

平成 19 年 12 月

橋本真由美 学位論文審査要旨

主 査	押 村 光 雄
副主査	箸 本 英 吉
同	佐 藤 建 三

主論文

S phase-preferential Cre-recombination in mammalian cells revealed by
HIV-TAT-PTD-mediated protein transduction

(HIV-TAT-PTDを介したタンパク質導入法により明らかにされた動物細胞S期優先的Cre組
換え)

(著者：橋本真由美、谷口真、吉野進、新井志穂、佐藤建三)

平成19年 Journal of Biochemistry 掲載予定

学位論文要旨

S phase-preferential Cre-recombination in mammalian cells revealed by HIV-TAT-PTD-mediated protein transduction

(HIV-TAT-PTDを介したタンパク質導入法により明らかにされた動物細胞S期優先的Cre組換え)

P1ファージCre組換え酵素(Cre)はゲノム改変技術の強力なツールであり、ノックアウト動物の作製や染色体改変、遺伝子挿入に広く用いられている。一方、Creの酵素生化学も研究されているが、真核細胞内での分子生物学はほとんど知られていない。本研究では、動物細胞でのCreの組換えと細胞周期との関連に着目し、同調培養を施したレポーター細胞にタンパク質導入ドメイン(PTD)を介してCreを各細胞周期に一過性に導入した。結果、S期にCreを導入した細胞では、ゲノムの組換え効率が有意に上昇した。CreにとってS期は組換えに有利な環境であることが示唆された。

方法

Creタンパク質は、ヒスチジンタグとの融合タンパク質として大腸菌BL21株で発現させ、ニッケルカラムにて精製を行った。Creによる組換えを検出するレポーター細胞株は、ヒト子宮頸癌細胞株HeLaを基に作製した。このレポーター細胞は、通常赤色蛍光タンパク質(DsRed)を発現するが、Creによって細胞ゲノム中の特定の配列が削除されると、緑色蛍光タンパク質(EGFP)を発現するようになる。レポーター細胞株のG₁/S期同調培養は、チミジンとヒドロキシウレアで誘導した。細胞周期の同定は細胞を沃化プロピディウム(PI)染色し、フローサイトメトリーで行った。PTD-Creタンパク質を各細胞周期の細胞に一過性に導入した後、EGFP陽性細胞の検出はフローサイトメトリーによる。組換えゲノムの検出は、レポーター細胞ゲノムのサザンブロットやレポーター配列特異的なプライマーを用いたPCRで行った。

結果

大腸菌で発現させた各組換え融合タンパク質は、精製後、純度の高いものを得た。作製したPTD-Cre融合タンパク質はHeLa細胞に効率良く導入され、添加後30分で速やかに核へ移行した。加えて、*in vitro*でのloxP特異的DNA組換え活性も確認した。レポーター細胞に

PTD-Creを2時間添加した結果、組換え特異的なDNA断片を検出した。また遺伝子発現誘導の結果、赤色蛍光を示す細胞だけでなく緑色蛍光を示す細胞が観察されたが、プラスミド導入によるCre発現に比べ低い効率であった。その原因の1つとして細胞周期との関連を推測し、同調培養を施したレポーター細胞にCre蛋白を導入した。その結果、レポーター細胞がS期の時にPTD-Creを一過性に導入すると、非同調細胞や他の周期に導入した時と比べて組換え頻度が2倍と有意に上昇した。

各周期や非同調細胞における、PTD融合タンパク質の導入量に顕著な差は無かった。導入したPTD-Creは、添加中の2時間は細胞内に存在し、タンパク質洗浄後速やかに消失した。この間、ゲノムDNAの組換えはPTD-Creを添加して30分で起こり始め、2時間程度でほぼ完了していた。

考 察

P1ファージCre組換え酵素は様々な遺伝子改変技術に応用されているが、詳細な分子メカニズムは十分理解されていない。本研究において、CreがS期優先的に動物細胞のゲノム配列を組換えることが示唆された。S期において、複製領域付近はヒストンのアセチル化やクロマチンの弛緩が生じ、様々なタンパク質がDNAに結合できる環境にある。Creの組換え効率も、標的DNA配列の構造に左右され得る。又、Creの組換えは多段階であり、反応中にホリデー中間体とよばれるDNA構造を作ることが知られている。細胞はDNA傷害を受けると、その修復としてS期特異的に相同組換えを起こすが、その過程にもホリデー中間体は現れる。相同組換えの場合、ホリデー中間体を切る酵素が必要となるが、この酵素がCreによる組換えにも関与する可能性が示唆された。

タンパク質導入法によって、目的とするタンパク質を一過性に特異的な時期に導入することができた。PTDを用いたタンパク質導入は、タンパク質の特定の短期間の機能を知る上で有効なツールであると考えられる。今回、CreがS期優先的にゲノムの組換えを起こすことを示した。これらの知見は、*in vivo*においてCre/*LoxP*組換えシステムを用いたゲノム改変技術への応用が期待される。

結 論

PTDを介した一過性のタンパク質導入実験により、Cre組換え酵素は動物細胞においてS期優先的にゲノムを組換えることが示唆された。