

平成22年9月

阿部智志 学位論文審査要旨

主査 佐藤 建三
副主査 岡田 太
同 押村 光雄

主論文

Localization of an hTERT repressor region on human chromosome 3p21.3 using chromosome engineering

(染色体工学技術を用いたヒト染色体3p21.3上hTERT抑制領域の同定)

(著者：阿部智志、田中宏美、野津智美、堀家慎一、藤崎央子、Dong-Lai Qi、大平崇人、David Gilley、
押村光雄、久郷裕之)

平成22年 Genome Integrity 1巻 論文番号6

学 位 論 文 要 旨

Localization of an hTERT repressor region on human chromosome 3p21.3 using chromosome engineering

(染色体工学技術を用いたヒト染色体3p21.3上hTERT抑制領域の同定)

テロメラーゼは染色体末端のテロメア配列を付加する機能をもつリボ核タンパク複合体酵素である。テロメラーゼ活性はヒトにおいて生殖細胞や幹細胞で検出され、体細胞ではほとんど検出されないことから、発生・分化において厳密に制御されていることが知られている。テロメラーゼの再活性化は発がんに寄与することが知られており、特にその触媒酵素であるヒトテロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)の再発現および異常な発現上昇が発がんの主な起因として考えられている。しかし、hTERT発現制御メカニズムは詳細に解析されておらず、この制御機構の解明は発生、老化、発がんメカニズムの理解に貢献することが期待されている。

以前染色体導入技術より、ヒト3番染色体導入が腎がん細胞株のテロメラーゼ活性を抑制し、この抑制効果がhTERT転写抑制によるものであることが示され、ヒト3番染色体上にテロメラーゼを抑制する因子が存在することが示唆された。これまでに、抑制因子の同定を目的として、染色体欠損領域マッピングやランダムに断片化した染色体導入が行われたが、未だ同定に至っていない。この因子の同定はメカニズム解明の重要ステップであり、ヒト3番染色体上テロメラーゼ抑制因子同定のための新たなアプローチの確立が必要とされている。

本研究において、染色体改変技術を主とした染色体工学技術を用い、テロメラーゼ抑制効果検証に有用な改変細胞株を樹立し、より正確なテロメラーゼ抑制領域の同定を試みた。

方 法

相同組み換えが高頻度にかかるニワトリB細胞を用いて、相同組み換えにより特定の領域を除いた3種の異なるヒト3番染色体断片を作製した。ゲノムPCRおよび蛍光 in situ ハイブリダイゼーション(FISH)解析により目的の改変が行われていることを確認した。微小核細胞融合法により、ヒト3番染色体および各種改変染色体断片をニワトリB細胞から微小核細胞形成率の高いマウスA9細胞に移入した。染色体移入はFISH解析により確認した。次に、レトロウイルスベクターを用い逆転写RT-PCRで内在性hTERTと区別可能な外来性hTERTを発

現するヒト腎がん細胞株を作製した。外来性hTERT発現細胞株にマウスA9細胞からヒト3番染色体および改変染色体断片を導入し、内在hTERT抑制効果を逆転写PCRにより検証した。ヒト3番染色体、各改変染色体断片を保持するマウスA9細胞において、ゲノムPCR解析を行い、それぞれの染色体保持領域を確認した。

結 果

ゲノムPCRおよび、FISH解析の結果、各種改変染色体において目的の領域で組み換えが行われていることを確認した。FISH解析の結果マウスA9細胞において移入されたヒト3番染色体および各種改変染色体を確認した。外来性hTERT発現ヒト腎がん細胞株において、外来、内在のhTERTが逆転写RT-PCRで区別可能であることを確認、テロメラーゼ活性の検証から、外来性hTERTは機能的であることを確認した。改変細胞株へのヒト3番染色体導入により、内在性hTERTが抑制されても外来性hTERTは発現していることを確認した。各種改変染色体の導入の結果、ヒト3番染色体3p21.3領域保持する改変染色体はhTERT抑制効果を示すのに対し、この領域を含まない改変染色体は抑制効果を示さなかった。

考 察

ニワトリB細胞において相同組み換えにより効率的に目的のヒト3番染色体断片を作製することができた。3番染色体導入によるhTERT抑制効果により、腎がん細胞株はテロメラーゼ活性を失いテロメア長依存的な老化誘導を避けられず、早期に増殖を停止する。そのため解析に十分な染色体導入細胞クローンと細胞数が得られず、このことがhTERT抑制効果検証およびその後の解析の障壁となっていた。本研究において、外来性hTERT発現の補足により、内在性hTERTが抑制されてもテロメラーゼ活性は維持されることで細胞は老化に至らず増殖を続け、抑制効果検証に十分な細胞クローン数、細胞数を得ることが可能となった。特定の領域を削った改変染色体断片導入を行った抑制効果検証により、ヒト3番染色体3p21.3上7.0Mbの正確なhTERT抑制領域を同定した。

結 論

本研究はヒト3番染色体上テロメラーゼ抑制領域情報を与えるとともに、樹立した外来性hTERT発現細胞株を抑制効果検証の基盤とし、染色体工学技術を用いて今後さらなる改変染色体断片作製、ヒト人工染色体ベクターを用いた候補領域ゲノム導入による検証を行うことでテロメラーゼ抑制因子同定への展開が期待される。