組み換え酵素の発現を誘導できる菌株 DY380 に導入することを試みた。薬剤耐性選択により単離した形質転換体から BAC を抽出して制限酵素断片長を解析したところ、全長を含むクローンを得ることができなかった。得られた形質転換体では、インサート DNA の rearrange が確認された。HOXB4 を含む BAC インサート配列の内容を RepeatMasker によって解析したところ、繰り返し配列が多く含まれることが明らかになり、これが rearrange の要因のひとつと考察された。大

腸菌宿主株における BAC の安定性は、含まれるゲノム配列に依存することが知られている。なおかつ今回の目的遺伝子については、発現制御に必要な制御配列は確定されていないのが現状である。そこで今後は、目的遺伝子を含んだ長さの異なる複数の DNA 断片を BAC クローンから単離し、これにレポーター遺伝子を繋いだコンストラクトをインビトロで作製する方針を試みる予定である。

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 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[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]

6. 研究組織

(1)研究代表者

加藤 基伸 (KATO MOTONOBU)

鳥取大学・医学部・助教

研究者番号：00273904

(2)研究分担者

井上 敏昭 (INOUE TOSHIAKI)

鳥取大学・医学部・准教授

研究者番号：80305573

(3)連携研究者