



Title	Synthesis of New Cre Recombinase Gene Based on Optimal Codon Usage for Mammalian Systems
Author(s)	是澤, 幸江
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42630
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	これ さわ ゆき え 是澤幸江
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16121 号
学位授与年月日	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻
学位論文名	Synthesis of a New Cre Recombinase Gene Based on Optimal Codon Usage for Mammalian Systems (哺乳類の Codon Usage に基づいた Cre 組換え酵素遺伝子の新規合成)
論文審査委員	(主査) 教授 白倉 良太
	(副査) 教授 岡部 勝 教授 宮崎 純一

論文内容の要旨

【目的】

Cre/loxP 組換えシステムは異種移植分野においても組織特異的に異種抗原を除去するための方法として注目されている。

バクテリオファージ P 1 由来の部位特異的組換え酵素である Cre タンパク質は、34bp の塩基配列からなる *loxP* とよばれる部位を認識する。その作用の一つとして Cre タンパク質は、順方向にならんだ 1 対の *loxP* にはさまれた DNA 断片を結果的に *loxP* 部位を一つ残す形で切り出す（遺伝子削除）。

これまで効率的な *Cre/loxP* 組換えを起こすために、Cre 遺伝子に核移行シグナルを付加し核内での Cre タンパク質発現量を高めるなどの工夫がなされている。組織特異的な遺伝子削除を確実かつ有効に行うには、組織特異的に働くプロモーターの選択と、目的部位で Cre タンパク質を高発現させる Cre 遺伝子導入の検討等が必要である。加えて、in vivo の場合遺伝子導入法に制約があるため、効率良くタンパク質に翻訳される Cre 遺伝子が必要となる。本研究ではこのファージ由来の Cre 遺伝子を哺乳動物細胞での発現に適したものにすることを目的として、哺乳動物の各アミノ酸においてもっとも多用されているコドン（適合コドン）へ改変した“哺乳類型 Cre 遺伝子”を合成した。

【方法】

1) 哺乳類型 Cre 遺伝子の合成

各アミノ酸をコードしているコドンの使用頻度が生物種で異なっていることに着目し、ファージ由来 Cre 遺伝子をできるだけ哺乳動物での適合コドン配列に改変した。さらに合成に際してはタンパク質の発現効率を上げるためにコザック配列および核移行シグナル配列を付加した。全長1075bp を 5 断片に分け、断片ごとにオリゴプライマーを設計し、PCR 法で相互プライミングによる DNA を合成した後連結し哺乳類型 Cre 遺伝子とした。

2) 哺乳類型 Cre 遺伝子の mRNA およびタンパク質の発現量の測定

合成した Cre 遺伝子 (sCre) およびコザック配列と核移行シグナルを付加した野生型 Cre 遺伝子 (wtCre) をそれぞれ発現ベクター pCXN (CAG プロモーター) にサブクローニングし、各 $50\mu\text{g}$ ずつ 1×10^7 個の CHO 細胞へ electroporation 法で導入後、24時間ごとに 5 日間の mRNA およびタンパク質の発現量を Northern blotting および Western blotting で解析した。

3) Cre/loxP 組換え効率による哺乳類型 Cre 遺伝子の有効性の検討

哺乳類型 Cre 遺伝子の有効性を検定するための検定用ベクターおよびクローンの作製を行い、Cre/loxP 組換え効率を検討した。検定用ベクターとして、CAG プロモーターの下流に loxP、CD59遺伝子、loxP、EGFP 遺伝子の順に連結した断片を作製した。組換えの指標を CD59 および EGFP の発現とし、指標タンパク質の発現は、組換え前は CD59のみが発現しており、Cre による loxP 組換え後は EGFPのみが発現してくる仕組みにした。これを CHO 細胞へ electroporation 法で導入し、G418選択後、Cre による loxP 組換えが起こることを確認した検定用 CHO 細胞クローンを 2 つ樹立した（クローン29およびクローン30）。組換え効率の検定は、2種類の発現ベクター（pCXN : CAG プロモーター、pMC1 : thymidine kinase プロモーター）にサブクローニングした sCre および wtCre を 5、20 さらに 50 μg ずつ検定用 CHO 細胞クローン 1×10^7 個へ electroporation 法で導入し、24時間ごとに 5 日間の指標タンパク質の発現を FACS で解析した。組換え効率値は EGFP の発現細胞の割合より算出した。

【成績】

- 1) ファージ由来の Cre 遺伝子の 63.7% のコドンを哺乳動物での適合コドンに置き換えた。
- 2) sCre 導入細胞での mRNA およびタンパク質の各最大発現時における発現量は wtCre のそれらに対しそれぞれ 4.1倍および7.1倍であった。
- 3) 下表に示したようにそれぞれの条件において sCre による組換え効率は wtCre に比べて高かったが、組換え効率の違いはタンパク質発現の違いほど大きくなかった。

表：Cre 遺伝子導入後の 5 日目のクローン30における loxP 組換え効率

導入条件 Cre 遺伝子	pCXN			pMC1		
	5	20	50	5	20	50 (μg / 1×10^7 cell)
sCre	61.6	85.0 *	81.4	53.6 *	78.8 *	83.1 *
wtCre	54.4	78.8	77.3	20.4	51.4	67.2

数値は平均値 (%)、* は同一条件群での $p < 0.05$ を示す。

【総括】

本研究では哺乳動物細胞での Cre タンパク質の発現を高めるためにその適合コドンに基づいた哺乳類型 Cre 遺伝子を合成した。合成した哺乳類型 Cre 遺伝子での mRNA およびタンパク質の発現量は野生型 Cre 遺伝子のそれよりも増加した。また Cre/loxP 組換え効率の検討についても、合成した哺乳類型 Cre 遺伝子は野生型 Cre 遺伝子に比べて高い組換え効率を示した。本研究で合成した哺乳類型 Cre 遺伝子は、異種移植分野の組織特異的な異種抗原除去において有用となりうる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

移植用ブタの開発において、組織特異的に異種抗原を除去するために Cre/loxP 組換えシステムを取り入れた方法が検討されている。in vivo において効率的な Cre/loxP 組換えを起こすには効率良くタンパク質翻訳される Cre 遺伝子が必要である。

本研究は各アミノ酸に対応するコドンの使用頻度が生物種で異なっていることに着目し、ファージ由来の Cre 遺伝子を哺乳動物の各アミノ酸においてもっとも多用されているコドン配列へ改変した“哺乳類型 Cre 遺伝子”を合成し、その有効性を検討したものである。哺乳動物培養細胞内での哺乳類型 Cre 遺伝子のタンパク質発現量は野生型 Cre 遺伝子のそれよりも増加した。また、Cre/loxP 組換え効率においても哺乳類型 Cre 遺伝子は野生型 Cre 遺伝子よりも高効率に loxP を組換えた。

本研究で新規合成した哺乳類型 Cre 遺伝子は野生型 Cre 遺伝子に比べ哺乳動物細胞での発現に適したものであったことより、組織特異的遺伝子ノックアウト移植用ブタの開発においても有用であると考えられる。

以上の点から本研究は学位の授与に値するものと考える。