

ジーントラップ挿入変異ライブラリーを用いた高脂血症に関する遺伝子群の同定

●信國 好俊

京都府立医科大学薬理（現：広島大学原爆放射線医科学研究所ゲノム障害病理）

＜研究の目的と進め方＞

本研究では、(1) ジーントラップ法を用いて、『コレステロールの取り込み・細胞内輸送とその調節に重要な遺伝子群の単離同定と機能解析を系統的に一括して行う』系を確立する。(2) そこから得られた遺伝子情報を基に、『コレステロールの細胞内代謝輸送ならびに高脂血症の発症と進展に重要な分子群を明らかにする』ことを目指し研究を進めた。

＜研究開始時の研究計画＞

1. 大規模ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーの作製とその有効性の確認。
2. 細胞内コレステロール代謝輸送挿入変異細胞株の単離。
3. 5' -RACE-シーケンス法によるトラップされた遺伝子の解明と、トラップされた遺伝子の野生型完全長cDNAの変異細胞株への遺伝子導入発現実験。発現実験で変異細胞の表現型が回復することを確認することで、トラップされた遺伝子が変異の真の原因遺伝子であることを証明する。

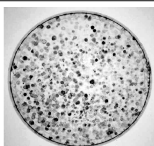
＜研究期間の成果＞

1. 約 1×10^6 のクローンからなるランダムジーントラップ挿入変異 CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞ライブラリーを作製し、この変異細胞ライブラリーでは、ジフテリアトキシン耐性細胞および細胞内コレステロール代謝輸送変異細胞の出現頻度が親細胞に比較し有意に増加することを明らかにした (図参照)。さらに、ジフテリアトキシン耐性細胞の解析から、がん抑制遺伝子OVCA1は翻訳伸長因子eEF-2のジフタマイド合成系の構成成分であることを解明した (論文1)。
2. 上記ライブラリーから、細胞内コレステロール代謝輸送変異細胞188クローンの単離に成功した (論文2)。
3. 64クローンについて解析を進め、コレステロールの細胞内代謝輸送に重要であることが判明あるいは推定されてきた既知の遺伝子 (8クローン) と、新規あるいは機能が不明なもの (28クローン) の同定に成功した (発表準備中)。

1. ランダムジーントラップ挿入変異 CHO 細胞ライブラリーの作製

CHO-K1 cell
↓ infect the ROSA β-geo
↓ 2 day
↓ spread the cells at the density of
1 x 10⁶ cells / 100 mm dish
↓ G418 selection, 7 to 12 days
800-2000 colonies / 100 mm dish

G418 耐性細胞のほとんどがβ-galactosidase
染色陽性であった



(β-galactosidase stain)

2. ジーントラップ挿入変異 CHO 細胞ライブラリーからの変異細胞株の単離

* results of the 1st round of selection

	Colonies surviving treatment, no. per 10 ⁶ cells	
	CHO-K1 parental cells	CHO-K1 gene trap library
Diphtheria Toxin Resistant Cells	1 ~ 4	20 ~ 30
Amphotericin-B Resistant Cells	2 ~ 7	40 ~ 65

＜国内外での成果の位置づけ＞

今後、大規模ジーントラップ挿入変異細胞ライブラリーを用いた、「環境毒性物質の標的分子の同定と防御機構の解明」、「薬物標的分子の同定」、「ウイルス-宿主相互作用に関する遺伝子群の解明」という新たな研究分野への応用が期待されている。

＜達成できなかったこと、予想外の困難、その理由＞

当初、gene-trap によって得られる変異細胞の大半は単純な loss-of-function mutant を予想したが、実際には haplo-insufficiency あるいは dominant negative mutant の可能性を持つと思われる物が多数みつかった。それらを証明するための機能解析に予想以上に時間がかかった。

＜今後の課題＞

本研究によって単離に成功した細胞内コレステロール代謝輸送変異株の解析を更にすすめ、細胞内コレステロール代謝輸送に関する遺伝子群とその機能を明らかにする。

＜研究期間の全成果公表リスト＞

1) 論文

1. 503221949

Nobukuni, Y., Kohno, K., Miyagawa, K., Gene trap mutagenesis-based forward genetic approach reveals that the tumor suppressor OVCA1 is a component of the biosynthetic pathway of diphthamide on elongation factor 2, J Biol Chem, 280, 10572-10575 (2005).

2. Nobukuni, Y., Higashikawa, F., Miyagawa, K., Eboshida, A., Hyperlipidemia: complex pathophysiology caused by multiple genetic and environmental factors-in considering the approaches to preventive medicine, Jpn J Hygiene, 60, 426-41 (2005).

2) 成果発表

1. 信國好俊、徳田春邦、西野輔翼. ジーントラップ法を用いた高コレステロール血症に関する遺伝子群の系統的同定法の検討. 第23回日本分子生物学会年会 (2000.12, 神戸)

2. 信國好俊、徳田春邦、西野輔翼. ジーントラップ法を用いた高コレステロール血症に関する遺伝子群の系統的同定法の検討. 第24回日本分子生物学会年会 (2001.12, 横浜)

3. 信國好俊、徳田春邦、西野輔翼. ジーントラップ法を用いた細胞内コレステロール輸送に関する遺伝子群の解明. 第74回日本生化学会 (2002.10, 京都)

4. Nobukuni, Y., Kohno, K., Miyagawa, K., Functional genetic approach utilizing a gene-trap mutant library reveals that the tumor suppressor DPH2L2 (OVCA1) is involved in the biosynthetic pathway of diphthamide on elongation factor-2, Human Genome Meeting 2005, (2005.4, Kyoto).

5. 信國好俊、河野憲二、宮川清. がん抑制遺伝子OVCA1は翻訳伸長因子eEF-2のジフタマイド構造合成系の構成成分である. 第64回日本癌学会総会 (2005.9, 札幌)