

機関番号：84203

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590326

研究課題名（和文） 染色体転座による疾病の発症機構

研究課題名（英文） Mechanisms of diseases by chromosomal translocation

研究代表者

木下 和生 (KINOSHITA KAZUO)

滋賀県立成人病センター（研究所）・遺伝子研究部門・専門研究員

研究者番号：50293874

研究成果の概要（和文）：染色体転座はがんや精神疾患、先天的発生異常症など様々な疾患の原因となる。これらの疾患を理解するためには染色体転座を実験的に再現する、いわば染色体の手術が必要となる。従来の方法に改良を加えることで、簡単に染色体手術を行う方法を確立できた。これを応用して、がんの原因となる2種類の染色体転座を再現した他、染色体内の特定部分を重複・欠失・逆転させたりできること、遺伝子間の距離測定に応用できることを示した。

研究成果の概要（英文）：Chromosomal Translocations are one of major causes of various diseases including cancer, psychiatric disorders, and congenital anomalies. Understanding these diseases requires a technique to experimentally recapitulate diseases-specific chromosomal translocations. We improved previous methods to enable easier and quicker manipulation of mammalian chromosomes. Using this technique, we demonstrated recapitulations of two-types of cancer-causing chromosomal translocations and induction of intra-chromosomal duplication, deletion, and inversion. In addition, we applied it to measurement of distance between two genetic loci.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：発がん

科研費の分科・細目：基礎医学・病態医化学

キーワード：分子腫瘍学、染色体転座、染色体異常、DNA 組換え、遺伝子間距離、染色体テロトリー、がん

1. 研究開始当初の背景

染色体転座はがん、先天異常、精神疾患の原因となるが、転座がどのようにして起こり、どのようにして疾患に至るかには不明な点が多い。染色体転座が起こる分子機構を解明し、転座が遺伝子発現に与える影響を解析するためには染色体転座を任意に操作できる実験系が必要である。

染色体転座に生じる融合タンパクが発がんに関与する例は多く知られており、草分け的存在である BCR-ABL 融合タンパク質は分子標的創薬が著効した最初の例としても有名である。融合タンパクが生じない染色体転座の例として知られているのは Myc-IgH 転座である。この場合では IgH エンハンサーが転座により Myc 遺伝子の発現を増強すること

がん化に関与すると考えられている。染色体は細胞間期核内で他の染色体と混ざり合うことなく、染色体テリトリーという一定の領域に鎮座していることが知られている。この染色体の核内局在は細胞種によっても異なる一方で、同じ細胞種では動物種を超えて保存されているので、機能的に重要な意味を持つと考えられている。転座が生じるためには2つの染色体が空間的に接近する必要があり、接近度合いは染色体テリトリーによって規定されていると考えられる。染色体テリトリーは遺伝子発現の制御と互いに影響し合う可能性が示唆されている。すなわち、遺伝子発現状態によってテリトリーが規定され、逆に、テリトリーによって遺伝子発現が制御されている。従って、転座により、染色体テリトリーが変化し、遺伝子発現が変化することがある。

2. 研究の目的

染色体間の距離を測定し、かつ、任意の染色体転座を再現できるような実験系を確立することを目標とする。そのために、染色体の任意の部位に導入した loxP を導入する遺伝子ターゲティングの技術と2つの loxP 部位の間で組換えを誘発する Cre 組換え酵素の技術を応用した実験系を計画した。この実験系により、(1) 疾患の原因となる染色体転座の再現 (2) 染色体内の重複・欠失・逆位の誘導 (3) 染色体間距離の測定を実現する。

3. 研究の方法

Cre-loxP 遺伝子組換え技術と蛍光タンパク遺伝子技術を応用した染色体転座誘導を目的としたターゲティングベクターを作成し、これをリンパ球細胞株 Nalm-6 に導入する。転座誘導過程の概略を図1に示す。

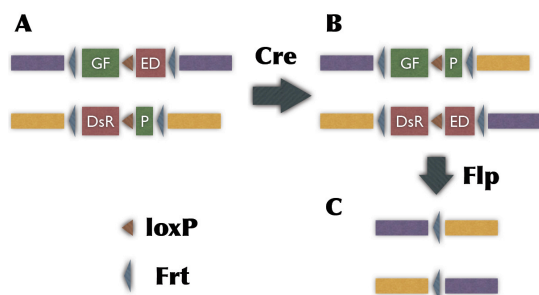


図1

GFP (緑色蛍光タンパク) と DsRed (赤色蛍光タンパク) 遺伝子を分断し、loxP をはさんで互いに融合させる遺伝子を作成する。これを2カ所の異なる染色体部位(紫と黄)に遺伝子ターゲティングにより導入された後の状況が図に示されている。Frt 配列は Flp 組換え酵素が認識する配列であり、loxP 配列は

Cre により認識される配列である。Cre が作用すると loxP 間での組換えが起こる。同時に GFP と DsRed が発現するため、この反応を経た細胞は緑色及び赤色の蛍光を獲得する。

この実験で用いる遺伝子ターゲティングベクターの作成と細胞内で起こる染色体転座をまとめた図を図2に示す。

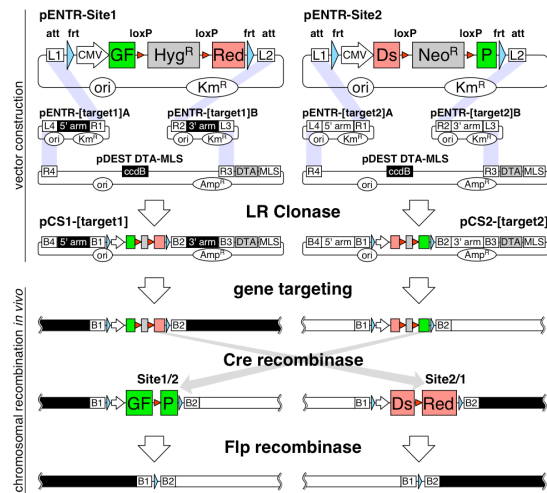


図2

(上段) 遺伝子ターゲティングベクターは2種類が必要で一つを Site1, もう一つを Site2 という。相同組換え体を得るのに必要な薬剤耐性遺伝子(Site1 には Hyg-r, Site2 には Neo-r)が2つの loxP 部位の間に挿入されている。分断された GFP と DsRed が融合した発現ユニットの両側に目的とする遺伝子に相同な配列を挿入する。上流と下流の相同領域のうち一方を4kb、他方を2kbとし、それらはゲノム情報に基づくPCRにより増幅単離する。下流相同領域のさらに下流には、相同組換え体の選別に効果があるジフテリアトキシンA遺伝子と直線化制限酵素部位を配置する。これらの構成要素はλファージ部位特異的組換え酵素を利用した Multisite Gateway 法により1段階の反応で1つのターゲティングベクターにくみ上げることができる。この方法により迅速に多数のターゲティングベクターの作成が可能になっている。

(下段)

タモキシフェンにより活性化できる Cre (MerCreMer) を安定導入されたヒトリンパ球細胞株 Nalm-6 に遺伝子ターゲティングを2回行い、逐次的に2つのベクターを目的の染色体部位に導入する。この細胞にタモキシフェンを作用させると Cre が活性化され、最初に薬剤耐性遺伝子(Hyg-r, Neo-r)が除去され、次に残った loxP 配列の間で組換え反応が起こり染色体転座が完了する。この反応は遺伝子間の距離が遠いほど頻度が低いので、

転座を起こした細胞のみを選別する必要がある。この目的に蛍光タンパクが役立つ。蛍光を指標にセルソーターで細胞を選別でき、組換えの頻度測定もできるからである。

この方法を確立し、以下の実験を行う。

- (1) がんの原因となる Myc-IgH 転座、および、Bcr-Abl1 転座（フィラデルフィア染色体）を再現する。
- (2) 14番染色体上の1Mbの領域の重複・欠失・逆位の誘導する。
- (3) 14番染色体上で異なる距離の2点間の組換え頻度を測定し、距離と組換え頻度に一定の相関関係があることを示す。

4. 研究成果

(1) 病的転座の再現実験

疾患の原因となる転座の再現を試みた。一つ目は c-Myc/IgH 転座を再現した。Nalm-6 ヒトプレ B 細胞株の8番染色体 c-Myc 遺伝子に Site2 を導入し、14番染色体 IgH に Site1 を導入した。この細胞に Cre 組換え酵素を7日間作用させると Site1 および Site2 に含まれる loxP 部位の間で組換えが起こり、これに伴い8番染色体と14番染色体の間の相互転座が生じた。緑色および赤色蛍光を検出できるフローサイトメトリーにより測定した転座がおきている細胞の頻度は 1.5×10^{-5} であった。この細胞をセルソーティングにより単離し、転座がおきている事を PCR 法、FISH 法、染色体 G バンド解析により確認した。同様に、Nalm-6 細胞の22番染色体 BCR 遺伝子に Site1、9番染色体 ABL1 遺伝子に Site2 を導入し、Cre 組換え酵素を7日間作用させると Site1、Site2 間で組換えが生じ、染色体転座が誘発された。フローサイトメトリーによる転座の頻度は 5.9×10^{-5} であった。この細胞をセルソーティングにより単離し、転座がおきている事を SKY 法により確認した（図3）。さらに、Flp 組換え酵素を作用させ挿入されている蛍光タンパク遺伝子の除去を行った後、ウェスタンブロット解析を行う事で BCR-ABL1 融合タンパクが起きている事を確認した。これらのことから本染色体操作法が任意の染色体転座の誘導に応用できる事が示された。

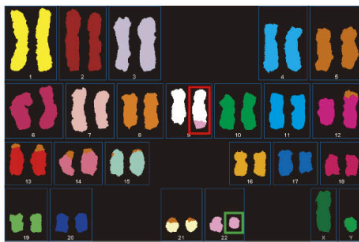


図3

Nalm-6 細胞でわたしたちが再現したフィラデルフィア染色体（緑棒）。9番染色体からきた白い部分は小さすぎてみえないが、正常の22番染色体（左）より小さくなっていることがわかる。9番染色体に乗り移った22番染色体（赤棒）はピンクに見える。

(2) 遺伝子領域の重複・欠失・逆位の誘導
14番染色体の IgH 遺伝子座に Site1 を導入し、それより1Mb セントロメアよりの部位に Site2 を導入した。Site1 と Site2 の loxP の方向が同じである場合、loxP で挟まれた領域の重複または欠失が誘導できた。重複が起こる機構として、G2/M 期において複製後の姉妹染色分体間つまり分子間での Site1-Site2 組換えが誘導されることが考えられた。Site1 と Site2 の loxP の向きを逆向きにした場合、組換えにより loxP で挟まれた領域の逆位が誘導できた。

(3) 遺伝子間の距離測定

IgH (14番染色体) に Site1 を導入した Nalm-6 細胞を作製し、さらに IgH から1Mb, 6Mb, 11Mb, あるいは40Mb はなれた領域に Site2 を導入した細胞を作製した。さらにタモキシフェンを7日間培地に添加し、Cre による組換えを誘導し、組換え頻度をフローサイトメトリーにより測定した。Site2 が Site1 と同じ染色体に導入された細胞では Cre による組換え頻度と組換え点間の距離は反比例の関係であることが分かった（図4）。このことから組換え頻度は遺伝子間の距離の指標となることが分かった。

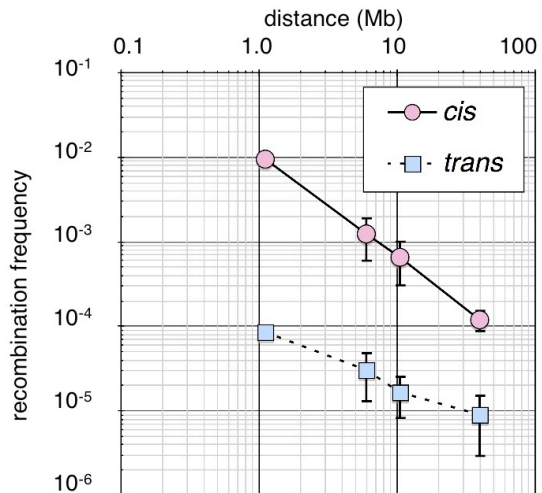


図4

cis は同じ染色体に Site1 と Site2 が導入されている場合である。trans は異なる相同染色体に Site1 と Site2 が導入されている場合である。

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1件)

①Uemura, M, Niwa, Y, Kakazu, N, Adachi, N, and Kinoshita, K, Chromosomal manipulation by site-specific

recombinases and fluorescent protein-based vectors. PLoS ONE 査読あり vol. 5, 2010, e9846.

(3) 連携研究者
なし

〔学会発表〕(計 5 件)

①植村宗弘、丹羽陽子、嘉数直樹、足立典隆、木下和生、Cre 組換え酵素による染色体間組換え頻度測定により明らかとなったテロメア近傍遺伝子のアクセシビリティ、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会、平成 22 年 12 月 9 日、神戸

②植村宗弘、丹羽陽子、木下和生、部位特異的組換え酵素と蛍光タンパクを用いた染色体手術法の開発、第 57 回日本生化学会近畿支部例会、平成 22 年 5 月 22 日、奈良先端科学技術大学院大学

③植村宗弘、丹羽陽子、嘉数直樹、足立典隆、木下和生、部位特異的組換え酵素と蛍光タンパクを用いた染色体手術法の開発、第 32 回日本分子生物学会年会、平成 21 年 12 月 9 日、横浜

④Uemura, M, Niwa, Y, Kakazu, N, Adachi, N, and Kinoshita, K. Chromosomal manipulation by site-specific recombinases and fluorescent protein-based vectors. 21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, 平成 21 年 8 月 9 日、上海 (中国)

⑤植村宗弘、足立典隆、木下和生、Cre-loxP 組換え系と蛍光タンパクを用いた遺伝子間 3 次元的距離の測定、第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会、平成 20 年 12 月 11 日、神戸

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shigamed.jp/staff/kinoshita.html>

<http://homepage.mac.com/kkinoshi/lab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 和生 (KINOSHITA KAZUO)

滋賀県立成人病センター (研究所)・遺伝子研究部門・専門研究員

研究者番号：50293874

(2) 研究分担者

なし