

Title	生細胞への多種遺伝子の等コピー同時導入法とその発現系の構築
Author(s)	矢幡, 一英
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/47230">https://hdl.handle.net/11094/47230</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a>〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	矢 幡 一 英
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬 学)
学位記番号	第 2 1 1 0 6 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	生細胞への多種遺伝子の等コピー同時導入法とその発現系の構築
論文審査委員	(主査) 教授 岡部 勝 (副査) 教授 山元 弘 教授 中川 晋作 教授 土井 健史

#### 論 文 内 容 の 要 旨

ヒトやモデル生物の遺伝子を細胞で発現することができるベクター（以下、発現クローン）に組み込み、培養細胞へ導入して、その遺伝子の産物（タンパク質）を調べることは、よく行なわれている遺伝子機能解析の手法である。これを発展させて、組織や個体へ遺伝子を巧く導入することは再生医療や遺伝子治療を成功させるポイントになる。ヒト細胞では、殆どのタンパク質は相互作用によって機能を発揮していることから、遺伝子を細胞内へ導入して本来の機能を発揮させるためには、関連するタンパク質の遺伝子も共に導入して調べると、細胞内の本来の様子がより正しく反映された解析結果が得られるであろうと考えられる。

著者が意図したことは、生きた細胞内でプロテオームを構成するタンパク質の本来の動態（相互作用、オルガネラ局在、核移行など）を正しく観察するために、プロテオームの構成と機能を大幅に変えないように、複数種類の遺伝子の細胞への共導入と導入遺伝子の低レベル発現をおこなうことである。

そこで、1分子ベクター上に複数種 cDNA を蛍光タンパク質タグで識別標識してタンデム型で構築（タンデム発現ベクター）し、生細胞への複数種 cDNA の等コピー同時導入法と、その遺伝子の発現レベルを自在に変えられるような技術を開発した。ゲノム DNA から調製した細胞周期依存性・低活性プロモーターを用いた低レベル発現系の構築を行い、また、複数種 cDNA 分子を核内染色体の特定部位へ Flp/FRT 法で共導入して安定な低発現系を構築した。このような安定形質転換細胞を株化し、導入 cDNA を低レベル発現させることで、細胞本来の遺伝子発現様式の再現を試みた。

実際にこの系を用いることにより、actin capping protein (CP) のファミリーである、ヒトの CP $\alpha$ 1 と CP $\beta$ 2 の 2 種類のタンパク質を、ヒト細胞内での局在性や複合体形成について調べた。CP はアクチンの伸張と短縮を抑制する、アクチンフィラメントをキャッピングする必須のタンパク質で、 $\alpha$ 1、 $\alpha$ 2、 $\alpha$ 3、 $\beta$ 1、 $\beta$ 2、 $\beta$ 3 の isoform を持ち、それぞれが組織特異的に局在しており、 $\alpha/\beta$  複合体を形成してアクチン重合に関わっている。これらの複合体形成と組織特異性の違いはまだ良く分かっておらず、CP $\alpha$ 1 と CP $\beta$ 2 が体細胞においてどのように局在し、複合体を形成するのはこれまであまり知られていない。そこで、この CP $\alpha$ 1 と CP $\beta$ 2 の体細胞における局在と細胞内における複合体形成を確かめるために、HeLa 細胞を用いて CP $\alpha$ 1 と CP $\beta$ 2 をタンデム発現クローンで共発現させた。

CP $\alpha$ 1 と CP $\beta$ 2 の単独発現の場合では、CP $\beta$ 2 は細胞質にも核内にも存在したが、CP $\alpha$ 1 は細胞質に局在して核に存在しなかった。しかし、タンデム発現クローンによる 2 種 cDNA の共導入で CP $\beta$ 2 と CP $\alpha$ 1 が同時に発現され

た結果、CP $\beta$ 2 が細胞質に局在して核内には存在しなかった。つまり、共発現した CP $\beta$ 2 と CP $\alpha$ 1 は複合体形成し、細胞質に局在することが分かった。また、この CP $\beta$ 2 と CP $\alpha$ 1 の共発現によるヘテロ複合体形成は免疫共沈降法により証明された。

また、核膜と核膜孔因子の一つである、Emerin と Nup62 を用いて、過剰発現させると細胞が致死になるが、低発現プロモーターの使用や、限定数 cDNA の染色体への部位特異的導入による低発現レベルの実現で、数分という短い時間での核膜の崩壊と再構築をリアルタイムに観察し得ることを示した。今後は、タンデム発現ベクターを用いて他の核膜に関わる因子やクロマチンへの結合が知られている核膜孔の諸因子などを同時にリアルタイム解析することで、転写のメカニズムと核膜形成等との関係を明らかにし得ると期待される。

複数種の遺伝子を 1 分子ベクター上に乗せ、それぞれ独立転写単位として発現できるタンデム発現クローンの有効性は証明された。しかしながら、このようなタンデム発現クローンでは、ベクター上の隣接遺伝子間において、下流側の遺伝子転写が抑制され、これは従来より転写干渉として知られていた。

この転写干渉効果を解消するために、隣接遺伝子間に chicken HS4 (cHS4) インスレーターの繰り返し配列構造を挿入すると、染色体内、染色体外においても干渉効果を緩和できることを見出した。これまで cHS4 インスレーターは真核生物ゲノム上において、転写干渉作用を遮断することができると報告されていたが、染色体外 (ゲノムに取り込まれていない環状 DNA : 一過性導入) での効果や、どのような機構で転写干渉作用を遮断しているのか明らかにされていなかった。

そこで、cHS4 インスレーターを持つプラスミド DNA を細胞に一過性導入し、染色体上において cHS4 インスレーターに結合するとされる、CTCF を ChIP アッセイで調べた。その結果、一過性導入したプラスミド DNA 上の cHS4 インスレーター部分に CTCF が集積していることが観察された。また、cHS4 インスレーターを挿入したプラスミド DNA を一過性導入した際に、転写干渉効果が緩和され、プラスミド DNA 上の遺伝子発現量が増大していたことから、cHS4 インスレーターが誘導する、ヒストンのアセチル化がプラスミド DNA 上においても起こっている可能性が考えられた。これを確認するために、抗ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (CBP) 抗体と、抗アセチル化ヒストン H3 抗体を用いて、ChIP アッセイをおこなったところ、プラスミド DNA 上の cHS4 領域近傍で CBP が集積し、ヒストンのアセチル化がみられ、また cHS4 インスレーター挿入部位の両側遺伝子のプロモーター部位でヒストンアセチル化の上昇が観察された。これにより、インスレーターをタンデム化させることによってタンデム発現ベクター上の遺伝子転写量が増大したことは、インスレーターと隣接する遺伝子領域のクロマチン構造の変化により、遺伝子発現が促進された可能性が示唆された。

さらに、cHS4 インスレーターを挿入したタンデム発現ベクターを染色体に導入し、転写干渉を緩和させた安定形質転換細胞において、細胞内の CTCF の発現を阻害した結果、再び隣接遺伝子間において転写干渉が起こることがわかった。したがって、本実験で観察された転写干渉作用は、CTCF を介する cHS4 インスレーター効果によって緩和されたと示唆された。

以上のことから、cHS4 インスレーターは染色体外のプラスミド DNA 上においてもインスレーター機能を発揮することが示唆され、その結果、転写干渉効果を緩和していると考えられた。

複数の遺伝子を細胞に等コピー導入し、発現量をコントロールできる、タンデム発現ベクターを使った技術は、体細胞のみならず、ES 細胞にも応用することができ、ポストゲノムやポストプロテオミクス成果の先に展望されるであろう再生医療や遺伝子治療や、植物や魚類も含めたモデル生物の育種にも役立つだろう。

## 論文審査の結果の要旨

本論文では、1 分子ベクター上に 2 種 cDNA をタンデムに配置して発現クローンを構築し、低発現プロモーターを用いることで、細胞内における actin capping protein の Cp $\alpha$ 1 と Cp $\beta$ 2 を例として取り上げ、その複合体形成を明らかにした。さらに、発現クローンを染色体に組込んだ安定な低発現系を使用して、核膜の崩壊と再構築時における Emerin と Nup62 の挙動をリアルタイムで観察できることを示した。また、episomal DNA 上における隣接した遺伝

子間に生じる転写干渉は、cHS4 インスレーターを導入することで、CTCF が episomal DNA 上の cHS4 部位に結合し転写干渉を緩和していることを明らかにした。さらに cHS4 部位に histone acetyltransferase が結合することでヒストンのアセチル化が引き起こされ、cHS4 インスレーターの隣接 cDNA の発現量が上昇することを見出した。この知見は、一過性発現系における cHS4 insulator の機能を示した初めての例であった。これらの技術は本論文で用いた HeLa 細胞のみならず、ES 細胞にも応用することができ、ポストゲノムやポストプロテオミクス成果の先に展望されるであろう再生医療や遺伝子治療に応用できる点でたいへん興味もたれるものであり、本研究が博士（薬学）の学位授与に値するものと認める。