



Title	多遺伝子の同時導入・発現用真核細胞型オペロンの開発
Author(s)	佐々木, ゆかり
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46536
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	佐々木 ゆかり
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 20259 号
学位授与年月日	平成18年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻
学位論文名	多遺伝子の同時導入・発現用真核細胞型オペロンの開発
論文審査委員	(主査) 教授 本田 武司 (副査) 教授 那須 正夫 教授 山口 明人 教授 岡部 勝

論文内容の要旨

ポストゲノムにおける細胞内プロテオーム機能の正しい理解は、その構成因子のダイナミズムを生理的で定量的に正しく解析することによって得られると考えられている。そのためには、細胞本来の機能を損なうことなく、タンパク質間の相互作用や局在変化の動態を、迅速・確実(ハイスループット)に解析し得る技術が必要である。哺乳動物細胞でも、多くのタンパク質は複合体を形成して機能しており、中でも2~3量体はもっとも多い。従って、細胞内タンパク質の本来機能を、蛍光標識タンパク質のイメージング化によって顕微鏡下で観察・解析するために、複数種の標的遺伝子を生細胞へ同時導入し、それらの発現量を生理的レベルに制御することが望まれる。

本研究では、Multisite Gateway (msGW) 法を用いて、一分子ベクター上に2~3種cDNAを並べて構築し(人工オペロン型発現クローン)、この組換えDNAを細胞へ導入して、複数種cDNAを共導入させた。また、これらcDNAの発現レベルの調節は、種々のウィルスや細胞由来のIRES (Internal Ribosome Entry Site)を利用して翻訳レベルで行った。従来、細胞へ複数(例えば2~3)種cDNAを同時導入する方法として、単一cDNA発現クローンの2~3種類を混合感染(co-transfection)させる方法が利用されている。しかしこの方法では、導入された遺伝子の量比(コピー数)にバラつき(細胞ごとに)があり、殊に染色体上の特定部位へ2~3種cDNAを共に導入(安定形質転換)するのは困難である。この問題を解決する一方法は、一分子ベクター上に2~3種cDNAを持つmulti-gene発現クローンを構築して、これを細胞へ導入する事であろう。この発現クローンを用いれば、導入される遺伝子のコピー数は相互に同数(化学量論的: stoichiometrical)である。また、これらの導入遺伝子の発現に与える周囲環境の影響も同じである。さらに、染色体上へのクローン挿入にはFRT/Flpの部位特異的組換え反応を用いた。これによって、染色体上の特定部位に2~3種の標的遺伝子を等しいコピー数で挿入することができる。

2~3種cDNAを含む(multi-gene)発現クローンは、転写・翻訳シグナルや蛍光標識タグなど、多くのDNA断片が一分子ベクター上に接続された複雑な構築体である。さらに、産生タンパク質の細胞内本来の機能や動態を再現するためには、標的遺伝子や細胞の種類に応じた適正な転写・翻訳シグナルや標識用タグの選出、これらの標的遺伝子に対する接続位置を検討する必要がある。しかし、従来の制限酵素とリガーゼを使用したDNAクローニング技術では、DNAの挿入方向やPCRによる変異導入などの確認検査が必要で、多種類の発現クローンやベクターの構築や改変には多大な時間と労力を要した。本研究で用いたmsGW法では、これらの問題を解消し、迅速・確実に様々な組合せの発現クローンやベクターを容易に構築して、適性なクローンの選出が可能である。

msGW 法は、大腸菌由来の *attB* シグナルと λ ファージ由来の *attP* シグナル間での部位特異的組み換え反応を利用した技術である。現在インビトロジェン社より販売されている msGW キットには 4 種類の msGW シグナルが使われているが、本研究室は更に 2 種類を加えた 6 種シグナルの使用権を保有している。本研究では、まずこれら 6 種類の msGW シグナル間の交差反応特異性と組換え効率を調べた。その結果、同種シグナル間での交叉特異性と組換え効率が高く、これによって組換え DNA 分子のハイスループット構築が可能であることが証明された。この 6 種シグナルを利用することで、複数（10 ケ以上）の DNA 断片を接続方向性を一定に保ったまま、迅速かつ確実に接続可能であり、様々な転写・翻訳シグナル DNA を好みの位置に接続した発現ベクターの構築が容易に行える。

multi-gene 発現クローニングには、それぞれの cDNA に固有の転写シグナル（プロモーター・エンハンサー）を付けてタンデム型に並列したクローンと、IRES 翻訳シグナルをそれぞれの cDNA 間に接続し、これらの cDNA を单一転写単位として発現させるオペロン型がある。前者の場合、プロモータ下流の cDNA 発現が転写干渉効果で低下する場合があり、インスレーターの挿入による緩和が必要なことがある。また各 cDNA に対し、それぞれ転写シグナルが接続されるため、発現クローニングの全体サイズが大きくなり、細胞への導入効率が低下することもある。これに対し後者のオペロン型では、単一のプロモーターから複数の cDNA がポリシストロニック mRNA として転写されるため、転写干渉効果は起こらず、発現クローニングサイズの拡大も防ぎうる。本研究ではこのオペロン型クローニングの発現様式を調べた。

用いた翻訳開始シグナルは、真核細胞の Kozak シグナルと、ウィルス由来および細胞性由来の 9 種類の IRES である。真核細胞では通常オペロン様式のゲノム構成は見られないが、本研究で構築したオペロン型発現クローニングでは、HeLa や 293 細胞内でポリシストロン mRNA の合成が認められ、複数（2～3）種 cDNA からのたんぱく質の同時産生が実現できた。しかし、この mRNA ではプロモータ下流の第 1 cDNA の翻訳は Kozak シグナルで行われるが、他の cDNA 翻訳は IRES でなければ行われない。第 1 cDNA レベルを第 2 や第 3 の cDNA の翻訳レベルと揃えて（Kozak シグナルは IRES よりも翻訳開始活性が高い）、2～3 種 cDNA の発現量を相互に等しいレベルに近づける試みを行った。即ち、2～3 種 cDNA を細胞へ同時（共）導入すると共に、同レベルでの共在発現を試みた。その結果、第 1 cDNA の Kozak シグナルを IRES に入れ換えて、この翻訳レベルを抑制することによって、ほぼ目的を果たし得た。一般に、IRES は遺伝子間に挿入されて翻訳開始活性を発揮するが、プロモーター直後の第 1 遺伝子の翻訳にも利用できることが判明した。IRES のみによるオペロン型クローニングの全体の発現レベルは、インスレーター HS4 をオペロン単位の前後に配置して高め得ることが判明した。

論文審査の結果の要旨

ポストゲノムにおける細胞内プロテオーム機能の正しい理解は、その構成因子のダイナミズムを生理的で定量的に正しく解析することによって得られると考えられている。そのためには、細胞本来の機能を損なうことなく、タンパク質間の相互作用や局在変化の動態を、迅速・確実（ハイスループット）に解析し得る技術が必要である。哺乳動物細胞でも、多くのタンパク質は複合体を形成して機能しており、中でも 2～3 量体はもっとも多い。従って、細胞内タンパク質の本来機能を、蛍光標識タンパク質のイメージング化によって顕微鏡下で観察・解析するためにも、複数種の標的遺伝子を生細胞へ同時導入し、それらの発現量を生理的レベルに制御することが望まれる。

本研究では、Multisite Gateway (msGW) 法を用いて、一分子ベクター上に 2～3 種 cDNA を並べて構築し（人工オペロン型発現クローニング）、この組換え DNA を細胞へ導入して、複数種 cDNA を共導入させた。また、これら cDNA の発現レベルの調節は、種々のウィルスや細胞由来の IRES (Internal Ribosome Entry Site) を利用して翻訳レベルで行った。

msGW 法は、大腸菌由来の *attB* シグナルと λ ファージ由来の *attP* シグナル間での部位特異的組み換え反応を利用した技術である。現在インビトロジェン社より販売されている msGW キットには 4 種類の msGW シグナルが使われているが、本研究室は更に 2 種類を加えた 6 種シグナルの使用権を保有している。本研究では、まずこれら 6 種類の msGW シグナル間の交差反応特異性と組換え効率を調べた。

その結果、同種シグナル間での交叉特異性と組換え効率が高く、これによって組換え DNA 分子のハイスクープト構築が可能であることが証明された。この 6 種シグナルを利用することで、複数（10 ケ以上）の DNA 断片を接続方向性を一定に保ったまま、迅速かつ確実に接続可能であり、様々な転写・翻訳シグナル DNA を好みの位置に接続した発現ベクターの構築が容易に行える。

人工オペロン型発現クローニングの構築に用いた翻訳開始シグナルは、真核細胞の Kozak シグナルと、ウィルス由来および細胞性由来の 9 種類の IRES である。真核細胞では通常オペロン様式のゲノム構成は見られないが、本研究で構築したオペロン型発現クローニングでは、HeLa や 293 細胞内でポリリストロン mRNA の合成が認められ、複数（2～3）種 cDNA からのたんぱく質の同時産生が実現できた。また、第 1 cDNA および第 2 cDNA を IRES を用いて翻訳抑制することによって、遺伝子間の発現量比を近づけることが可能となった。さらに、IRES のみによるオペロン型クローニングの全体の発現レベルは、インスレーター HS4 をオペロン単位の前後に配置して高め得ることが判明した。

IRES を利用することで、複数種 cDNA を同時導入・共発現させうる真核細胞系オペロン型発現クローニングを構築することが出来た。cDNA 間での発現量の差はあるが、IRES の種類、配置を検討することで、発現量比を調節することができるため、細胞内でのタンパク質相互作用、動態解析をする上での有力な遺伝子導入技術となりうる。今後、このような複数種遺伝子の同時導入を容易に実現させる技術は重要性を増すと予想され、今後様々な分野へ応用利用されることが期待される。