

新たな遺伝子クローニングシステムNACSを応用した疾患遺伝子の同定

●荒瀬 尚^{1,2)}

1) 千葉大学大学院医学研究院 2) 大阪大学微生物病研究所

研究の目的と進め方

ヒトやマウスの全遺伝子配列の解読が終わりつつあり、それぞれの遺伝子産物がどのような機能を担っているかを解明することが今後の課題である。そこで、私どもは、新たな機能的遺伝子クローニングシステムとしてNACS (NFAT Activating Molecule Cloning System)を開発した(特許出願中、論文投稿中)。本法は、リンパ球の活性化分子の同定を目的として開発したものであるが、本システムのレポーター部等を改変することにより、細胞内の様々なシグナル伝達機構に關与する分子のスクリーニングが可能になる。そこで、本研究では、NACSの応用法を開発することによって、新たな細胞活性化機構、細胞分化機構の解明を目指し、それを基にヒト疾患遺伝子の同定を目的とする。

2003年度の研究の当初計画

1) 新たな遺伝子検索法NACSによる新規免疫細胞活性化関連分子の同定

現在のところ、CD8とのキメラ分子を産生するレトロウイルスライブラリーはマウス脾臓細胞とNK細胞のものしかない。そこで、より効率の良いライブラリーの作成方法を確立するとともに、ヒトのリンパ球各種サブセットを始め、骨髄等様々な臓器よりCD8キメラライブラリーを作製し、リンパ球活性化関連分子の検索を行う。

2) 新たなレポーターシステムの作製

NFAT-GFPレポーター細胞では主にリンパ球活性化関連分子しかクローニングできない。そこで、様々な細胞活性化機構に關与する遺伝子を明らかにするために、NF- κ B, CRE, AP-1等の各種レポーター遺伝子を発現した高感度レポーター細胞を作製する。また、GFP以外に、CD8等の細胞表面分子を用いた検出系を確立し、目的の細胞の採取を容易にする。

2003年度の成果

1) 新たなCD8キメラライブラリーの作成

私どもは、CD8キメラライブラリーより、新規の分子や既知のシグナル伝達分子をクローニングしたが、ライブラリーのサイズが大きすぎるために、クローニングできない分子があることが判明した。そこで、ライブラリーサイズの適性化をすることにより、より効率的なスクリーニングが可能になった。実際新たなライブラリーを用いてスクリーニングすることにより、新規のリンパ球活性化制御分子をクローニングすることに成功した。

2) 新たなレポーターシステムの作製

新たなレポーターシステムとして、GFPの代わりにヒトCD8分子を用いたスクリーニングシステムを開発した。本レポーター細胞を用いることにより、今まではセルソーターを使う必要があったが、磁気ビーズを用いた精製が可能になり、短時間で多量の細胞のスクリーニングが可能になった。

国内外の成果の位置づけ

NACS法は、レトロウイルスcDNAライブラリーの特徴を最大限に利用したユニークな遺伝子検索システムである。NACS法はレポーター遺伝子の改変や、cDNAの架橋法を改良することによって、様々な応用法が考えられる。また、単に活性化シグナルだけでなく、アッセイシステムを変更することにより、抑制化分子の検索や細胞の分化誘導に關与した分子の検索にも応用可能である。本システムは、私どもが開発した新たな機能的遺伝子検索をさらに発展させるものであり、国内外を通じても非常にユニークな研究である。

達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

適性サイズのcDNAライブラリーを作製するのが、予想外に難しく、全体として、他のライブラリーの作成に遅れがでてしまった。

今後の課題

より少ない細胞から、高品位のライブラリーを作る手法の確率が課題である。また、低バックグラウンドで高感度のレポーター細胞の作成も重要課題である。

成果公表リスト

- 0404081207
Shiratori, I., Ogasawara, K., Saito, T., Lanier, L. L., Arase, H. Activation of Natural Killer Cells and Dendritic Cells upon Recognition of a Novel CD99-like Ligand by Paired Immunoglobulin-like Type 2 Receptor. *J. Exp. Med.* 199:525-533 (2004).
- 0404081307
Carlyle, J.R., Jamieson, A.M., Gasser, S., Clingan, C.S., Arase, H., Raulet, D.H. Missing self-recognition of Ocil/Clr-b by inhibitory NKR-P1 natural killer cell receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:3527-3532 (2004).