

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 27 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24655155

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子同定法の開発

研究課題名(英文) Development of a global gene identification method

研究代表者

世良 貴史 (SERA, TAKASHI)

岡山大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：10362443

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、着目している現象を誘導する遺伝子を網羅的に同定する方法の開発である。そのためまず、標的遺伝子の特定のサイトをそれぞれ標的とするサンプルを最終的に9種類デザイン・作製した。それらを個別に動物細胞に導入し、その中で標的の遺伝子の発現を最も効果的に制御できるサンプルを分子生物学的な手法を用いて、同定した。さらに、目的の表現形を誘導する条件の検討を行い、最高で60～70%まで誘導率を高めることができた。

研究成果の概要(英文)：The goal of this study is to develop a method for a global gene identification. For this purpose, we designed nine molecules that recognized one specific target site of the gene of our interest, respectively, and generated them. Among them, we identified the best sample to modulate the expression of the target gene most effectively. Furthermore, we examined how to generate the phenotype of our purpose, and raised the induction efficiency to 60-70%.

研究分野：蛋白質工学・遺伝子工学・細胞工学

キーワード：遺伝子

1. 研究開始当初の背景

分化や疾患など生命現象に関わる遺伝子を網羅的に同定することは、生命現象のメカニズムの解明や疾患の新たな治療法を開発する上で非常に重要である。現在までに様々なアプローチが試みられてきたが、候補遺伝子を絞り込めば絞り込むほど、目的の現象を誘導する効率が下がることが多く、着目した現象を誘起する遺伝子を網羅的に同定できる手法はまだ開発されていないのが実情である。

2. 研究の目的

本研究の最終目標は、目的の機能を発揮する遺伝子を網羅的に同定する方法を新たに開発することである。そこで、まず目的の表現型を誘導すると考えられる複数の遺伝子の発現を調節するサンプルをデザインし、それらを用いてどれくらい標的の遺伝子の発現を活性化できるかどうかを評価し、網羅的に遺伝子を同定する手法の開発につなげていく。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現の活性化を目指したサンプルの創出

まずゲノムデータベースを用いた詳細な解析により、標的サイトの探索を行った。最終的に絞り込んだ複数の候補サイトをそれぞれ標的とするサンプルをデザインし、それぞれをコードするフラグメントを化学合成した。それぞれを制限酵素で消化した後、ベクターの BamHI と AgeI 間に導入し、大腸菌で増幅させ、得られたものを最終的に分子生物学的に同定した。

(2) デザインしたサンプルによる標的遺伝子発現の活性化

ヒト由来細胞 HEK293 の 2×10^4 cells を PDL-96 well plate へ播種した翌日に、それぞれのサンプルベクター 13 ng、リポーターベクター 77 ng および pCMV- β 10 ng をトランスフェクション試薬を用いて導入した(コントロールには各サンプルベクターの代わりに pcDNA3.1 13 ng を使用した)。37、CO₂ インキュベーターで 48、72 時間培養後、細胞を PBS で洗浄した後、 $1 \times$ PLB 100 μ l で細胞ライセートを調製した。得られた各細胞ライセートについて、Luminescent β -Galactosidase Detection Kit および Luciferase Assay Reagent を用いて、 β -ガラクトシダーゼ活性およびルシフェラーゼ活性をそれぞれ評価した。最終的な各サンプルの遺伝子活性化能は、 β -ガラクトシダーゼ活性に基づいて細胞への導入効率を標準化して得られたルシフェラーゼ活性に基づいて評価した。

(3) デザインしたサンプルの細胞内での存在量の評価

ヒト由来細胞 HEK293 の 2×10^4 cells を PDL-96 well plate へ播種した翌日に、それぞれのベクター 100 ng をトランスフェクション試薬を用いて導入した(コントロールには代わりに pcDNA3.1 100 ng を使用した)。37、CO₂ インキュベーターで 48、72 時間培養後、細胞を PBS で洗浄した後、 $1 \times$ PLB 100 μ l で細胞ライセートを調製した。それぞれの細胞ライセートを用いて、SDS-PAGE 用サンプルを調製した。また、NI Protein Assay を用いて、各サンプル中の総タンパク質濃度を測定した。デザインした分子確認用のウェスタンブロットには、総タンパク質 2.3 μ g 分を使用し、また分子量マーカー用には S-Protein HRP Conjugate を、またデザインしたサンプルには anti-FLAG-HRP 抗体を、それぞれ用いた。プロット後、ECL Prime Western Blotting Detection Reagent を用いて発生したシグナルを X 線フィルムに感光させ、検出した。

(4) 目的の表現型への誘導

X 細胞から目的の表現型を誘導するため、コントロールとして各種試薬を用いての誘導条件の検討を行った。 2×10^4 cells を PDL-24 well plate へ播種した 2 日後に培地交換し、さらに 2 日後に各種試薬の濃度を変えた培地に交換し、誘導を開始した。その 2 日後に表現型を維持する培地に交換し、さらに 6 日から 2 週間くらい細胞の表現型を顕微鏡下で経時的に観察した。特徴的な表現型が見られたら、表現型特異的に検出可能な染色を行い、最終的にどれくらい目的の表現型に誘導できたかを評価した。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現の活性化サンプルの作製

まずゲノムデータベースを用いた詳細な解析により、標的サイトの探索を行った。多数リストアップした候補の中から、当研究室において蓄積された情報に基づき、まずは有望な上位 4 つのサイトに絞り込んだ。次に、それぞれのサイトを標的とするサンプルをデザインし、それぞれをコードするものを化学合成した。それぞれをベクターに導入し、微生物で増幅させ、得られたものを分子生物学的に同定した。

(2) デザインしたサンプルによる標的遺伝子発現の活性化

まず作製したサンプル 1 ~ 4 をそれぞれリポーターベクターと共にヒト由来細胞 HEK293 に導入し、48 時間あるいは 72 時間培養した。培養後、それぞれ得られた細胞を破碎し、細胞内のリポーター遺伝子の 48 時間および 72 時間培養後の発現量を酵素活性により評価した。これらの実験では、48 時間、

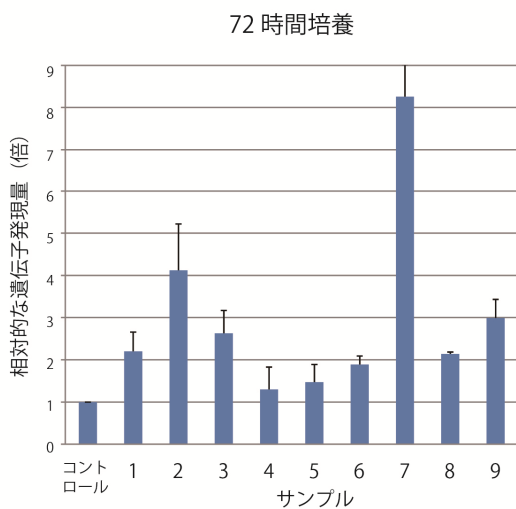
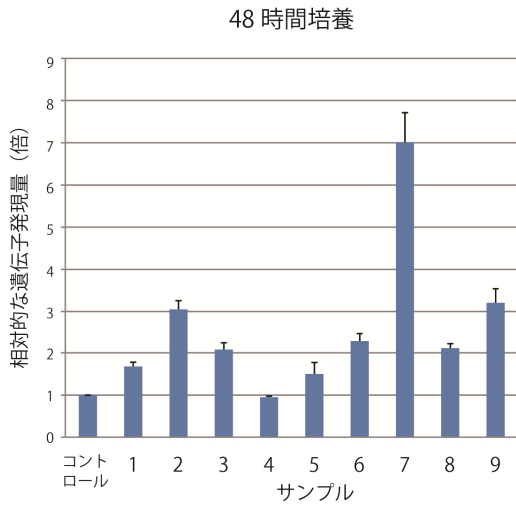


図1. 標的遺伝子発現の活性化

72時間培養後共に、デザインした4つのサンプルのうち、サンプル2が最も効率よく標的遺伝子の発現を活性化した。

さらに、より高い活性を有するサンプルの

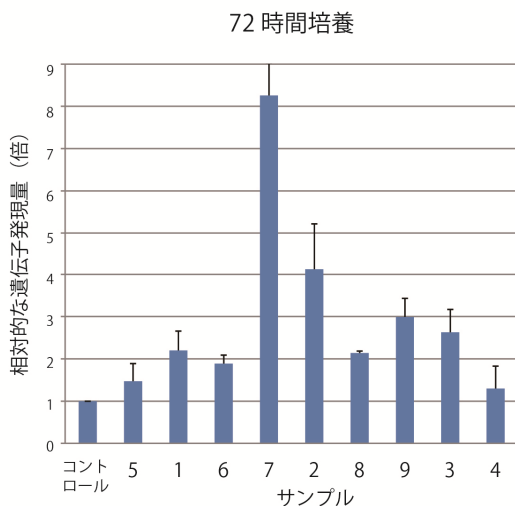


図2. 標的サイトの位置と標的遺伝子発現レベルとの相関

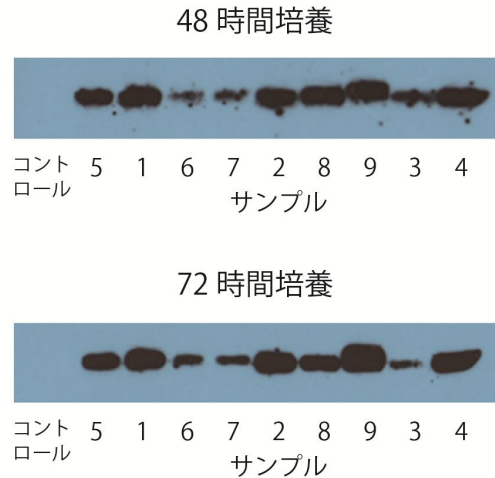


図3. 細胞内での各サンプルの存在量の比較

探索のため、上記4種類のサンプルとは異なるサイトを標的とするサンプルをさらに5種類作製した。計9サンプルの遺伝子活性化能の評価実験を同一条件で実施したところ、図1に示す結果が得られた。48時間、72時間培養後共に、サンプル7で以前のサンプル2よりも高い活性が見られ、標的遺伝子の発現を72時間培養後で8倍以上も活性化できることがわかった。また、この結果は、標的サイトのゲノム上の位置を反映しているように見え、ゲノムの上流からサンプルを並べ直すと、サンプル7を中心にして、そこからずればずれるほど活性化能が下がる傾向があることがわかった(図2)。

次に、上記の結果が単なるサンプルの存在量が多いためによるものではないことを確認するため、上記の9つのサンプルの細胞内での存在量を抗体を用いて解析し比較してみたところ、図3のような結果が得られた(このデータでは、図2と同様に、標的サイトのゲノム上流から順に左から右へサンプルを並べてある)。これを見るとわかるように、サンプル3, 6, 7の存在量が低かった。すなわち、サンプル7の存在量はほかのサンプルに比べて特に多いわけではなく、むしろ少ない傾向が見られた。したがって、細胞内での存在量が高なくても、図2に示されたように高い活性化能を示すことから、デザインした9サンプルの中で、サンプル7が最も活性化能が高いことを確認した。

(3) 目的の表現型の誘導条件の検討

作製したサンプルの目的の性能を評価するために、まず100%性能を発揮できた際の誘導能を評価するために、その基準の状態を知る必要があった。そのため、各種試薬を用いて、X細胞の表現型を誘導する条件の検討を行った。まず、今までに報告のあった、本も一般的に用いられている濃度での実験を行ってみた。誘導を開始してから2日後に表現型を維持する培地に交換し、5日後では目

的の表現型を示す細胞を見つけることはできなかった。しかし、さらに3日後観察してみると、目的の表現型を示す細胞を顕微鏡下で観察することができた。それをさらに確かめるために、表現型特異的に検出可能な染色を行うと、確かに染色されることを確認できた。同じ現象は、試薬無添加のコントロールでは見られなかった。

しかしながら、表現型を示す細胞の割合が文献値よりも低かったため、各種試薬を様々な濃度に変化させ、誘導条件の検討を行った。最高 60~70%まで誘導率を上げることができたが 20~30%と低い場合もあり、細胞の経代数にも依存しているようであり、まだ安定して高い誘導率を得られていない。今後さらなる改善を試みる予定である。

以上述べてきたように、今回新たにデザインしたサンプルで標的遺伝子発現を活性化することを確認できた。今後、目的の表現型を誘導する条件を様々に変えてみて、条件を最適化する予定である。現在、得られたサンプルを用いて目的の表現型を効率よく誘導できるよう、X 細胞へのサンプル導入条件の検討を行っているところである。今回作製したサンプルを元に、今後標的遺伝子を効果的に同定する手法の開発につなげていきたいと考えている。

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)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

世良 貴史 (SERA, Takashi)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 10362443

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし