

氏名	あやべふみあき 綾部文明
学位の種類	博士(再生医科学)
学位記番号	甲第2号
学位授与年月日	平成18年 3月10日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	A novel expression system for genomic DNA loci using a human artificial chromosome vector with transformation-associated recombination cloning (TARクローニング法を用いたヒト人工染色体ベクターにおけるゲノムDNA領域の新規発現システム)
学位論文審査委員	(主査) 佐藤健三 (副査) 押村光雄 林真一

学位論文の内容の要旨

TAR(Transformation-associated recombination)クローニング法はある遺伝子領域を環状ゲノムDNA分子として選択的に単離するための簡便な方法として開発された。この方法により目的とする Mb サイズのゲノムDNA断片を単離できるようになったが、こうして単離したゲノム領域を安定に保持・発現させる方法は未だない。近年我々はヒト人工染色体(HAC)ベクターを開発した。HACベクターには外来遺伝子の正常な発現を保持するためにloxPサイトを付加している。本研究では、TARクローニング法により単離したゲノムヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシル転移酵素(HPRT)遺伝子をHACベクターに組み込むことによって安定に発現させる新規のゲノム遺伝子発現システムを構築することを試みた。

方法

共同研究者である Vladimir らが構築したゲノムHPRT遺伝子を含む環状酵母人工染色体(HPRT-YAC)にloxPサイトを付加した。HACベクターを保持するハムスターCHO細胞においてHPRT-YAC/loxPとCre組み換え酵素発現ベクターを共導入することによりHPRT-HACを構築した。目的の組み換え体はG418薬剤耐性能を獲得するよう設計した。得られたG418耐性株をPCR、サザンブロット、蛍光in situハイブリダイゼーション(FISH)により選別し、RT-PCR、HAT選択により発現機能解析を行った。

結果

HPRT-YACにhCMVプロモーターとloxPサイトを付加するために、出芽酵母の相同組み換

え能を利用して YAC をバクテリア人工染色体(BAC)に変換する BRV1 ベクターを改変し、BRV1-hCMV/loxP を構築した。酵母内選択マーカである URA3 を有する改変 BRV1 ベクターを HPRT-YAC を保持する酵母細胞に提示した。SD-His プレート/SD-Ura プレートで生育し、SD-His+5FOA プレートで死滅する目的のクローンを 17 株得た。HPRT 遺伝子内のイントロン 1、エクソン 2 とエクソン 9 を増幅する PCR 解析により HPRT の 5'、3' 領域が保持されていることを確認した。環状 HPRT-YAC を保持する酵母細胞に 100Gy の放射線を 30 分間当てて線状化し、パルスフィールドゲル電気泳動を行った。ヒト DNA 特異的配列である Cot-1 をプローブとして用いてサザンブロットを行い、環状 HPRT-YAC が改変を行う前の約 100kb サイズであることを確認した。また HPRT-YAC を制限酵素 EcoRI で消化しパルスフィールドゲル電気泳動することにより 17 クローン中 15 クローンが HPRT 全長を含む目的の組み換え体であることを確認した。得られた HPRT-YAC/BAC を大腸菌内で大量生成した。

我々が構築した 21 Δ qHAC ベクターを保持する CHO 細胞は内因性の Hprt 遺伝子を有する。外来性のヒト HPRT 遺伝子を導入し発現検討と機能解析を行うため、6-TG (チオグアニン) により HPRT 変異株を 16 クローン得た。すべてのクローンについて HAT 耐性能を確認し、FISH 解析により HAC ベクターが独立して存在している Δ H1 と Δ H2 を用いて実験を行った。

HAC ベクターを保持する Hprt 欠損 CHO 細胞に HPRT-YAC/BAC と Cre 組み換え酵素発現ベクターを導入し、G418 選択を行った。32 クローンの G418 薬剤耐性株についてネオマイシン再構築、イントロン 1 とエクソン 9 を増幅する PCR により、目的のバンドパターンを示す 18 クローン(56%)を得た。任意に選んだ一部のクローンについて RT-PCR により mRNA レベルで HPRT の発現を確認した。また FISH 解析を行い HPRT-HAC が 1 コピーで独立して存在することを確認した。任意に選んだ一部のクローンについて間期核、分裂中期像における HPRT-HAC を数え、安定に保持されていることを確認した。

考 察

多くのクローンで環状 DNA を改変しても効率よく目的の組み換え体を獲得できることが示された。染色体移入効率自体はウイルスベクターに比べると非常に低いので今後染色体移入効率向上を目指す。これまでに HAC ベクターの有用性を示すいくつかの実験を行ってきたが、ゲノム DNA を導入する最大の利点は複数のアイソフォームを発現できることにあり、今後の課題である。

結 論

本研究によりはじめて我々が構築した HAC ベクターにおけるゲノム遺伝子発現を mRNA・タンパクレベルで確認できた。また遺伝子欠損細胞における機能相補実験をゲノム DNA により確認でき、HAC ベクターに導入した 100kb サイズの DNA が正常に発現することを示した。これらの結果により HAC ベクターは今後遺伝子治療の分野でスタンダードベクターとして用いられる可能性を持っている。

審査結果の要旨

本研究は、TAR クローニング法により単離したゲノム HPRT 遺伝子を HAC ベクターに組み込むことによって安定に発現させる新規のゲノム遺伝子発現システムを構築したものである。従来の cDNA 発現では不可能だったスプライシングバリエーションの発現と生理的発現量を可能とする基盤研究とみなされる。環状 HPRT-YAC を HAC ベクターに導入するとネオマイシン遺伝子の再構築がおり、G418 選択により耐性株 32 クローンを得た。うち目的の組換え体は 18 クローン (56%) であり、HPRT を導入した HAC ベクターは宿主染色体とは独立していることを確認した。また、目的の組換え体において HPRT が正常に発現していることを RT-PCR により確認した。本論文の内容は、従来の遺伝子導入では困難なゲノム遺伝子導入の有用性を示唆するものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。