

平成23年3月

# 山口繁幸 学位論文審査要旨

主査 佐藤 建三  
副主査 押村 光雄  
同 岡田 太

## 主論文

A method for producing transgenic cells using a multi-integrase system on a human artificial chromosome vector

(ヒト人工染色体ベクターに搭載したマルチインテグラーゼシステムを用いた遺伝子導入細胞作製法の開発)

(著者：山口繁幸、香月康宏、中山祐二、難波栄二、押村光雄、大林徹也)

平成23年 PLoS ONE 掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

A method for producing transgenic cells using a multi-integrase system on a human artificial chromosome vector

(ヒト人工染色体ベクターに搭載したマルチインテグレースシステムを用いた遺伝子導入細胞作製法の開発)

外来遺伝子を発現する細胞を作製することは、遺伝子の機能解析をはじめとする医学・生物学分野の研究にとって極めて重要である。現在、目的の遺伝子を発現する細胞を取得するためには、染色体へのランダムインテグレーションを利用した方法が広く用いられている。しかしながら、挿入部位による染色体の位置効果や挿入されるコピー数の違いにより、細胞クローン間で遺伝子の発現レベルに大きなバラつきが生じる。そこで、ファージのインテグレースを利用した染色体上の特定部位への遺伝子導入法が考案されてきた。近年では、 $\Phi$ C31インテグレースをはじめとする複数種のインテグレースが発見され、in vitro及びin vivoでの遺伝子導入が可能であることが報告されている。

また、ヒト人工染色体 (human artificial chromosome : HAC) ベクターは、従来の遺伝子導入システムと比較して多くの優れた特徴を持っていることが報告されてきた。本研究では、複数種のインテグレースとHACベクターを組み合わせ、multi-integrase HAC (MI-HAC) システムを開発した。この新規の技術を用いて、複数種のインテグレースの部位特異的組換え効率を比較するとともに、遺伝子導入細胞の作製についても検討を行った。

## 方 法

Multisite Gateway技術により、4つのインテグレース ( $\Phi$ C31、R4、TP901-1、Bxb1) の認識配列とFRT配列をもったマルチインテグレースプラットフォームを構築した。それをHACベクター上にCre/loxPシステムにより導入し、HAT耐性クローンを得た。MI-HACシステムの稼働を確認するために、MI-HACベクターを保持する細胞へ、各組換え酵素の認識配列とNeo耐性遺伝子、EGFP遺伝子を持つプラスミドを、インテグレース発現ベクターと共導入し、G418耐性クローンを得た。また、微小核細胞融合法により、MI-HACベクターをマウスA9細胞に移入してhygro耐性クローンを取得し、 $\Phi$ C31インテグレースの活性を検証した。

## 結 果

- (1) MI-HACベクターの構築

PCR解析により、50%のHAT耐性クローンでMI-HACベクターの構築が確認できた。

#### (2) インテグレースによる部位特異的組換え効率の算出

インテグレース依存的な薬剤耐性コロニーの取得率は、FLPeを用いたときと比べて約6~25倍高い取得率を示した。また、得られたクローンの約40~94%でMI-HACベクター上の標的部位で部位特異的組換えが起きていることを確認した。この組換え効率はFLPe(約17%)と比較して高かった。また、これらのクローンについてFISH解析したところ、ほぼ全てのクローンでMI-HACベクター上にシグナルが観察できた。

#### (3) 遺伝子導入細胞取得効率の検討

MI-HACベクターを用いてGFP発現細胞を取得し、フローサイトメトリーにより解析したところ、各インテグレースによるGFP陽性細胞の取得率は約71~90%であり、ランダムインテグレーションによる方法(約60%)と比較し、大きな差はみられなかった。しかし、ランダムインテグレーションにより得られたコロニーの約90%において、一部の細胞でGFP発現が減少あるいは消失しているヘテロな状態であったのに対して、MI-HACベクターを用いた場合では、約77~88%のコロニーで比較的均質なGFP発現を示した。

#### (4) MI-HACベクターのマウスA9細胞への移入及びΦC31インテグレースの作用

PCR及びFISH解析を行い、hygro耐性クローンでMI-HACベクターを保持していることを確認した。また、CHO細胞のときと同程度のGFP陽性細胞を取得できた(約93%)。

## 考 察

MI-HACベクターの構築と、その機能について検証した。インテグレースによる組換え効率は、広く使用されているFLPeと比較して高かったことから、インテグレースは遺伝子の導入に適していると考えられる。また、MI-HACベクター上にEGFP遺伝子を導入して得られたコロニーでは、均質な発現を示すコロニーが多かった。これは、MI-HACベクター上の特定箇所に遺伝子が導入され、挿入部位の位置効果を受けにくいためではないかと考えられる。また、MI-HACベクターがマウスA9細胞に移入でき、A9細胞においてもΦC31インテグレースが機能したことは、様々な細胞でMI-HACシステムが使用できる可能性を示唆している。

## 結 論

本研究では、複数種のインテグレースとHACベクターを組み合わせることで、MI-HACシステムを構築した。このシステムは、既存の技術に比べ、様々な細胞で高効率に部位特異的組換えが起き、質の良い遺伝子導入細胞を容易に取得できる方法であると考えられる。