

Title	新規テトラサイクリン条件誘導発現システムによる遺伝子発現の時間的制御
Author(s)	井上, 健
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58006">https://hdl.handle.net/11094/58006</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 href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/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	井上 健
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第 23336 号
学位授与年月日	平成21年9月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	新規テトラサイクリン条件誘導発現システムによる遺伝子発現の時間的制御
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 雅人 (副査) 教授 安永 照雄 教授 今本 文男 准教授 菱田 卓

### 論文内容の要旨

細胞に導入した遺伝子を好みの時期に誘導発現させることは、産生される目的タンパク質の蓄積レベルの調節、特に恒常的な発現をさせてしまうと解析が困難となる遺伝子産物の機能解析に必須の技術となっている。さらに発生・分化の時間的制御にも応用可能な技術として重要視されてきている。哺乳類細胞においてこのような目的で現在最も広く用いられているのが、テトラサイクリンによる遺伝子誘導発現系である。従来のテトラサイクリン誘導発現系 (T-REx 系) はテトラサイクリンリプレッサー (TetR) 遺伝子を予め染色体へ導入した細胞株を用いて行われていた。即ち、TetR を恒常的に発現している細胞へテトラサイクリンオペレーター (TetO) に接続した標的遺伝子 (Gene of Interest; GOI) を導入し、TetR と TetO の結合を解除する誘導物質 (Dox) を添加して発現を誘導する。この方法では、誘導は TetR 遺伝子を持つ細胞でしか行えない。

本研究では、どの細胞でもテトラサイクリン誘導がかけられるように、TetO<sub>2</sub>-GOI を含む誘導発現ユニットと2コピーの TetR 発現ユニットを一分子ベクター上に並べた all-in-one 誘導発現クローンを構築した。このベクターをφC31 組換え法を用いて染色体上の pseudo attP 配列へ導入し、ワンステップで標的遺伝子を誘導発現できる安定形質転換細胞株を作製できることを示した。4種類の細胞株に適用したところ全ての株で誘導発現が効果的に行われたことから、この系は様々な細胞株での誘導発現に適していることが示唆された。

さらに all-in-one 誘導発現系が細胞の生理機能を研究する為の有用なツールであることを示すため、細胞がん化の時間的制御を試みた。c-Src の負の制御因子である Csk を欠損したマウス胚由来繊維芽細胞 (MEF Csk-KO) は c-Src の過剰発現でがん化すること、および脂質ラフトに局在するアダプター分子 Cbp (Csk-binding protein) が c-Src のがん化を抑制することが報告されている。そこで c-Src および Cbp 誘導発現クローンを構築し、MEF Csk-KO に導入した。その結果、c-Src によるがん化と、Cbp によるがん化抑制を短時間に可逆的に制御できることが示された。このようながん化と正常化を自在に操作することのできる細胞株は、細胞内での詳細ながん化メカニズムの解析に貢献でき、また他の関連因子の探索にも利用できると思われる。

φC31 組換え法を用いた染色体への遺伝子導入は ES 細胞や初代培養細胞でも報告されており、all-in-one 誘導発現系はこれらの細胞にも適用できると考えられる。そのため現在のポストゲノムやポストプロテオミクス研究の先に展望されるであろう再生医療や遺伝子治療にも役立つことが期待される。

## 論文審査の結果の要旨

目的遺伝子の機能を解明するためには、その遺伝子を特定の時期に発現誘導することによって、細胞機能への影響、蛋白質産物の蓄積量、修飾、他の蛋白質との相互作用、細胞内分布の変化を時間軸で詳細に観察することが重要である。またこのような実験系は、幹細胞形成の時間的制御や、癌の発生や抑制メカニズムの解析等にもきわめて有用となる。遺伝子誘導発現系としてこれまでに、テトラサイクリン誘導発現系（Tet-On/OFF）が多用されてきた。Tet-On系では、テトラサイクリンレプレッサー（Tet R）遺伝子を予め染色体へ導入した細胞株に、テトラサイクリンオペレーター（Tet O）に接続した目的遺伝子を導入し、Tet RとTet Oの結合を解除する誘導物質（Dox）を添加して発現を誘導する。しかしながらこの方法では、Tet R遺伝子をあらかじめ導入する必要があること、遺伝子の染色体部位への導入がコントロール出来ないこと、さらに誘導前の発現リークが無視出来ないことなどの大きな問題点があり、結果の評価に慎重さが求められていた。これらの問題点を克服するために、井上氏は、Tet Oと2つのTet R遺伝子を同一ベクター上に並べ、さらに、 $\phi$ C31 integrase法により特定の染色体部位への遺伝子導入を可能とするマルチ遺伝子発現系（One-step Tet-onシステム）を開発した。このシステムを用いることによって、一度の形質転換操作によりベクターを染色体の特定の部位に安定に導入することやリークのほとんどない誘導発現が可能となった。さらに井上氏はこの系を用いて、がん原遺伝子c-Srcによるがん化の誘導系、およびc-Srcの制御因子Cbpによるがん化抑制の誘導系を開発し、本システムが実際の遺伝子機能解析にきわめて有用であることを示した。これらの井上氏の研究は、遺伝子機能解析の新たなブレークスルーとなるきわめて独創的なものであり、よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認める。