

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660293

研究課題名(和文) ヒト染色体断片化による染色体外遺伝因子の新生と、革新的エピソームベクターの創成

研究課題名(英文) Generation of extrachromosomal elements by the human chromosome pulverization, and its applicaiton to the development of novel episomal vector

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：1) 齧歯類細胞中で、ヒト染色体の断片化により新たに生じた安定な染色体外因子(DM)は、多数のヒト染色体領域に由来する配列からなること、および、それぞれの領域は増殖制御に関連する重要な遺伝子を含むことが示された。さらに、そのようなDMは、がん細胞に見られるDMと同様な挙動を示すことが示唆された。2) ヒトゲノム由来のDMは、低酸素(3%)状態での培養で維持されやすくなり、低グルコース(0.5 g/l)では逆に不安定になることが示唆された。3) 複製開始の必要最短配列の逆位反復を用いることにより、効率的に染色体外因子を形成させる方法を見いだした。

研究成果の概要(英文)：1) We found that the extrachromosomal double minutes (DMs), which was generated by human chromosome pulverization, were derived from several human chromosomal regions where the genes important for cellular growth regulation reside. We also found that such DMs behaved just like the ones generated during human cell malignant transformation. 2) Human DMS was more stably maintained in hypoxic (3% oxygene) culture condition, whereas they were less stable in low-glucose (0.5 g/l) condition. 3) We developed a method to generate extrachromosomal elements by using the inverted repeat of a minimal-essential sequence for replication initiation.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：Extrachromosomal Gene amplificaiton Double Minutes Cell technology Episome vector

## 1. 研究開始当初の背景

動物細胞内で安定に維持されるエピソームベクターは、様々な研究領域で強く必要とされている。しかし、多くの研究者の努力にもかかわらず、ウイルス由来配列を用いた場合でしか作成できなかったために、限定的な利用しかできなかった。一方研究代表者は、がん細胞に見られる染色体外遺伝因子(DM)の安定性を支配する機構について理解を深めてきた。DMが存在することは、ヒトゲノム配列のみを使って安定なエピソームベクターを樹立することが可能である、ということを示唆している。また、そのような染色体外因子の細胞内動態と細胞外排出に関する我々が長年継続してきた研究は、ヒトゲノム由来のエピソームベクターを樹立する様々なノウハウを提供する。その際たるものは、哺乳動物複製開始領域(IR)と核マトリックス結合領域(MAR)を持つプラスミドが、哺乳動物細胞内で少なくとも短期間エピソーム状態で維持されたのち、直列反復からなる環状構造に多量体化されてDMを形成したり、それが染色体腕に組み込まれてBFBサイクルを起こすことによりHSRを生じることを見つけたことが挙げられる。このようなIR/MAR遺伝子増幅系は、遺伝子増幅の機構の解明や組換え蛋白質の製造に応用されてきた。さらに最近我々は、ヒト細胞を、DMを安定に維持できるマウス細胞と融合させると、ヒト染色体のみが断片化し、セントロメアもテロメアも持たずに安定なDMが新規に形成されることを見いだした。

## 2. 研究の目的

本研究では、我々が長年行ってきた「ヒトゲノム由来の染色体外因子の細胞内動態と細胞外排出」に関する知識、経験、遺伝子材料、細胞材料を駆使し、それを発展させるとともに、そのような基礎を利用して、ウイルス由来配列を用いずにエピソームベクターを作出することを目指す。また、がん化の原因となるDMの形成機構についても、本質的で明確な理解を得る。

## 3. 研究の方法

「4. 研究成果」欄に詳細を記したように、細胞に様々なDNAを導入したり、様々な細胞種を融合したりした後、様々な条件で培養し、得られた安定な細胞について、様々なプローブを用いたFISH法により解析した。また、一部の細胞からゲノムDNAを抽出してマイクロアレイ解析を行った。そのような多数の一連の実験を総合することにより、成果を挙げた。

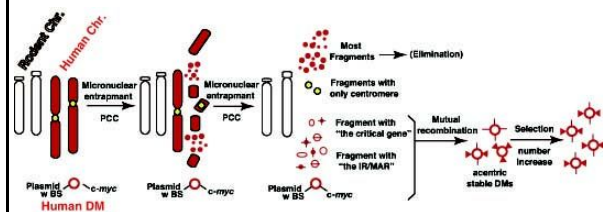
## 4. 研究成果

### 4-1. ヒト染色体の断片化により新たに生じたDMの由来と性状

我々は、ヒト細胞と齧歯類細胞を融合させると、ヒト染色体が特異的にPCCを生じて断片化すること、および、ヒト染色体の一部から

安定な染色体外因子が形成されることを見いだしていた。本計画では、このようなDMの形成と性状を理解する研究を行った。すなわち、ヒト染色体が断片化することにより生じた「セントロメアもテロメアも無いが安定に分配される染色体外遺伝因子(new DM)」を多数持つマウス細胞について、このような細胞をクローン化し、Alu-probe, plasmid probe, c-myc probe等を用いたFISHを行うことにより、new DMの細胞内動態を検討した。その結果、マウスMEF細胞内で、Alu(+)<sup>+</sup>のヒト由来配列が、DMでのみ検出されるような融合細胞クローンを多数得ることができた。このようなDMは、c-myc(+)<sup>+</sup>のもの(-)<sup>-</sup>のものがあつたが、ともに新たに形成されたDMであることが示唆された。このような新規DMは、ヒトがん細胞に見られるDMと同様と同様に、分裂期染色体に付着することにより細胞分裂の過程で安定に分配され、ヒトがん細胞に見られるDMと同様に、DNA傷害を受けると凝集して微小核を形成したことから、両者が同様な細胞内動態を示すことが示唆された。

このようにして得られた、Alu(+)<sup>+</sup>/c-myc(-)<sup>-</sup>であるDMを持つマウス細胞クローンから、ゲノムDNAを抽出し、ヒトマイクロアレイにハイブリして検討した。その結果、解析した3クローンの全てについて、8q24, 7p15, 13q21がクローンごとに異なる程度で検出されたほか、5p15, 6p25がクローン特異的に検出された。これらの殆どは、もともとのヒト細胞が持っていたDMで増幅している領域とは一致しなかったことから、新たに生じたDMであることが強く示唆された。重要なことに、これらの染色体領域には、増殖関連の遺伝子であつてがん細胞の悪性化の際



に遺伝子増幅することが知られている遺伝子が局在していた。一方、8q24はc-mycが局在し、ヒトがんで頻繁に増幅する領域であるが、クローンのマイクロアレイでは8q24のc-myc以外の領域が増幅していた。このことから、8q24のc-myc以外の領域にDMとして細胞内で維持されるのに必要な配列が局在している可能性が示唆された。

### 4-2. ヒトゲノム由来・染色体外因子の安定保持に与える、低酸素と低グルコースの影響

生体内のがん組織ではDMをもつ細胞の割合が高いのに対し、そのようながん細胞を長期間培養すると、HSRをもつ細胞が多くなることが知られている。このことは、生体内では

低酸素 (Hypoxia) や、低グルコースになることが多いことと関連している可能性がある。そこで本研究では、酸素濃度やグルコース濃度が遺伝子増幅に及ぼす影響を検討した。

ヒト大腸がん COLO 320DM 細胞、および、蛋白質医薬品の製造に汎用されている CHO DG44 細胞を用いた。このような細胞に d2EGFP 発現カセットを持つ IR/MAR プラスミドを導入し、薬剤選択によって安定な形質転換体を得る過程で様々な低酸素条件下で培養を行った。その結果、両方の細胞ともに、低酸素環境下で培養を行うことにより、形質転換したコロニー数が大きく増加した。そのような細胞について、FISH 法により導入したプラスミド由来の配列を検出した。その結果、CHO DG44 細胞では、酸素濃度 20% では約 6 割の細胞で全く増幅構造が検出されなかったが、低酸素にすることにより、小さな HSR がほぼ全ての細胞に見られた。重要なことに、低酸素によって、多数の DM が形成されることが見いだされた。このような場合に、GFP の発現は増加しており、それは特に長期培養した場合に顕著だった。また、低酸素培養した細胞からは、効率よく発現の高いクローンが得られた。一方、COLO 320DM 細胞では、低酸素培養により、形成された HSR が小さくなり DM の見られる細胞の頻度が高くなるとともに、GFP の発現量が高くなった。

COLO 320 細胞で、IR/MAR プラスミドにより既に大きな HSR が形成されている clone 22 細胞について低酸素培養すると、HSR が少なくなり、DM を持つ細胞が出現し、増幅配列が取り込まれている微小核が増加したことから、HSR が DM へと分断化したことが示唆された。

大腸がん発がんの過程で *c-myc* を含む領域が増幅して DM や HSR を形成した天然 DM 株 (COLO 320 DM 株 #3) と天然 HSR 株 (COLO 320 HSR 株 #21)、および、IR/MAR プラスミドで人工的に遺伝子増幅をおこした人工 DM 株 (COLO 320 cl.12) と人工 HSR 株 (COLO 320 cl.22) を用いた。HSR 株のみ、および、DM 株と HSR 株を等量混ぜた細胞を、通常酸素 (20%) と低酸素 (3%)、通常グルコース濃度 (2 g/l) と低グルコース濃度 (0.5 g/l) を組み合わせた 4 種類の条件で培養した。その際、細胞の増殖曲線を書いてモニターしながら、45 日程度まで培養を行った。培養の 1~2 週間ごとに染色体標本を調製し、*c-myc* cosmid あるいは IR/MAR プラスミドから調製したプローブで FISH を行って解析した。その結果、低酸素や低グルコースによって長い HSR が検出された細胞が減少し、小さな HSR がより多くの細胞で検出された。この結果から、これらの条件が HSR の分断化に影響を及ぼす、ということが示唆された。人工 DM 株と人工 HSR 株を用いた実験において、44 日の培養期間で一貫して、低酸素で培養した細胞の方が高い頻度で DM が検出された。一方、44 日の培養

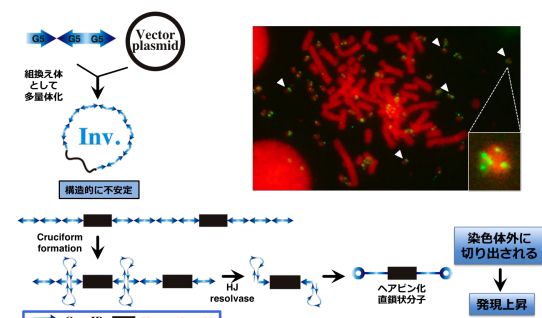
期間で一貫して、低グルコースで培養すると、より長い HSR を持つ細胞の割合が高くなっていった。これは人工 HSR 株だけの培養、人工 DM 株と人工 HSR 株を混ぜて培養したもの、両方で同じ結果が得られた。

これらの結果から、低酸素では染色体外の DM が多くなり、低グルコースによって HSR が長くなることが示唆された。

#### 4-3. 複製開始の必要最短配列の逆位反復を用いることによる、染色体外因子の形成

複製開始配列 IR の中で、遺伝子増幅のために必要最短な配列として G5 配列を、我々は以前の研究で単離していた。この配列を試験管の中で直列反復、あるいは逆位反復となるように連結した。これを core IR repeat DNA と称する。一方、pKV-AR1 プラスミドは、BS 耐性遺伝子、d2EGFP 遺伝子、及び、MAR 活性を示す AR1 配列をもつ。このようなプラスミド DNA を、G5 repeat DNA と混合し、ヒト COLO 320DM 細胞、あるいは、ハムスター CHO DG44 細胞株ヘリポフェクションで同時導入し、プラストサイジンで 4 週間選択することで、ポリクローン性の安定形質転換体を得た。一方、MAR 活性を持つ AR1 配列を、ベクター側ではなくリピート側に配置することを検討するために、G5AR1 repeat と pKV プラスミドの組み合わせについても、同様に検討した。このような実験の対照群として、リピートの形に連結していない G5 断片、大腸菌 phage DNA 由来の配列のリピートや、ベクター単独 (pKV、pKV-AR1)、および、標準的な IR/MAR プラスミドである pG5、pΔBM-d2EGFP をコントロールとして用いた。

Core IR repeat を用いるとベクター単独に比べて圧倒的に高い形質転換効率を示した。これは、形質導入初期で導入 DNA が染色



体外で維持されることを示唆している。また、COLO 320DM 細胞株の安定形質転換細胞で、導入配列を FISH で検出すると、direct repeat では HSR が、inverted repeat では染色体外の DM や微小なエピソードである ETE が主だった。Inverted repeat は、容易に cruciform 構造を形成し、それが Holiday junction resolvase により切断されると末端がヘアピンである直鎖状分子が生じる。そのため、上記の結果は、ヘアピン化 IR/MAR プラスミドを細胞に導入すると ETE が形成されたという先行研究の結果と符合していた。さらに、G5



repeat、特に inverted repeat を含む増幅配列は、微小核中に高頻度に取り込まれていた。このことは、このような repeat 配列が実際に断片化しやすいことを示唆していた。

#### 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)

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).

[学会発表](計 10 件)

【第 67 回日本生物工学会大会(鹿児島)】

2015 年 10 月 27 日

2P-250 IR/MAR 遺伝子増幅法による組換え蛋白質生産 清水 典明, 大崎 究, 福間 美樹

【第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会 合同大会; BMB2015】

2015 年 12 月 1 日~4 日

2P-0909; 哺乳動物複製開始配列の直列あるいは逆位反復配列を用いることによる、高発現環境での遺伝子増幅系 大崎 究, 清水 典明

2P-0910; サイレンシングを受けやすい反復配列からの、遺伝子発現を高めるヒトゲノム配列の単離と解析 福間 美樹, 元明 優人, 三浦 理, 大山 隆, 清水 典明

2P-1079; 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、カプール リタ、宇谷 公一、清水 典明

3P-0612; 染色体外遺伝因子に特徴的なクロマチンのエピジェネティック状態 満田 祥平, 清水 典明

#### (第 37 回日本分子生物学会)

2014 年 11 月 25 日~27 日 **パシフィコ横浜**

1P-0212; 染色体外遺伝因子と染色体との間で、\_同じ反復配列のエピジェネティック状態はどのように異なるのか? 満田 祥平, 清水 典明

2P-0927複製開始配列の逆位反復配列を用いることによる、動物細胞内で安定なエピソームの形成 大崎 究, 清水 典明

2P-0928; サイレンシングを受けやすい反復配列からの遺伝子発現を高めるヒトゲノム配列の単離と解析 福間 美樹<sup>1</sup>, 元明 優人, 大懸 俊廣, 三浦 理, 大山 隆, 清水 典明

3P-0777; ヒト染色体に由来する自律複製する染色体外遺伝因子の、細胞内維持、排出と細胞間伝播 坂丸 直人, 浪花 修平, R\_i\_t\_a\_ \_K\_a\_p\_o\_o\_r\_, 宇谷 公一, 清水 典明

3P-0778; 染色体外での遺伝子増幅とゲノム不安定性に与える低酸素環境の影響 山田 拓, 小塩 結里恵, 清水 典明

[図書](計 件)

[産業財産権] 出願状況(計 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 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
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

清水 典明 (SHIMIZU NORIAKI)

広島大学・大学院生物圏科学研究科・教授

研究者番号：10216096

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：