

|          |   |
|----------|---|
| 氏名       | かとう もとのぶ<br>加藤基伸  |
| 学位の種類    | 博士（生命科学）  |
| 学位記番号    | 乙第13号   |
| 学位授与年月日  | 平成16年11月25日   |
| 学位授与の要件  | 学位規則第4条第2項該当  |
| 学位論文題目   | Construction of a novel human artificial chromosome vector for gene delivery<br>(遺伝子導入のための新規ヒト人工染色体ベクターの構築) |
| 学位論文審査委員 | (主査) 佐藤建三<br>(副査) 押村光雄 箸本英吉   |

## 学位論文の内容の要旨

ヒトを含む哺乳動物細胞に目的の遺伝子を導入し構成的に発現する株を得るには、導入遺伝子が宿主細胞の染色体上にランダムに挿入された株を多数取得し、その中から適切な発現を示す株を選別する方法がとられてきた。というのも、染色体上への遺伝子挿入は、導入された遺伝子と受容細胞の両者に影響を及ぼすからである。宿主染色体上に編集されている遺伝子と制御配列の「文脈」は、外来遺伝子の挿入により破壊され、一方で挿入された外来遺伝子の転写は染色体上の「位置効果」により制御される。また挿入される外来遺伝子のコピー数も予測できないため、遺伝子導入した細胞株ごとに発現量が異なる。こうした従来法の問題点を解決しうるベクターとしてヒト人工染色体の利用が提案されてきたが、未だ実用的なシステムは構築されていない。

本研究では、ヒト21番染色体から染色体改変技術を用いて長腕、短腕上にある不要な遺伝子を削除し、Cre/loxPシステムの応用により環状DNAが挿入できる新規HACベクターの構築を試みた。

## 方法

受容細胞から供与細胞への染色体移入は、微小核細胞融合法により行った。染色体改変は他の細胞株と比べ高い相同組換え能を示すトリ B 前駆細胞株 DT40 に於いて行った。GenBank データベースに登録されているゲノム DNA 配列情報に基づいて短腕、長腕削除ならびに loxP 配列挿入のための組換え標的配列を設定し、それぞれハイグロマイシン、ピューロマイシン、ブラストサイジン耐性遺伝子により標識したターゲティングコンストラクトを作製した。短腕、長腕削除用コンストラクトには、約 1kb のテロメア配列を組み込んだ。DT40 雑種細胞へのトランスフェクションの後薬剤耐性コロニーを単離し、DNA 解析 (PCR およびサザンブロット) により相同組換え体を選

別した。さらに染色体 FISH 解析により染色体の短縮を確認した。改変染色体は中間宿主である CHO 細胞株を介してヒト線維肉腫由来細胞株 HT1080 に移入した。

## 結 果

ヒト21番染色体から長腕遠位を削除し、セントロメア近傍にloxPサイトを導入した21ΔqHACと、さらに短腕遠位を削除した21ΔpqHACを構築した。染色体改変が設計通り行われたことは、PCRおよびサザンブロットによるDNA解析により確認した。これら21HACベクターをHT1080細胞株に移入し、選択薬剤非添加の条件で100世代まで長期培養したところ、安定に保持されることが示された。セントロメア機能に必須であるセントロメアタンパク質-A、-B、-Cについて蛍光免疫組織化学染色を行ったところ、内在の21番染色体と同様セントロメアタンパク質群の集合が観察されたことから、染色体遠位の削除はセントロメア構造に影響しないことが示された。HACベクター上にはプロモーター抜きのneo遺伝子、導入する環状の遺伝子発現コンストラクト上にはCMVプロモーターを配置し、loxP配列間の部位特異的組換え挿入反応によりneo遺伝子が再構成される設計とした。21HACベクターを保持するHT1080細胞にEGFP蛍光タンパク質遺伝子発現コンストラクトとCre酵素発現プラスミドをトランスフェクションし、G418耐性株を単離した。サザンブロットにより相同組換え体であることを確認したのち、選択薬剤非添加の条件で30日間継代培養したところ、蛍光顕微鏡下で観察されるEGFPの発現量は一定であり、HACベクターに挿入された遺伝子の発現が長期間一定に維持されることが示された。

## 考 察

プラスミドDNAをトランスフェクションする従来の遺伝子導入法と比較して、染色体移入の手順は多少煩雑である。しかし分裂限界を示さない細胞株に対しては（マウス胚性幹細胞を含み）実験的に十分適用可能であることが示されてきた。本研究でも21HACベクターがDT40からCHOを介してHT1080細胞に移入可能であった。移入効率は前者で $10^{-7}$ 、後者で $10^{-6}$ 程度と、従来の実績に匹敵する値であった。将来的なヒト遺伝子治療への応用を想定すると、HACベクターを分裂寿命が有限の初代培養細胞あるいは成体由来体性幹細胞に移入するには、効率の向上が課題である。このため現在、微小核を高率に生成する宿主細胞の選別、HACを含む微小核細胞を選択的に蛍光標識し、フローサイトメーターにより分取する方法の開発、微小核細胞と受容細胞の融合法など、個々の手順について改善を検討している。

## 結 論

本研究により、不要な遺伝子を殆ど含まず、ヒト細胞株で染色体外に安定に保持され、外来DNAを単一のクローニングサイトに挿入でき、挿入された遺伝子が安定に発現可能な、新規のHACベクター系が構築できた。本ベクター系は、哺乳動物細胞に対する遺伝子導入による機能解析に対し有効であると考えられる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は染色体工学の技術を用いてヒト染色体を自在に改変し、これを遺伝子導入用ベクターとして利用する方法について検討したものである。その結果、余分な遺伝子を含まず、環状DNAが挿入でき、ヒト細胞において安定に保持され、導入した遺伝子が構成的に発現される新規ヒト人工染色体ベクターが構築された。本論文の内容は、培養細胞において遺伝子機能解析研究を行う幅広い分野で、ヒト人工染色体ベクター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。