

氏名	おおつき あきひろ 大槻 明 広
学位の種類	博士 (医学)
学位記番号	甲第456号
学位授与年月日	平成16年 3月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	新規人工染色体ベクターを用いた DNA-PKcs 遺伝子発現制御系の構築
学位論文審査委員	(主査) 井藤久雄 (副査) 押村光雄 石部裕一

学位論文の内容の要旨

既存の遺伝子導入における問題点を克服するための一つの方法としてヒト人工染色体 (Human artificial chromosome ; HAC) を用いて DNA 修復遺伝子である DNA-PKcs (DNA-dependent Protein Kinase catalytic subunit) 発現制御系の構築を行った。HAC を用いることで導入する遺伝子を受容細胞内で一定のコピー数で安定に保持すること、また、導入する DNA 配列の大きさに制約がないため複数の発現制御構造ユニットや巨大な遺伝子ゲノムなどを細胞に導入可能である。DNA-PKcs の大量発現は細胞毒性あるいは増殖抑制を引き起こすと考えられ、その発現系の構築は従来のベクター系では非常に困難であり、人工的に発現を制御するシステムが必要と考えられた。

そこで、本研究では HAC ベクター上に、テトラサイクリンによる誘導系のテトラサイクリン調節性トランス活性化因子と、DNA-PKcs の cDNA を挿入し、人工的な発現制御を可能とするベクターを作製し、DNA-PKcs 欠損細胞 V3 にこのベクターを導入することによって DNA-PKcs の発現制御を試みた。

方 法

ヒト 21 番染色体長腕を削除し、任意の遺伝子を組み込むために loxP 配列を挿入したヒト人工染色体 (Δ qHAC) を、DNA-PKcs 遺伝子欠損細胞である V3 細胞 (CHO 細胞由来) に微小核細胞融合法を用いて導入した。さらにプラスミド上で、2つの遺伝子ユニットからなる DNA-PKcs 遺伝子発現カセットを作製した。本カセットには、テトラサイクリンの有無で mRNA の転写を調節するテトラサイクリン調節性トランス活性化因子と、本因子によって発現を調節される DNA-PKcs の cDNA が含まれている。この発現カセットを Cre 発現ベクターと共に Δ qHAC を保持した CHO 細胞または V3 細胞に導入し、loxP 配列特異的組換え体をクローニングした。目的の遺伝子導入が行われたことをゲノム DNA による PCR により確認した。また、確実に発現制御が得られるよう発現カセットを改良し導入を行った。得られたクローンで Δ qHAC 上に導入した DNA-PKcs 遺伝子の mRNA の発現が、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリン (以下 DOX) 投与によって変化することを RT-PCR 法により検討した。

結果と考察

ヒト人工染色体 $\Delta qHAC$ 上で DNA-PKcs 遺伝子の発現を人工的に制御するシステムを確立するために2つの発現カセット（第1世代、第2世代）を構築した。まず、最初に作製した第1世代においては、この発現カセットを $\Delta qHAC$ を保持する CHO 細胞に導入したところ、RT-PCR によって DNA-PKcs の発現を確認したが、期待された DOX 投与による DNA-PKcs の発現制御は得られなかった。さらに、この発現カセットを挿入した $\Delta qHAC$ を微小核融合法を用いて V3 細胞に導入し DNA-PKcs の発現を検討したが、DNA-PKcs 遺伝子を保持することはゲノム PCR で確認できるものの、mRNA の発現は確認されなかった。この結果は、微小核細胞融合法によって発現カセットを含む $\Delta qHAC$ が損傷を受けたことも考えられた。

そこで、先に V3 細胞に空の $\Delta qHAC$ を導入し染色体 FISH 解析により $\Delta qHAC$ を1コピーのみ保持した V3 細胞を得て、ここに発現カセットを導入して同様の発現ベクターを保持した V3 細胞を得た。しかし本 V3 細胞では DNA-PKcs の発現が確認されなかった。これらの結果は、発現カセット内の複数のプロモーター・エンハンサーが相互作用しているため、DNA-PKcs の DOX による発現制御や、あるいは発現自体が抑制されていると考えられた。

第2世代の発現カセットにおいては、2つの遺伝子の同時発現を行えるプロモーターを用いて発現カセットを改良し、V3 細胞に導入した。ゲノム PCR で発現カセットの挿入を確認したクローンで、RT-PCR によって V3 細胞での DNA-PKcs の発現を検討したところ、mRNA 発現が確認され、DOX の投与により発現量が増加した。さらに、ルシフェラーゼによるレポーター解析から、テトラサイクリン調節性トランス活性化因子の mRNA 転写活性が、第1世代の発現カセットでは DOX の投与によって変化に乏しいのに対して、第2世代の発現カセットでは、DOX の投与によって明らかに低下することが確認された。

以上の結果から第1世代の発現カセットで発現制御が不能だった原因として、2つのプロモーター・エンハンサーが近接しているため両者間で相互作用するために、CHO 細胞での発現制御が困難で、V3 での発現が見られないと考えられた。この相互作用を抑制する第2世代発現カセットを用いることにより、V3 細胞において DNA-PKcs の発現とその制御が可能となった。 $\Delta qHAC$ 上には、まだ既知遺伝子が残っており、より広範囲な応用や詳細な機能解析のためには、これらを削除するなど改良の余地が残るが、ヒト人工染色体の利用技術の実用化のための基盤が確立されたと考えられる。

結論

ヒト人工染色体 $\Delta qHAC$ とテトラサイクリン誘導系をもちいて、DNA-PKcs 遺伝子発現制御系を構築した。DNA-PKcs 欠損細胞 V3 内に発現制御ベクターを導入することでドキシサイクリンによる DNA-PKcs の発現制御が可能となった。このことより、遺伝子再生医療に向けての基本ベクター作製のための基盤づくりができたものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究では HAC ベクター上にテトラサイクリンによる誘導系のテトラサイクリン調節性トランス活性化因子と DNA-PKcs の cDNA を挿入して、人工的な発現制御を可能とするベクターを作製し、DNA-PKcs 欠損細胞 V3 にこのベクターを導入することによって DNA-PKcs の発現制御が可能であ

ることを示した。まず、ヒト 21 番染色体長腕を削除し loxP 配列を挿入した Δ qHAC を、DNA-PKcs 遺伝子欠損細胞である V3 細胞 (CHO 細胞由来) に微小核細胞融合法を用いて導入した。さらにプラスミド上で、テトラサイクリンの有無で DNA-PKcs の転写を調節できるような DNA-PKcs 遺伝子発現カセットを作製した。この発現カセットを Cre 発現ベクターと共に Δ qHAC を保持した V3 細胞に導入し、loxP 配列特異的組換え体をクローニングした。得られたクローン Δ qHAC 上に導入した DNA-PKcs 遺伝子の発現が、テトラサイクリン誘導体であるドキシサイクリンの投与によって制御されることを RT-PCR 法により確認した。

Δ qHAC とテトラサイクリン誘導系によって、DNA-PKcs 遺伝子の人工的な発現制御が可能なが示された。

本論文の内容は分子細胞生物学の分野でヒト人工染色体ベクターを用いた発現制御系の有用性を示唆し、また、今後の遺伝子治療のための基本ベクターが構築できたことを示すものであり、明らかに学術水準を高めたものと認める。