

平成22年9月

高橋祐介 学位論文審査要旨

主 査 林 眞 一
副主査 押 村 光 雄
同 佐 藤 建 三

主論文

Development of evaluation system for bioactive substances using human artificial chromosome-mediated osteocalcin gene expression.

(ヒト人工染色体を介したオステオカルシン遺伝子発現による生理活性物質評価システムの開発)

(著者：高橋祐介、辻咲織、香月康宏、野口誠、有福一郎、梅林志浩、中西友子、押村光雄、佐藤建三)

平成22年7月 The Journal of Biochemistry 148巻 29頁～34頁

学 位 論 文 要 旨

Development of evaluation system for bioactive substances using human artificial chromosome-mediated osteocalcin gene expression

(ヒト人工染色体を介したオステオカルシン遺伝子発現による生理活性物質評価システムの開発)

機能性食品等の生理活性評価において、機能性成分のモデル動物や培養細胞への投与後、生理的、病理的効果検討、ヒトでの疫学的調査などが行われてきた。本研究では、骨粗鬆症予防のために、骨芽細胞における骨形成活性を評価する目的で、骨形成過程で発現するオステオカルシン遺伝子をレポーター遺伝子である緑色蛍光タンパク遺伝子 (GFP) 発現により評価しようと試みたものである。そこで、ヒト人工染色体 (HAC) ベクターを用いてオステオカルシン遺伝子発現をレポートする新規の細胞株を樹立し、活性化ビタミンDへの応答確認、および水産物の評価を実施した。HACベクターは、利点として1) 宿主染色体に挿入されず独立したミニ染色体として維持される (宿主遺伝子の変異やがん化の懸念がない)、2) 一定のコピー数で長期間安定に保持される (過剰発現、発現消失の懸念がない)、3) 導入可能なDNAの長さの制限がない (正常な発現制御を保証するDNAエレメントを含む遺伝子や複数遺伝子を同時に導入可能) という従来の遺伝子導入ベクターにはない多くの特徴を備えている。これらの結果、HACに搭載したオステオカルシン・プロモーター-GFPを保有する細胞は骨形成活性を評価するに適した細胞株であることが示され、一部の魚油に骨形成活性があることが示された。

方 法

本研究ではチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO細胞) にヒト21番染色体由来人工染色体 (21 pqHAC) を導入したHAC保持CHO細胞 (CHO-HAC) を宿主として使用した。

オステオカルシン-GFPレポーター遺伝子はヒトオステオカルシン遺伝子上流-550bpまでの領域をGFP遺伝子上流に挿入することで作成した。このレポーター遺伝子ユニットを2または3コピー重複したものを作成した。これらを用いてCre組換え酵素発現ベクターと共にCHO-HAC細胞へ遺伝子導入することでレポーター遺伝子をHACへ導入した。

得られた組換え細胞についてレポーター遺伝子のコピー数、活性型ビタミンDによる蛍光強度の違いを確認した。また、アジ、サゴシ、ちりめんじゃこから抽出した魚油。GFP蛍光

強度に与える影響を評価した。

結 果

遺伝子導入により得られた細胞はPCR解析によりloxP部位での部位特異的遺伝子組換え、レポーター遺伝子の導入が確認できた。また、蛍光顕微鏡下でGFP蛍光が観察できた。これらの細胞はレポーター遺伝子の導入コピー数に伴いGFP蛍光強度が増大することをフローサイトメーター解析により確認した。

遺伝子組換え細胞に0~100nMの濃度で活性化型ビタミンDを投与し、レポーター遺伝子の応答を確認したところ、レポーターのコピー数、ビタミンD濃度に依存して蛍光強度が増大することを確認した。

3種類の魚から抽出した魚油により遺伝子組換え細胞の蛍光強度が増大した。蛍光強度の増大は組織中ビタミンD含量が高いとされるちりめんじゃこから抽出した魚油を添加したものが特に高かった。

考 察

HACベクターを利用した遺伝子導入はCre-loxPシステムによる部位特異的遺伝子組換えによるものであり、導入部位やコピー数の制御が可能であるため、バックグラウンドの均一な細胞を得ることが可能である。本研究では骨特異的転写調節領域やビタミン応答領域を含むヒトオステオカルシン遺伝子の転写調節領域を利用したレポーター遺伝子を作成し、HACベクターへの導入により安定的な遺伝子導入細胞を樹立した。この遺伝子導入細胞は活性化型ビタミンDに対して濃度依存的、導入コピー数依存的な応答を示したため、遺伝子発現の評価に利用可能な細胞であると言える。この細胞を使用して天然物（魚油）の評価を実施したところ、特にビタミンDを多く含むちりめんじゃこの油に対して強く応答していることから、この遺伝子組換え細胞を使用することで天然物に由来する生理活性成分の評価が可能であると考えられる。

結 論

生理活性物質を評価するレポーター細胞を樹立する際にヒト人工染色体を用いることで、遺伝的バックグラウンドが均一な遺伝子導入細胞を得ることができた。この細胞はGFPレポーター遺伝子を重複することで、転写活性化因子（ビタミンDや魚油）に反応して強い蛍光強度を示しており、生理活性物質の評価に利用できることが明らかとなった。