琉球大学学術リポジトリ

安定した遺伝子発現の得られるヒト人工染色体の開発と応用

メタデータ	言語: 出版者: 要匡 公開日: 2009-12-16 キーワード (Ja): 遺伝子, 発現制御, ミニ染色体, 遺伝子治療 キーワード (En): DT40, Cre, loxP, position effect, human artificial chromosomes, BAC, chromosome X, site specific recombination, gene therapy 作成者: 要, 匡, 成富, 研二, 柳, 久美子, Kaname, Tadashi, Naritomi, Kenji, Yanagi, Kumiko メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/13993

安定した遺伝子発現の得られる
ヒト人工染色体の開発と応用

（研究課題番号：17590289）

平成17年度～平成18年度　科学研究費補助金
（基盤研究（C））研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者　　要　　匡
（琉球大学医学部　助教授）

目　次

Abstract …… 2
はしがき …… 3
研究組織 …… 4
交付決定額…… 4
研究発表 …… 4
研究成果 …… 8
　１．研究目的 …… 8
　２．研究の概要 …… 9
　　１）多様なミニ染色体ベクターの作製 …… 9
　　1-1 ミニ染色体改変用プラスミドベクターの構築
　　1-2 ミニ染色体の改変
　　1-3 改変ミニ染色体への BAC 導入
　　２）BAC 導入ミニ染色体における遺伝子発現と安定性 …… １２
　３．まとめ …… １３
研究発表（学会誌等）…… １５

Abstract of Research Project, Grant-in-Aid for Scientific Research (2006).

Construction and application of human artificial chromosome vectors for stable gene expression by minichromosome-modifying system.

Head Investigator: Tadashi Kaname, M.D., Ph.D.
University of the Ryukyus, Faculty of Medicine, Associate Professor.

In order to know the position effect and stability of gene expression at various regions in human artificial minichromosomes, we have constructed four types of modified minichromosomes, which was introduced a BAC harboring a whole gene unit (*HPRT*, or *Factor IX*) into various sites such as near telomere, near centromere, and euchromatic region, and we investigated intensity and stability of the gene expression.

Fist, we constructed plasmid vectors, which could introduce lox71 (mutant *lox*P) into the human minichromosome at various sites by homologous recombination or telomere targeting method. We also constructed a telomere-targeting vector, which could replace the *neoR* gene to the *ZeoR* gene located at the telomeric region in the minichromosome.

Then, we modified the minichromosome using the vectors above, and introduced a BAC (HPRT-66 or F9-66) into the modified minichromosomes by the Cre/mutant *lox* recombination system. The efficiencies of BAC introduction into the minichromosomes were approximately 75% and 70% for HPRT-66 BAC and F9-66 BAC, respectively.

Relative gene expressions of human *HPRT* gene estimated by qPCR were 100, 83, and 122, when the gene was located near telomere, near centromere, and euchromatic region, respectively. Copy number of the modified minichromosomes in DT40 cells was 1 copy/nucleus (approximately 70%) or 2 copies/nucleus (approximately 30%). Relative expression of the human *HPRT* gene was 15% of authentic *Hprt* gene expression in DT40. The gene expression was not significantly changed in any modified minichromosomes after 60 days culture.

Key words: human artificial chromosomes, BAC, X centromere-based minichromosome, site specific recombination, gene therapy, DT40, position effect

はしがき

この報告書は、平成１７年度から平成１８年度の２年間にわたり日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究(C)）の助成を受けて実施した基礎的研究（課題番号17590289：安定した遺伝子発現の得られるヒト人工染色体の開発と応用）の成果をまとめたものである。

長期的な発現を目指した遺伝子治療において、効率の良いベクターの開発が熱望されている。その候補の一つとして、ヒト染色体を模した構造物、いわゆる「ヒト人工染色体」は、実験的に構築可能であり、理想的なベクターとして有望である。しかしながら、実際の導入用ベクターとしての実用化には、解決しなければならない種々の問題がある。それらのうち、人工染色体の操作性、安定した遺伝子発現、の２つの問題を解決するため、申請者らは、ヒト X 染色体由来のミニ染色体を使用して、以前より行ってきた巨大 DNA の操作技術を生かし、ミニ染色体の簡便な改変系を構築し、その有用性を検討した。本研究にて構築した人工染色体改変系、ならびに周辺の操作技術により得られた知見が、ほ乳類人工染色体研究、巨大 DNA を利用した遺伝的研究、遺伝子治療用ベクター開発研究の一助となれば幸いである。

ここに研究報告書をまとめるにあたり、助成を頂いた日本学術振興会、協力を頂いた多くの方々に感謝の意を表する。

平成 19 年 3 月

研究代表　琉球大学医学部助教授　要　　匡

研究組織

研究代表者：要　　匡（琉球大学医学部助教授）

研究分担者：成富研二（琉球大学医学部教授）
柳久美子（琉球大学医学部助手）

海外研究協力者：Dr Christine Farr (Senior Lecturer, Department of Genetics, University of Cambridge, Cambridge, UK)

交付決定額　　（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合　計
平成 17 年度	1,800	0	1,800
平成 18 年度	900	0	900
総計	2,700	0	2,700

研究発表

（1）学会誌等

1. Kaname T., McGuigan A., Georghiou A., Yurov Y., Osoegawa K., de Jong PJ., Ioannou P., Huxley C. Alphoid DNA from different chromosomes forms *de novo* minichromosomes with high efficiency. ***Chromosome Res.***, 13:411–422 (2005).
2. Miyake N., Shimokawa O., Harada N., Sosonkina N., Kawara H., Okamoto N., Ohashi H., Kurosawa K., Naritomi K., Kaname T., Nagai T., Shotelersuk V., Hou J-W., Fukushima Y., Kondoh T., Matsumoto T., Shinoki T., Kato M., Tonoki H., Nomura M., Yoshiura K-i., Kishino T., Ohta T., Niikawa N., Matsumoto N. No detectable genomic aberrations by BAC array CGH in Kabuki make-up syndrome patients. ***Am J Med Genet.***, 140A:291–293 (2006).
3. Yoshiura T., Kinoshita A., Ishida T., Ninokata A., Ishikawa T., Kaname T., Bannai M., Tokunaga K., Sonoda S., Komaki R., Ihara M., Saenko V.A., Alipov G.K., Sekine I., Komatsu K., Takahashi H., Nakashima M., Sosonkina N.,

Mapendano C.K., Ghadami M., Nomura M., Liang D-S., Miwa N., Kim D.K, Garidkhuu A., Natsume N., Ohta T., Tomita H., Kaneko A., Kikuchi M., Russomando G., Hirayama K., Ishibashi M., Takahashi A., Saitou N., Murray J.C., Saito S., Nakamura Y., Niikawa N. A SNP in the *ABCC11* gene is the determinant of human earwax type. ***Nat Genet.***, 38:324–330 (2006).

4. Niihori T., Aoki Y., Narumi Y., Neri G., Cavé H., Verloes A., Okamoto N., Hennekam RCM., Gillessen-Kaesbach G., Wieczorek D., Kavamura MI., Kurosawa K., Ohashi H., Wilson L., Heron D., Bonneau D., Corona G., Kaname T., Naritomi K., Baumann C., Matsumoto N., Kato K., Kure S., Matsubara Y. Germline *KRAS* and *BRAF* mutations in cardio-facio-cutaneous (CFC) syndrome. ***Nat Genet.,*** 38:294–296 (2006).
5. Kaname T., Yanagi K., Okamoto N., Naritomi K. Neurobehavioral disorders in patients with Aarskog-Scott syndrome affected by novel *FGD1* mutations. ***Am J Med Genet.***, 140A:1331–1332 (2006).
6. Chinen Y., Kaname T., Yanagi K., Saito N., Naritomi K., Ohta T. Opitz trigonocephaly C syndrome in a boy with a *de novo* balanced reciprocal translocation t(3;18)(q13.13;q12.1). ***Am J Med Genet.***, 140A:1655–1657 (2006).
7. Maehara H., Kaname T., Yanagi K., Hanzawa H., Owan I., Kinjo T., Kadomatsu K., Ikematsu S., Iwamasa T., Kanaya F., Naritomi K. Midkine as a novel target for antibody therapy in osteosarcoma. ***Biochem Biophys Res Commun.,*** *in press.*

（２）口頭発表

（国際学会等）

1. Kaname, T., Yanagi, K., Chinen Y., Okamoto N., Kurosawa K., Tsukahara M., Yamada M., Kondo T., Naritomi, K. Five novel mutations in the FGD1 gene in Aarskog-Scott syndrome. *55th annual meeting of the American Society of Human Genetics*. Salt Lake City, UT, USA. (2005).
2. Chinen Y., Kaname T., Yanagi K., Naritomi K. Opitz C (trigonocephly) syndrome in a boy with reciprocal translocation t(3;18)(q13.13q12.1). *55th annual meeting of the American Society of Human Genetics*. Salt Lake City, UT, USA. (2005).
3. Tohma T., Yanagi, K., Nakazato I., Kaname, T., Naritomi, K. ARC syndrome

in two patients with no mutation in *VPS33B*. *55th annual meeting of the American Society of Human Genetics*. Salt Lake City, UT, USA. (2005).

4. Kaname T., Naritomi K., Niikawa N. A responsible gene for the Opitz C syndrome. *The Opitz Trigonocephaly Syndrome Family Network Conference*. Chicago, IL, USA. (2006).
5. Kaname T., Yanagi K., Maehara H., Kubota Y., Oike Y., Naritomi K. Expression and function of a member of the immunoglobulin superfamily, CD96. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology*. Kyoto, Japan. (2006).
6. Yanagi K., Kaname T., Maehara H., Chinen Y., Kurosawa K., Okamoto N., Naritomi K. Functional analysis of FGD1 mutant proteins expressed in Aarskog-Scott syndrome (AAS) patients. *20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology*. Kyoto, Japan. (2006).
7. Yanagi K., Kaname T., Chinen Y., Okamoto N., Kurosawa K., Naritomi K. Functional analysis of mutant form of FGD1 proteins found in patients with Aarskog-Scott syndrome. *FASEB Summer Research Conference*. Saxtons River, VT, USA. (2006).
8. Kaname, T., Yanagi, K., Maehara H., Kanaya F., Oike Y., Naritomi, K. A member of the immunoglobulin superfamily, CD96 contributes to cell adhesion and growth. *56th annual meeting of the American Society of Human Genetics*. New Orleans, LA, USA. (2006).
9. Maehara H., Kaname, T., Yanagi, K., Naritomi, K., Owan I., Kanay F. Midkine as a prognostic marker and therapeutic target in osteosarcoma. *56th annual meeting of the American Society of Human Genetics*. New Orleans, LA, USA. (2006).
10. Yanagi K. Neurobehavioral disorders in patients with Aarskog–Scott syndrome affected by *FGD1* mutations. *OIST-Korea Joint Workshop on Neuroscience and Beyond*. Okinawa, Japan. (2007).

(国内学会)

11. 要　匡、岡本伸彦、黒澤健司、塚原正人、近藤達郎、成富研二．日本人 Aarskog-Scott 症候群患児における *FGD1* 遺伝子変異．　第 108 回日本小児科学会学術集会　東京　2005 年 4 月．
12. 前原博樹、要　匡、柳久美子、半澤浩明、金城貴夫、大湾一郎、成富研二、岩政輝男、金谷文則．骨肉腫における予後因子としてのミッドカインの発

現と抗体による増殖阻害効果．第 38 回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会．横浜　2005 年 7 月．

13. 要　匡、柳久美子、A. McGuigan, K. Osoegawa, P. J. De Jong, P. Ioannou, C. Huxley, 成富研二．　高率に人工染色体を形成するヒトアルフォイド DNA の単離．日本人類遺伝学会　第 50 回大会．倉敷　2005 年 9 月．
14. 柳久美子、要　匡、成富研二．母由来１４番染色体長腕遠位部トリソミーの一例．日本人類遺伝学会　第 50 回大会．倉敷　2005 年 9 月．
15. 要　匡、柳久美子、前原博樹、成富研二．免疫グロブリンスーパーファミリー, CD96 の機能解析．第 28 回日本分子生物学会年会．福岡　2005 年 12 月．
16. 柳久美子、要　匡、前原博樹、成富研二．FGD1 タンパクと新規スプライス変異により生じる短縮型タンパク（8B FGD1）の機能解析．第 28 回日本分子生物学会年会．福岡　2005 年 12 月．
17. 要　匡、柳久美子、知念安紹、岡本伸彦、成富研二．*FGD1* 遺伝子変異による行動発達障害の可能性．　第 46 回日本先天異常学会学術集会．山形 2006 年 6 月．
18. 前原博樹、半澤浩明、大湾一郎、金谷文則、要 匡、柳久美子、成富研二．骨肉腫に対する治療薬としてのミッドカイン siRNA とビタミン K2．第 39 回整形外科学会　骨・軟部腫瘍学術集会．札幌　2006 年 7 月
19. 要　匡、柳久美子、Christine Farr、成富研二．様々な位置へ遺伝子導入が可能なミニ染色体ベクター系の構築．日本人類遺伝学会　第 51 回大会．米子　2006 年 10 月．
20. 柳久美子、要　匡、成富研二．　アーシュコグ・スコット症候群患者に認められた FGD1 変異タンパクの機能解析．　日本人類遺伝学会　第 51 回大会．　米子　2006 年 10 月．
21. 要　匡、柳久美子、前原博樹、成富研二．免疫グロブリンスーパーファミリー, CD96 による細胞―細胞間結合の亢進．　日本分子生物学会 2006 フォーラム．　名古屋　2006 年 12 月．
22. 柳久美子、要　匡、知念安紹、岡本伸彦、黒澤健司、成富研二．Aarskog-Scott 症候群患者に見いだされた変異 FGD1 タンパクの機能解析．　日本分子生物学会 2006 フォーラム．　名古屋　2006 年 12 月．

研究成果

1．研究の背景と目的

我々は、ヒト人工染色体を、遺伝子治療や遺伝子導入のための実用的ベクターとして使用可能にすることを目指し、効率の良い染色体ベクター作製システムの構築を試みている。

遺伝子導入、特に遺伝性疾患の遺伝子治療には、宿主の染色体に影響を与えず、安定した発現を得るのが理想的である。

相同組換えを利用して、ヒト染色体を核内で断片化すること（所謂 top-down アプローチ）により得られたミニ染色体は、人工染色体として安定性に富み、宿主染色体に影響を与えないベクターとして注目されている。しかしながら、このミニ染色体をベクターとして使用するためには、ミニ染色体を効率よく改変できる系の構築が必要不可欠である。

既に我々は、ミニ染色体を遺伝子導入ベクターとして使用できるよう改変し、ミニ染色体のテロメア側へ BAC（細菌人工染色体）DNA を効率よく挿入できる系を構築した。BAC は、約 300kb までの DNA を保持できるため、制御領域をも含む遺伝子全体をミニ染色体へ組込むことができた。また、導入した遺伝子発現も認められた。ところが、挿入位置はテロメア近傍であり、ミニ染色体への挿入位置により遺伝子発現が影響を受ける可能性が示唆された。遺伝子治療ベクターなど安定な遺伝子発現には、位置効果の排除は必要である。

そこで、本研究では、ミニ染色体への目的 DNA の導入において、位置効果、クロマチン構造の影響を受けない組込み系を構築することを目的として、ミニ染色体の様々な部位に BAC を効率よく導入できる系を構築し、それぞれの挿入部位での遺伝子発現、安定性を比較、より安定で実用的な遺伝子導入ベクター作製系の確立を目指した（図１）。

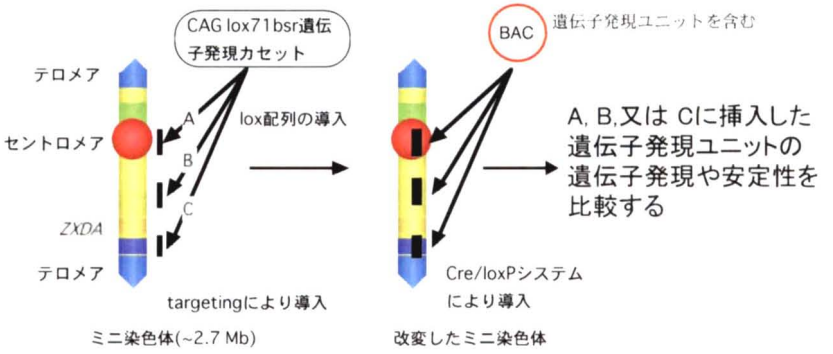


図１　研究の流れ

2．研究の概要

1）多様なミニ染色体ベクターの作製

ヒトX染色体由来ミニ染色体（IKNFA3）（図２）上のいろいろな部位（テロメア側、セントロメア内、中間領域）での遺伝子発現の影響や外来遺伝子挿入時の染色体の安定性を検討するため、それぞれの領域にBAC（ゲノム遺伝子を含む）を導入できるミニ染色体を個別に作製した。ミニ染色体の改変は、ニワトリpre-B 細胞株，DT40細胞内で行った。

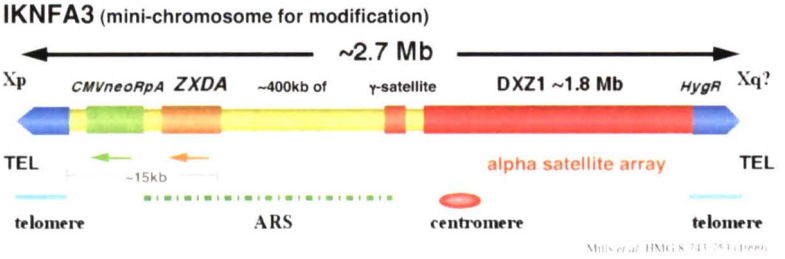


図２　ヒトX染色体由来ミニ染色体の構造

1-1 ミニ染色体改変用プラスミドベクターの構築

まず、任意のBACをミニ染色体上のいろいろな部位へ挿入できる系を構築するために必要なミニ染色体改変用プラスミドを作製した。ミニ染色体へのBAC挿入は、効率の向上を目指し、変異型*lox*配列（*lox*71, *lox*66）を用いた系を使用した（図３）。

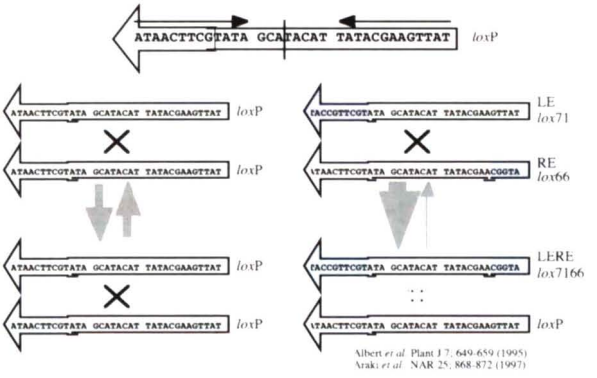


図３　Cre/変異lox組換えシステム

この変異lox71を、相同組換えによりミニ染色体へ導入するためのプラスミドベクターを作製した（図４）。変異lox71挿入用ベクターは、以前より使用している*blasticidinR*発現カセット（CAG lox71bsr）にセントロメア配列（アルフォイドX配列）、または*ZXDA*遺伝子上流の非アルフォイド配列を相同部

分として組込み作製した（図４）。また、ミニ染色体へ導入する BAC は *neoR* 遺伝子を含んでいるので、ミニ染色体テロメア側にある薬剤耐性遺伝子（*neoR* 遺伝子）を *ZeocinR* 遺伝子へ変更するための telomere targeting vector も新たに作製した。（図４）

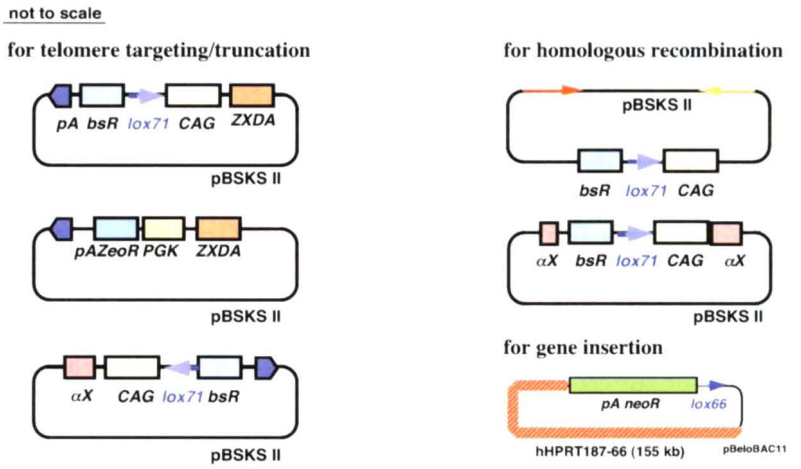


図４　ミニ染色体改変用プラスミドおよび挿入用 BAC

1-2 ミニ染色体の改変

1-1 で作製した相同組換え用ベクターを用い、ミニ染色体の各部位へ CAG lox71bsr カセットをそれぞれ挿入した改変ミニ染色体を作製した。同時に、テロメア側（短腕側）を 1-1 で作製した telomere targeting vector を用いて *Zeocin* 耐性遺伝子へ変更した。　（図５：改変ミニ染色体，図６：作製法）

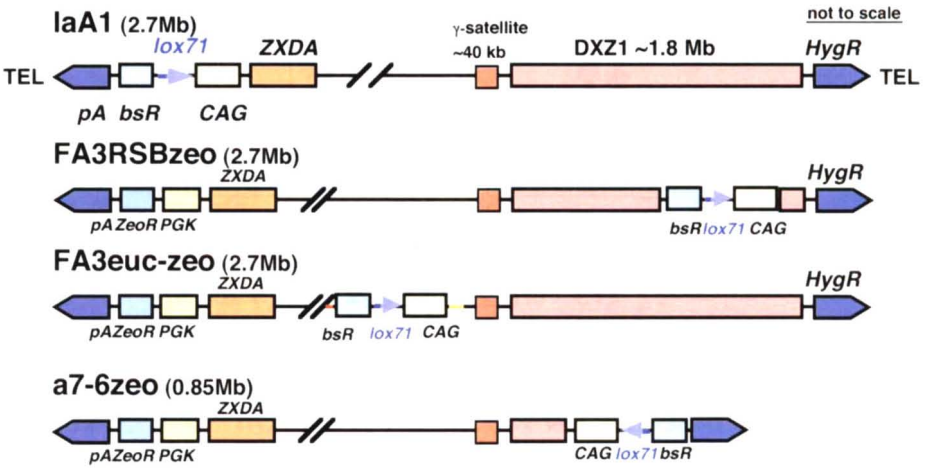
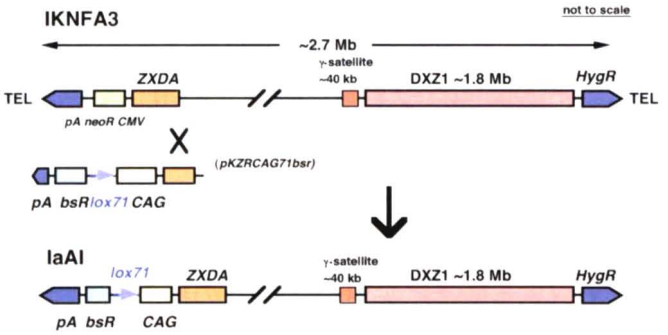
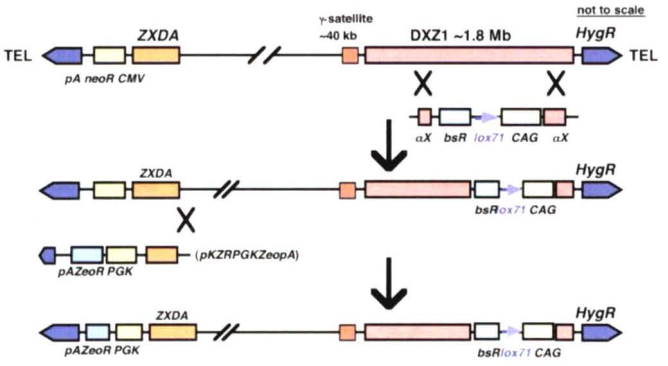


図５　改変ミニ染色体

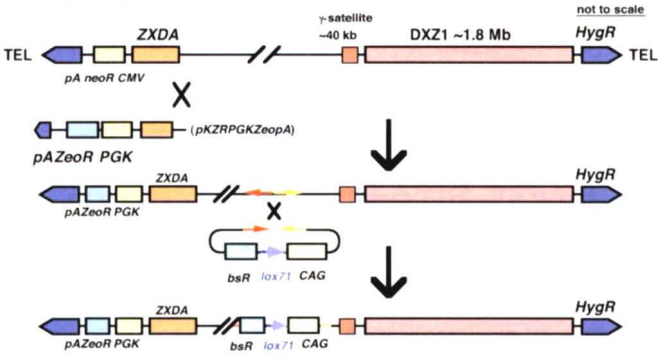
A：テロメア側挿入用ミニ染色体（IaAI）



B：セントロメア内挿入用ミニ染色体（FA3RSBzeo）



C：中間領域挿入用ミニ染色体（FA3euc-zeo）



D：短縮セントロメア内挿入用ミニ染色体（α7-6zeo）

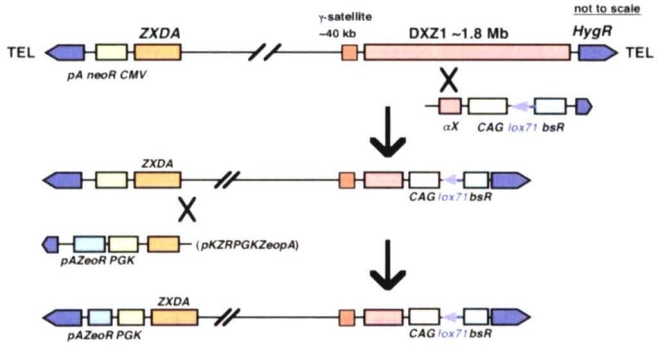


図６　作製法（ミニ染色体改変法）

1-3 改変ミニ染色体への BAC 導入

1-2 で作製した改変ミニ染色体へ遺伝子発現ユニットを含む BAC (HPRT BAC66D2, F9BAC66D2)を Cre/変異 lox 系を利用して導入した（図７）。それぞれの BAC を Cre 発現ベクターと共に、電気穿孔法（750V, 25μF, 200Ω）にて改変ミニ染色体を保持している DT40 細胞へ導入し、G418 耐性クローンについて、PCR, FISH, PFGE 法を用い、完全でかつ正確な導入について確認した。HPRTBAC66D2（約 170kb）を用いた場合の挿入効率は、約 75%、F9BAC66D2（約 180kb）を用いた場合の挿入効率は、約 70%で、改変ミニ染色体による導入効率の差は認められなかった。

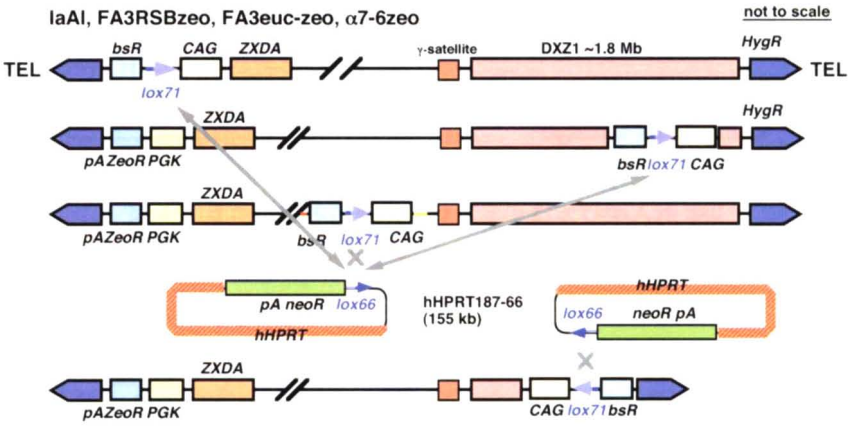


図７　改変ミニ染色体への BAC 挿入（HPRTBAC66D2）

2）BAC 導入ミニ染色体における遺伝子発現と安定性

改変ミニ染色体のテロメア側、セントロメア内、中間領域のそれぞれの領域に挿入された BAC 内遺伝子（*HPRT*）の発現について検討した。

定量 PCR によりそれぞれのミニ染色体クローン（DT40 細胞）間の発現比較を行ったところ、テロメア側に BAC を挿入したミニ染色体クローンのヒト *HPRT* 遺伝子発現を 100 とした場合、セントロメア側挿入クローンでは 83（平均値）、中間領域挿入クローンでは 122（平均値）であった（図８）。また、内在性 *HPRT* 遺伝子発現量に対する、ヒト *HPRT* 遺伝子発現量は約 15%であった。

細胞核あたりのミニ染色体のコピー数は、１コピー（約 70%）または２コピー（約 30%）であった。細胞分裂に伴うミニ染色体の喪失率は、約 0.1%であった（α7-6zeo を除く）。60 日培養後の喪失率も、大きな変化は認められなかった。

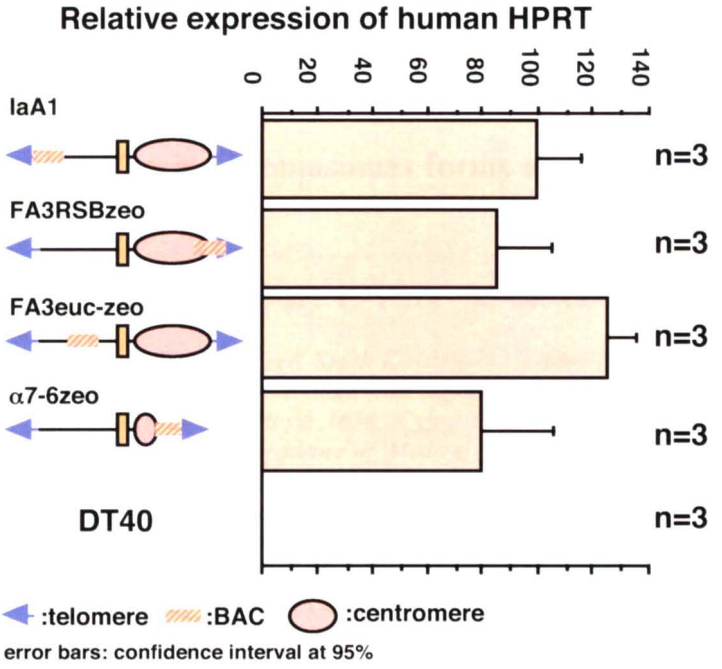


図８　各ミニ染色体におけるヒト *HPRT* 遺伝子発現

３．まとめ

本研究により、top-down アプローチにより作製されたヒトミニ染色体を染色体ベクターとして使用するため、ヒトミニ染色体のいろいろな領域に遺伝子全体を含む巨大な DNA を効率よく挿入・改変・操作できる系が構築できた。この系を用いて、一つの（または数個の）遺伝子全体を含むゲノム DNA をもつ種々のパターンの人工染色体作製が可能となり、広く応用できると考えられる。BAC のような巨大な DNA を染色体に挿入する場合、劇的な position effect は認められず、安定的遺伝子発現に有効であると考えられたが、いくつかの課題も判明した。１）長期培養下（6 ヶ月以上）での遺伝子発現における、ヘテロクロマチン化等の影響、２）*in vivo* における安定的発現のための、最適な挿入領域の存在の有無、３）ヒトへ応用する場合の効果的な染色体導入法、などである。

より実用的な染色体ベクターの構築へ向け、これら課題の解決が必要であると考えられる。