

分子病態解析を行うための簡便なBAC改変システムの開発

●要 匡¹⁾ ◆柳 久美子¹⁾ ◆成富 研二¹⁾ ◆Huxley, Clare²⁾

1) 琉球大学医学部医科遺伝学分野 2) Molecular and Cellular Medicine, Imperial College London (UK)

〈研究の目的と進め方〉

目的：1) 既に広く使用されているBAC（細菌人工染色体）ベクターを、ほ乳類細胞での形質転換に使用可能な構造へ簡便に改変できるシステムを構築すること。及び、2) 人工染色体形成能をもつヒトalphoidBAC/PACを改変し、既存のBAC, PACへ挿入可能なシステムを構築すること。以上を目的とした。

疾患の原因遺伝子確定のための、BACを用いた相補性試験や、遺伝子機能解析のためのほ乳類細胞へのBAC導入には、BACクロンの改変が必要である。

まず、1) の系を構築、完成させ、既存のBACへすぐに応用できるようにした後、2) の系の構築を行った。

〈研究開始時の研究計画〉

1) 標識遺伝子群挿入系の構築

BAC, PACの改変を行うためのベクター（pNEL, pNELI, pNEL γ , pNEL γ I）を大腸菌内（in vivo）で簡便に使用できる系を構築する。

2) ヒト人工染色体形成能をもつBAC改変系の構築

2通りのBAC, PAC改変用alphoid含BAC/PACを作成し、改変効率を検討する。

a) Cre/loxP組換えシステムによる改変系の構築

ヒト人工染色体形成能をもつalphoidBAC/PACへ、pNELIの主要部分を、通常の手法で挿入する。また、変異lox71, lox66を用いてベクター部分のみ切り離されるように改変する。改変したalphoidBAC/PACを用い、既存のBAC, PACを改変できることを確認する。線維肉腫細胞株（HT1080）などへ導入し、形質転換効率、人工染色体形成について検討する。

b) 相同組換えによる改変系の構築

人工染色体形成能をもつalphoidBAC/PACへpNELIの主要部分を組込み、さらに、pBACe3.6クローニング部位近傍の相同配列を上記alphoidBAC/PACのインサート両端へ組込む。この新規ベクターを用い、相同組換えにより、改変を行う。同様に、HT1080細胞等へ導入し、効率を検討する。

〈研究期間の成果〉

1) 標識遺伝子群挿入系の構築

改変用プラスミドベクター（pNEL, pNELI, pNEL γ , pNEL γ I）は、ネオマイシン耐性遺伝子（neoR）、EGFP遺伝子発現ユニット、loxP配列を含んでいる。また、pNELI, pNEL γ Iは直線化に必要な制限酵素（ISce-I）認識部位を含む。pNEL γ , pNEL γ IIは、 π タンパク存在下のみ機能をもつ特殊oriを使用し、操作がより簡便になっている。

これら改変用プラスミドベクターを、大腸菌内（in vivo）で使用できる系を構築した。新規に温度感受性変異型ori、アラビノース発現誘導型Cre発現ユニットを持つプラスミドを作成し、大腸菌内での一過性Creタンパク発現を可能にした。この新規ベクターと上記改変用ベクターを用いて、大腸菌内で効率よくBACへの標識遺伝

子の挿入が行えることを確認した。改変効率は、約80～90%であった。さらに、改変を行ったBACクロンをHT1080細胞へ導入し、形質転換細胞、安定な遺伝子発現が得られることを確認した。

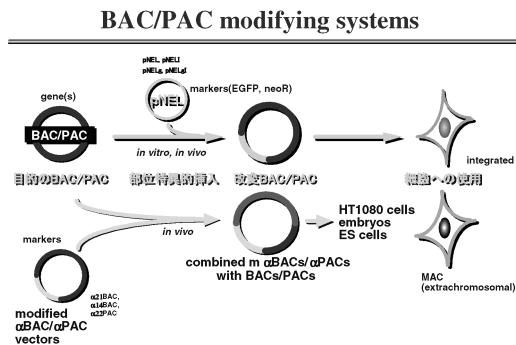
2) ヒト人工染色体形成能をもつBAC改変系の構築

ヒトセントロメア領域のalphoid配列をもつBAC/PACをライブラリー（Dr Peter de Jong, Dr Panos Ioannouより供与）より抽出後、解析し、ヒト培養細胞にてde novo人工染色体形成能をもつ、BAC/PACクロン（染色体13/21, 14, 17, 18, 22由来）を単離した。

このalphoidBAC/PACへ標識遺伝子群を組込み、さらに改変し、Cre/loxP系によりori部分が切り離され任意のBACへ挿入される系を構築した。改変は、1) で構築した大腸菌内組換え系を用いて行った。導入効率は、5～20%と高効率ではないものの、alphoidDNA、ゲノム遺伝子を含むBACが得られた。Alphoid改変BACをHT1080へ導入し、ヒト人工染色体が形成されることを確認した。遺伝子発現は、alphoidDNAが短いと高くなる傾向が認められた（論文5）。

相同組換えを利用して挿入する系も構築したが、汎用性が低く、Cre/loxPを用いたシステムが、現時点では有効と考えられた。

まとめた図を示す。



〈国内外での成果の位置づけ〉

これらベクター系について、使用許可、共同研究依頼があり、イタリア、米国、英国、イスラエル、国内の10施設以上へ供与を行った。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

人工染色体用BAC改変系は、効率のよい系が得られなかった。AlphoidDNAの不安定性と染色体形成のメカニズムが解明されていないため至適条件の検討が困難なことが原因と考えられる。

〈今後の課題〉

構築した系が広く応用できるか検証すること、及び、実用的な遺伝子治療用ベクター開発へ向け、さらに良い効率が得られる様改良を加えることが今後の課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1) 論文／プロシーディング

1. Yanagi K., Kaname T., Chinen Y., Naritomi K., Novel alternative splicing of human faciogenital dysplasia 1 gene, *Congenit Anom.*, 44 (3) , 137-141 (2004) .
2. Kozamanis G., Huxley C., Recombining overlapping BACs into a single larger BAC, *BMC Biotechnol.*, 4, 1 (2004) .
3. Miyake N. et al., Four novel NIPBL mutations in Japanese patients with Cornelia de Lange syndrome, *Am J Med Genet.*, 135A, 103-105 (2005) .
4. Yanagi K., Kaname T., Chinen Y., Naritomi K., Two novel mutations of the FGD1 gene in Japanese patients with Aarskog-Scott syndrome, *Ryukyu Med J.*, 23, 143-148 (2005) .
5. Kaname T. et al., Alphoid DNA from different chromosomes forms de novo minichromosomes with high frequency, *Chromosome Res.*, 13, 411-422 (2005) .

2) データベース／ソフトウェア 3) 特許など なし