

## V . 原医研セミナー記録 (平成15年度)

第69回	平成15年11月28日	教話題提供者	信 國 好 俊 檜 山 桂 子
第70回	平成16年 2 月 5 日	教話題提供者	安 永 晋一郎 大 坪 素 秋

### ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーを用いた特定の機能に關与する 遺伝子群の解明法とその応用

ゲノム障害制御研究部門 ゲノム障害病理研究分野 信 國 好 俊

はじめに

ヒト, マウスの遺伝子配列が明らかとされ, その後も驚く早さで多くの種の遺伝子配列が解明されつつある。それに伴い各遺伝子機能の系統的な解明が益々重要となってきた。

これまでに大腸菌, 酵母, ショウジョウバエ等において, 『挿入変異』は遺伝子の機能を解明する上で大きな成果をもたらしてきた。マウスをはじめとした哺乳動物においても挿入変異がきっかけとなって遺伝子機能が解明された例はあるが, むしろ例外的で一般的なものではない。

現在, マウスにおいても系統的な遺伝子機能の解析を目指して, 化学変異原あるいは挿入変異法を用いた大規模な『saturated mutagenesis』プロジェクトがいくつかの施設を中心に進められている。変異マウスは個体レベルで遺伝子機能を解析できるという利点がある一方, 遺伝子の種類によっては致死的で変異マウスを得ることができない, あるいは変異マウス個体由来の培養細胞ではその後の解析が困難なことが多々ある。また, 一度に多くの変異についてのスクリーニングや検討が必要な場合には, マウスを用いた実験では不適切あるいは実際上不可能である。

今回我々は, 大規模ランダムジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーを作製し, これを用いることで, 通常の実験環境でも培養細胞系で変異細胞を分離することさえできれば, その変異の責任遺伝子群を比較的簡単に一括して解明することが可能な系を検討開発した。

動物培養細胞系での大規模挿入変異細胞ライブラリー: ランダムジーントラップ挿入変異 CHO 細胞ライブラリー

動物体細胞は2倍体で, また多くの遺伝子は劣性の形質であるために, 通常は挿入変異だけでは遺伝子が破壊された結果の表現型の変化としての変異細胞を得ることは困難である。

CHO (Chinese hamster ovary) 細胞からはこれまでに種々のそして多くの変異が分離されてきた。CHO 細胞から変異細胞が高率に分離可能なのは, この細胞では多くの遺伝子座で『機能的な半接合体』の状態にあるからではないかと考えられている。

一方, 挿入変異の効率をあげることを目的として, ジーントラップ法が開発・改良されてきた。これは, レポーター遺伝子を細胞に遺伝子導入し, 偶発的に起こる内在性プロモーターからの発現を指標としてゲノム遺伝子内への挿入体を選別する方法である。遺伝子がトラップされると, 内在性遺伝子とレポーター遺伝子の融合 mRNA がつくられると同時にゲノム遺伝子が破壊される。また, 融合 mRNA を解析することでトラップされた遺伝子の単離・同定を容易に行うことができる。

そこで、CHO 細胞ではジーントラップ法で対立遺伝子の一方を破壊すれば、その遺伝子機能を喪失した変異細胞を高率に得ることができるのではないかと。また、場合によっては内在性遺伝子とレポーターの融合による dominant negative mutant を得ることができるのではないかと予想し研究を行った。

#### ジーントラップ法を用いた細胞内コレステロール代謝輸送に関する遺伝子群の解明

高脂血症（高コレステロール血症）発症機構の解明は、動脈硬化の予防と治療上重要な課題である。これまでに、細胞内コレステロール輸送代謝の障害の高脂血症及び動脈硬化症発症への関与が指摘されてきたが、その詳細は十分には解明されていない。そこで、高脂血症ならびに動脈硬化症の発症機構を解明することを目的として（1）ジーントラップ挿入変異法により遺伝子機能が喪失して生じた細胞内コレステロール代謝輸送変異株を単離し（2）次に、外来遺伝子の挿入で破壊された内在性遺伝子とレポーター遺伝子との融合 mRNA を解析することで、コレステロールの細胞内代謝輸送に重要な役割を果たす遺伝子群の系統的な検索解析を行った。そして実際に細胞内コレステロール代謝輸送に関する既知あるいは新規の遺伝子群を複数同定することに成功した（発表準備中）。解析を進めることで、高脂血症ならびに動脈硬化症の分子疫学的解明と予防医学的検討評価を進める上での有用な遺伝子（ならびに細胞生物学的）情報が得られると期待される。

#### 大規模ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーの可能性

CHO 細胞からはこれまでにさまざまな種類の変異細胞が分離されてきた。そして、それらの変異細胞は代謝、細胞内輸送、シグナル伝達あるいは薬剤耐性等をはじめとした多くの細胞機能を明らかとしていく上での貴重な材料として役立ってきた。

しかしながら、なぜそのような変異細胞としての表現型を呈するのか？ そのもととなる原因遺伝子とその変化について解明することは大変な時間と労力を要する作業であった。通常は、変異細胞株に完全長 cDNA 発現させて表現型が元に戻るということを指標として責任遺伝子を同定する『発現クローニング』法が一般的でまた有効な手段であるが、この場合にも野生型に復帰したものを再び選択することができなければ応用できない。

今回紹介した『大規模ジーントラップ挿入変異 CHO 細胞ライブラリー』を用いた方法では、変異細胞を分離することができさえすれば、細胞の表現系（機能）と破壊された遺伝子の同定を直接関連づけることが可能で、その表現型に関する遺伝子群の同定とその機能解明を、一括して簡便かつ系統的に行うことができる。同時に責任遺伝子の破壊された変異細胞を得ることができることになる。CHO 細胞については、これまでに多くの変異細胞が種々の方法を用いて分離されてきており、その実績と蓄積がある。その多くのものに応用可能であると考えている。

#### ゲノムを安定に保つ機構ならびにゲノム不安定性の発生機序の解明に

大規模ランダムジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーの中から、例えば、LOH (loss of heterozygosity) あるいは染色体分配異常といったゲノムの不安定性を示す変異細胞の単離を行うことができれば、それらの変異細胞でトラップされ破壊された遺伝子を同定することで、ゲノムの安定性に関する遺伝子群のいくつかをまた明らかとすることができるのではないかと考え研究を進めている。

# ヒト細胞の不死化とテロメラーゼ

ゲノム疾患治療研究部門 遺伝子診断・治療開発研究分野 檜山桂子

がんの無限増殖制御においても、再生医療における細胞寿命延長においても、細胞の延命・不死化機構の解明は不可欠である。その中心を担うのが、細胞分裂にともなう染色体末端テロメアの短縮を補う逆転写酵素テロメラーゼであり、これまでの研究からは、

- 1, 殆ど全ての種類の癌は最終的にテロメラーゼを活性化させる
- 2, *in vivo* の癌細胞は、ひとたびテロメラーゼを活性化させると不可逆性と考えられる
- 3, 胚細胞では細胞増殖とともにテロメラーゼが活性化され得るが、通常のヒト正常体細胞ではテロメラーゼは活性化されない。
- 4, ヒト正常体細胞においても、リンパ球や再生性組織の幹/前駆細胞では増殖とともにテロメラーゼを活性化する。
- 5, 正常リンパ球や幹/前駆細胞のテロメラーゼ活性化能は年齢とともに低下し、細胞は不死化しない
- 6, リンパ球のテロメラーゼ活性化は、*in vitro* で増殖刺激を続けても10PDLを超えると低下する(分裂能も低下する)
- 7, ヒト正常細胞はテロメラーゼ(*hTERT* 遺伝子)導入だけでは必ずしも不死化しない(同じ肺線維芽細胞であっても、胎児由来はテロメラーゼ導入だけでは不死化しないが、成人由来では不死化し得る)
- 8, テロメア維持機構を有する細胞(ALT細胞)であっても、テロメラーゼ導入により癌の悪性形質が増強することが示されてきた。そこで、細胞には、テロメア短縮とは無関係に増殖を制御する分子(内在性テロメラーゼ活性も制御?)が存在し、その機能は組織によっても発生学的にも差があるが、すべての正常細胞に存在し、癌細胞においては破綻をしているのではないか? その分子が特定できれば、がん細胞における特異的分子標的治療の可能性のみならず、正常移植細胞の延命を図る再生医療への応用性も高まるのではないかと仮定のもと、この不死化規定因子の同定を試みている。

正常細胞の不死化にともない発現変動する遺伝子を検索するため、*hTERT* 遺伝子を *in vitro* で導入した不死化正常線維芽細胞および不死化血管内皮細胞を樹立し、異なる継代数における遺伝子発現レベルを cDNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析し、有意な変動を有する遺伝子について real-time RT-PCR により定量評価した。不死化血管内皮細胞では継代数にともなう変動は乏しかったが、*hTERT* 導入後約60 PDL 培養線維芽細胞では、平均倍加速度が低く、さらに約50~100 PDL 培養した不死化細胞と比較して遺伝子発現プロファイルが異なっていた。この時点では、*BCL2* の一過性発現増強、*TP53* の一過性発現抑制、*CDKN1A* の持続的発現抑制も認められ、*hTERT* mRNA 発現レベルも、比較的低い値を示した。これらの結果は、*hTERT* 遺伝子導入後継続培養中に細胞内でさらに何らかのイベントを生じ、最終的な不死化に至っている可能性を示唆する。

形質転換細胞の不死化にともない発現変動する遺伝子を検索するためには、正常線維芽細胞に SV40 early antigen および *hTERT* を導入し、有限寿命のトランスフォーム細胞と不死化トランスフォームの間で発現変動する遺伝子をオリゴアレイを用いて約20,000個の遺伝子の中から検出するとともに、同一癌症例のテロメラーゼ非発現原発組織・転移組織とテロメラーゼ活性化転移組織との比較を行い、さらに、各種癌細胞株と正常母細胞との比較も行った。各種癌細胞株およびテロメラーゼ活性化転移組織で共通に発現増強する遺伝子~100個、減弱する遺伝子~130個が得られたが、テロメラーゼ導入不死化トランスフォーム細胞にも共通して発現変動する遺伝子は、その約1割であった。これら癌・トランスフォーム細胞における不死化に関わる遺伝子は、正常細胞の不死化過程で変動した遺伝子とは異なった遺伝子群で、正常細胞と癌細胞の不死化機構が異なることを裏付けた。

従来テロメラーゼはテロメアの究極的な短縮を補うために活性化されると考えられてきたが、最近、組織病理学的に正常粘膜と診断される喫煙者の気管支上皮でしばしばテロメラーゼが活性化されていること、そうした上皮からは高率に肺癌が出現することを認めた。正常細胞におけるテロメラーゼ活性化の意義が、分裂寿命の延命だけなのか、癌化の1ステップとなるのかは、癌の早期診断・予防医学のみならず、再生医療への応用における重要な問題点であり、癌における不死化機構とともに今後解明してゆくべき課題と考えている。

# 遺伝性難聴 DFNB9 の原因遺伝子 *Otoferlin* のクローニング

放射線再生医学研究部門 幹細胞機能学研究分野 安永晋一郎

## I . HLA 遺伝子の多型性と疾患感受性や移植拒絶反応との相関

1992 - 96年,九州大学生体防御医学研究所遺伝学部門にて大学院生として笹月健彦教授および木村彰方助教授の指導を受けた。HLA 遺伝子領域は,強い連鎖不平衡と多型性により特徴づけられるが,まず HLA-DQA1 / DQB1 遺伝子の多型性の網羅的な解析を行い,その結果に基づき PCR-SSOP 法を用いた DQA1 遺伝子の詳細なタイピング法を開発した。次にインスリン依存性糖尿病患者 (IDDM) と HLA-DR / DQ 領域ハプロタイプとの相関を,日本人集団とノルウェー人集団の双方にて比較したところ, IDDM の疾患感受性には感受性 DRB1 アリルと感受性 DQB1 アリルの両方が必要であるのに対し,疾患抵抗性は抵抗性 DQB1 アリルまたは抵抗性 DQA1 アリルのどちらかのみで規定されることが明らかにした。その後,厚生省研究班による「非血縁者間骨髄移植における HLA 適合性の解析」に参画する機会を得て,HLA-A, B および DR を DNA レベルまで適合させることで, GVHD の重症度を低下させると共に生存率を向上させることが可能であることを明らかにした。

## II . 遺伝性難聴 DFNB9 の原因遺伝子 *Otoferlin* のクローニング

1997 - 99年,パスツール研究所 (パリ) の Christine PETIT 教授の研究室に留学した。常染色体劣性遺伝形式の遺伝性難聴 (DFNB 型) は,およそ1500出生に一人発症する遺伝性難聴の大半をしめ,多くが言語習得以前に高度の難聴を示す。レバノン人近親婚家系より同定された第2染色体短腕 (2p22 - 23) に連鎖する遺伝性難聴 DFNB9 の原因遺伝子を明らかにするため,その遺伝子領域の物理的地図を YAC / BAC / PAC のコンテイングを用いて作製し,領域内にある EST をリストアップした。それぞれの EST より RACE-PCR 法により全長の cDNA 配列を決定しその遺伝子変異を検索したところ,線虫の精子成熟因子である FER-1 に相同性をもち,後に *Otoferlin* と命名される1230アミノ酸のタンパク質が,DFNB9 患者では729アミノ酸で断ち切られていることが示された。*Otoferlin* は Synaptotagmin などのシナプス癒合タンパク質と同様に C 2 ドメインを持ち, in situ hybridization より内耳のシナプス活動の盛んな細胞に主に発現していることが示されたことから,聴神経のシナプス癒合に不可欠なタンパク質であることが推定された。さらに *Otoferlin* のマウスオルソログが1992アミノ酸のタンパク質であったことから探索したところ,ヒトの *Otoferlin* にも同様のサイズの long form が存在することが明らかとなった。インド人の DFNB9 家系の解析より難聴の発症には long form の方が関与していることがわかった。

## III . IL-4 / IL-13 誘導遺伝子の解析

2001 - 03年,佐賀医科大学分子生命科学講座分子医化学分野 (出原賢治教授主催) に赴任した。気管支喘息は気道過敏性と気道組織の慢性炎症により特徴づけられ,その発症には Th 2 サイトカインの IL-4 や IL-13 が重要な役割を果たしている。気管支上皮細胞における IL-4 / IL-13 に共通して発現誘導される遺伝子を DNA チップによりリストアップしたところ,IL-13 に結合はするが細胞質内ドメインが極めて短いため情報は伝えられない「おとりレセプター」ではないかと考えられていた IL13R 2 遺伝子が誘導されていた。IL13R 2 トランスフェクタントにおいて IL-13 による STAT 6 リン酸化が抑制されることを抗リン酸化 STAT 6 抗体を用いた解析により明らかにし,IL13R 2 が確かに「おとりレセプター」として働いていることを証明した。次に,気管支上皮細胞および B リンパ球において IL-4 / IL-13 が,ダイオキシンのレセプターとして知られる AhR (aryl hydrocarbon receptor) 遺伝子の発現を誘導していることがわかったので,IL-4 / IL-13 シグナルと AhR シグナルとのクロストークを明らかにするため,IL-4 / IL-13 とダイオキシンの双方の刺激により発現誘導が増強される遺伝子を DNA チップにて同定し,その中のひとつの遺伝子の機能解析を現在進行させている。

# サイクリン A と染色体異常

放射線再生医学研究部門 幹細胞機能学研究分野 大坪素秋

サイクリン依存性キナーゼ (CDK) は細胞周期の進行に重要なだけでなく、その活性の調節は細胞老化や発ガンとも密接にかかわっている。CDK が発ガンのどの段階に関与するかについては、ガン抑制遺伝子産物 Rb の不活性化への関与がすでに証明されているものの、それが発ガンの直接の原因とは考えにくい。CDK が発ガンの過程のどの段階において機能するかを明らかにする目的で、ヒトの正常線維芽細胞 (82-6) に各種サイクリンと CDK を導入し過剰発現させ、細胞の増殖能や寿命に及ぼす影響および発ガンの指標となる染色体異常の誘導の有無について検討をおこなった。82-6 細胞は約60回の分裂の後不可逆的に増殖を停止 (細胞老化) するが、S 期と M 期の進行の両方に重要なサイクリン A をレトロウイルスで導入した82-6 細胞は顕著な増殖能の亢進 (5 回分裂延長) を示した。サイクリン B とサイクリン E、または CDK1 と CDK2 は、サイクリン A とは対照的に有意な分裂回数延長をもたらさなかった。カリオタイプ解析の結果より、サイクリン A レトロウイルスを導入した82-6 細胞が染色体の欠失や転座などのさまざまな染色体異常を示したことから、サイクリン A の過剰発現は、82-6 細胞の増殖促進と平行して、何らかの DNA 障害とそれに続く修復の異常もしくは染色体分配の異常を引き起こすことが示唆された。サイクリン A の過剰発現がガンを引き起こす分子機構に関してはこれまで不明であったが、今回の実験結果からサイクリン A が誘起する染色体異常が細胞ガン化の誘因となりうることが示唆された。サイクリン A と CDK 1 レトロウイルスを導入した82-6 細胞も親株と同様に老化して最終的に増殖を停止するが、レトロウイルスを導入した82-6 細胞の集団のうち、非常に低い頻度で、100回以上の細胞分裂能を示す不死化した2つのクローンが現れた。興味深いことに、独立して得られた2つのクローンは共通の染色体異常を示した。不死化した細胞の染色体の FISH 解析により、p16、Rb、p53 などの老化に関係するガン抑制遺伝子の片方の遺伝子座の欠失と、老化に関係する CDK インヒビター p21 の発現消失が両方のクローンで認められたことから、正常細胞が細胞老化の障壁を迂回して不死化するにあたってこれらガン抑制遺伝子と CDK インヒビターの機能低下が必要であることが示唆された。このように独立のクローンで観察された共通の染色体異常のいくつかが不死化の過程と密接に関連していることが予想される。