

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：15101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25540134

研究課題名(和文) 遺伝子発現スイッチを有する哺乳類人工染色体ベクターの開発

研究課題名(英文) A multiple gene expression switch using a multi-integrase system on a mammalian artificial chromosome vector.

研究代表者

大林 徹也 (Ohbayashi, Tetsuya)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・准教授

研究者番号：80348804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：任意の遺伝子の交換・除去を可能にするため複数のインテグレースを用いたシステムを構築した。このシステムでは、認識配列の異なる3種の部位特異的組み換え酵素(インテグレース)を用いた。3種の発光遺伝子と3種の蛍光遺伝子を組み込んだ遺伝子カセットを作成して CHO細胞中のマウス人工染色体ベクターに導入した。このCHO細胞に3種のインテグレースを一過性に発現させた。インテグレースの発現により対象となる発光遺伝子が除去されて下流の蛍光タンパク質が発現する。インテグレースの発現をコントロールすることで、この細胞を最大7色に標識することができた。

研究成果の概要(英文)：Site-specific recombinases (SSR), such as Cre or Flp recombination target cassettes, have been successfully excised or inverted by a single SSR to regulate transgene expression. This study investigated the potential for expanding the multiple regulation of transgenes using three different integrase systems. We designed three excision cassettes that expressed luciferase, where the luciferase expression could be exchanged to a fluorescent protein by site-specific recombination. Each cassette that was regulated independently by a different integrase was connected in tandem and inserted into a mouse artificial chromosome (MAC) vector in CHO cells. By transient expression of integrase, the targeted luciferase activity was lost and fluorescence was activated. These results suggest that the combined use of these integrase systems in a defined locus on a MAC vector permits the multiple regulation of transgene expression and might contribute to genomic or cell engineering.

研究分野：合成生物学

キーワード：人工染色体ベクター インテグレース

1. 研究開始当初の背景

哺乳類における種々の生命現象を遺伝子や分子のレベルで検証するためには、検証に必要な遺伝子プログラムを構築し、必要な目的遺伝子を構築し(遺伝子工学) 遺伝子導入細胞/動物を作成(細胞工学、発生工学)することが重要であると考えている。そのためにはゲノム技術の進展が必要である。

読み: ゲノム配列を解読する

書き: ゲノム配列を化学合成する

そろばん: ゲノム配列情報を分析して新しい遺伝子配列をプログラムする

実際にプログラムした遺伝子を生物に導入(「入力」)して、プログラム通りに遺伝子が機能(「出力」)することを検証する必要がある。しかしながら、哺乳類動物では遺伝子情報を保存、入力、出力している染色体が極めて複雑に構成/制御されているため、通常は外部から新規に導入した遺伝子をプログラム通りに機能させることは極めて困難である。

ヒト人工染色体(HAC)ベクターは、遺伝子導入細胞や遺伝子導入動物作製に有効なアイテムである。研究代表者はHACベクターに複数の遺伝子を極めて効率よく導入できるマルチインテグレーションシステムの開発に成功した。このシステムは、従来法と比較して極めて効率よく遺伝子を導入できる、複数の遺伝子(最大5つ)をターゲット部位に導入できる、導入した遺伝子は極めて安定に発現するといった利点がある。このシステムはプログラム通りに遺伝子を機能させる細胞作製に有効なため、国外からの反響は高くシステム生物学分野の研究室との共同研究が開始している。また申請者らは、遺伝子導入マウス作成に有効な特徴をもつマウス人工染色体(MAC)ベクターの作製に成功し、2012年合成生物学の専門誌で発表した。

2. 研究の目的

本研究では、HACベクターに導入した外来遺伝子の発現を制御したり、導入した遺伝子の除去や交換ができるシステムを加えることを目的とする。

我々は、マルチインテグレーションシステムを活用して、HACベクターに導入した外来遺伝子を任意に交換できるシステムを構築した。マルチインテグレーションシステムの概要を下に示す。このシステムはファージが大腸菌ゲノムに挿入される際に利用される部位特異的組み換え酵素インテグラーゼを利用したシステムである。インテグラーゼには認識配列(attB, attP 配列)の異なる複数の種類が発見されている。この酵素を哺乳類細胞で機能するように改変し、かつヒト人工染色体ベクター上に5種類のイ

ンテグラーゼ認識配列を組み込んだプラットフォームを構築した。マルチインテグレーションシステムを用いると、人工染色体の特定部位に効率よく複数の遺伝子を導入できること、導入した遺伝子は安定かつ均一に発現することを明らかにし論文として発表している(Yamaguchi S., et al., **Pros One.**, 2011)。

マルチインテグレーションシステム

複数の遺伝子を効率よく染色体に導入することが可能
染色体の遺伝子をコンディショナルに欠損させることも可能

ファージが大腸菌ゲノムに挿入され際に利用される部位特異的組み換え酵素(Integrase)を用いたシステム

- ・不可逆的反応→Cre/loxPシステムより効率が高い
- ・認識配列の異なる5種のIntegraseを哺乳類細胞で機能するように最適化済(φC31 integrase, R4 integrase, TP901 integrase, Bxb1 integrase, φC1 integrase)

遺伝子情報のプログラムを「飛躍的」に発展させることができる

- ・複数遺伝子を導入することが可能
- 情報量がアップする
- ・導入した複数の遺伝子のうち、特定の遺伝子のみを削除できる。
- コンビネーション

ヒト人工染色体ベクターの特定部位に5つの遺伝子を導入することが可能

各インテグラーゼの発現をコントロールすることで、従来は不可能だった複雑な指示(プログラム)を細胞に与えることが可能になる。

このマルチインテグレーションシステムを活用し、人工染色体ベクター場に導入した複数の外来遺伝子を任意に交換できる新たなシステムを開発する。

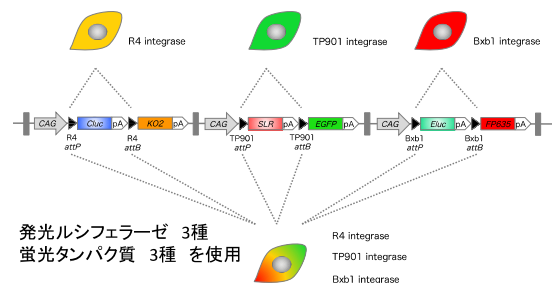
将来的には、本研究で開発したベクターはシステム生物学分野での Dry で構築した理論を Wet の実験で検証する際に極めて有効なアイテムになる。

3. 研究の方法

任意の遺伝子の交換・除去が可能なシステム

任意の遺伝子の交換・除去を可能にするため複数のインテグラーゼを用いたシステムを構築した。このシステムでは、3種の部位特異的組み換え酵素(インテグラーゼ)を用いる。3種の発光遺伝子と3種の蛍光タンパク質を組み込んだ遺伝子カセットを次に示す。

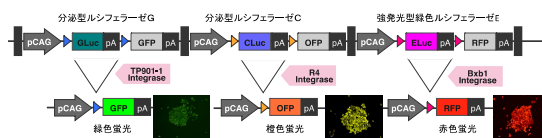
通常は3種の発光遺伝子が CAG プロモーターで発現している(-/-/-)。R4 インテグラーゼが機能すると、その認識部位に挟まれた Gluc 部分が除去されて EGFP が発現する(+/-/-)。TP901 インテグラーゼが機能すると、その認識部位に挟まれた Cluc 部分が除去されて OFP(橙色蛍光タンパク質)が発現する(+/-/-)。3種のインテグラーゼが同時に機能すると3色の蛍光タンパク質が発現する(+/+/+).



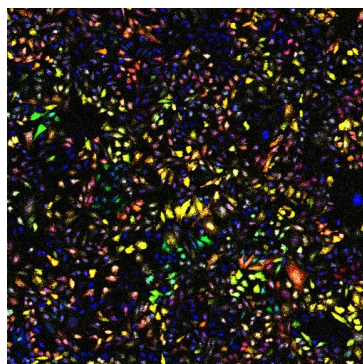
この遺伝子カセットを CHO 細胞のマウス人工染色体ベクターに導入した。この細胞に各インテグラーゼを発現させて、各レポーター遺伝子の交換の動作確認をした。

4. 研究成果

任意の遺伝子の交換・除去が可能なシステム



図に示した遺伝子カセットが搭載された人工染色体ベクターを有する CHO 細胞に対してルシフェラーゼアッセイを行ったところ基質が異なる 3 種の Luciferase (Cluc, Gluc, Eluc) による発光が観察された。各インテグラーゼをそれぞれ反応させると、図に示のように、緑色、橙色、赤色蛍光がそれぞれ観察された。3 つのインテグラーゼを同時に反応させた後、光る細胞を集めて共焦点顕微鏡で観察した。その結果、ルシフェラーゼの除去の状況により、様々な色の蛍光 (最大 8 色) が観察された。青色は DAPI による核染色である。



このシステムを活用すると、特定部位に導入した目的遺伝子を任意に除去したり交換することが可能になる。

従来の遺伝子改変細胞やマウスは、遺伝子を導入する、あるいは遺伝子を欠損させるといった単純なプログラムのものが主流であった。今回、開発した遺伝子交換・除去システムは、種々の生命現象を遺伝子や分子のレベルで検証するために必要な遺伝子プログラムの構築や実証に大いに貢献できると考えている。

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 9 件)

(1) Use of a Human Artificial Chromosome for Delivering Trophic Factors in a Rodent Model of Amyotrophic Lateral Sclerosis. Watanabe Y,

Kazuki Y, Kazuki K, Ebiki M, Nakanishi M, Nakamura K, Yoshida Yamakawa M, Hosokawa H, Ohbayashi T, Oshimura M, Nakashima K.

Mol Ther Nucleic Acids. 2015 Oct 6;4:e253. doi: 10.1038/mtna.2015.28. (査読有)

(2) Exploring new gene integration sites for gene knock-in by gene-trapping strategy.

Nanchi I, Yoshimura Y, Nakamura K, Masago Y, Ohbayashi T, Okuda T.

Transgenic Res. 2015 Jun;24(3):549-59. doi: 10.1007/s11248-015-9872-x. Epub 2015 Mar 31. (査読有)

(3) Mouse embryonic stem cells with a multi-integrase mouse artificial chromosome for transchromosomal mouse generation.

Yoshimura Y, Nakamura K, Endo T, Kajitani N, Kazuki K, Kazuki Y, Kugoh H, Oshimura M, *Ohbayashi T. *Transgenic Res*. 24(4): 717-727. 2015(査読有)

(4) Phenotype specific analyses reveal distinct regulatory mechanism for chronically activated p53.

Kirschner K, Samarajiwa SA, Cairns JM, Menon S, Pérez-Mancera PA, Tomimatsu K, Bermejo-Rodriguez C, Ito Y, Chandra T, Narita M, Lyons SK, Lynch AG, Kimura H, Ohbayashi T, Tavaré S, Narita M.

PLoS Genet. 2015 Mar 19;11(3):e1005053. doi: 10.1371 (査読有)

(5) Exploring the origin and limitations of kidney regeneration.

Endo T, Nakamura J, Sato Y, Asada M, Yamada R, Takase M, Takaori K, Oguchi A, Iguchi T, Higashi AY, Ohbayashi T, Nakamura T, Muso E, Kimura T, Yanagita M. (査読有)

J Pathol. 2015 Jun;236(2):251-63. doi: 10.1002/path.4514. Epub 2015 Mar 4.

(6) Highly sensitive luciferase reporter assay using a potent destabilization sequence of calpain 3.

Yasunaga M, Murotomi K, Abe H, Yamazaki T, Nishii S, Ohbayashi T, Oshimura M, Noguchi T, Niwa K, Ohmiya Y, Nakajima Y. (査読有)

J Biotechnol. 2015 Jan 20;194:115-23. doi: 10.1016/j.jbiotec.2014.12.004. Epub 2014 Dec

(7) Dual-color fluorescence imaging to monitor CYP3A4 and CYP3A7 expression in human hepatic carcinoma HepG2 and HepaRG cells.

Tsuji S, Kawamura F, Kubiura M, Hayashi A, Ohbayashi T, Kazuki Y, Chesné C, Oshimura M, Tada M.

PLoS One. 2014 Aug 7;9(8):e104123. (査読有)

(8) Latent TGF- β binding protein-2 is essential for the development of ciliary zonule microfibrils.

Inoue T, Ohbayashi T, Fujikawa Y, Yoshida H, Akama TO, Noda K, Horiguchi M, Kameyama K, Hata Y, Takahashi K, Kusumoto K, Nakamura T. *Hum Mol Genet.* 2014 Nov 1;23(21):5672-82. doi: 10.1093/hmg/ddu283. Epub 2014 Jun 6. (査読有)

(9) Repression of cyclin D1 expression is necessary for the maintenance of cell cycle exit in adult mammalian cardiomyocytes.

Tane S, Kubota M, Okayama H, Ikenishi A, Yoshitome S, Iwamoto N, Satoh Y, Kusakabe A, Ogawa S, Kanai A, Molkentin JD, Nakamura K, Ohbayashi T, Takeuchi T. *J Biol Chem.* 2014 Jun 27;289(26):18033-44. doi: 10.1074/jbc.M113.541953. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

(1) 招待講演:ゲノムプログラム&コントロールによる新しい遺伝子改変マウス、大林徹也、第5回 合成生物学シンポジウム、2015年8月5日、神戸大学統合研究拠点コンベンションホール(神戸市)

(2) 招待講演:染色体工学が切り拓いた新領域と医学・薬学応用への挑戦 鳥取大学 染色体工学研究センター研究成果発表会、大林徹也、キャンパスイノベーションセンター東京国際会議室(東京)、2014年2月21日

(3) 招待講演(シンポジウム):人工染色体ベクター導入発光マウス由来細胞を用いた毒性評価システム

大林徹也、日本実験動物代替法学会 第26回大会、京都テルサ(京都市)、2013年12月21日

〔図書〕(計1件)

(1) In vitro 毒性・動態評価の最前線 シーエムシー出版 監修: 小島肇夫, 発行年: 2013年、共著 174-181頁

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大林 徹也 (Tetsuya Ohbayashi)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・准教授

研究者番号: 80348804

(2) 連携研究者

中村 和臣 (Kazuomi Nakamura)

鳥取大学・生命機能研究支援センター・プロジェクト研究員

研究者番号: 90598137