

細胞形質を指標とした疾患関連遺伝子単離・同定法の開発

●島山 昌則 ◆東 秀明

北海道大学遺伝子病制御研究所分子腫瘍分野

〈研究の目的と進め方〉

ヒトを含む種々の生物ゲノム情報が急速に蓄積されつつある現在、その情報にもとづき生成される細胞生物学的活性の迅速な同定さらにはSNPなどのゲノム多型情報に対応する生物活性定量法の開発はきわめて大きな意義をもつ。本研究は、特定の細胞形質発現をつかさどる遺伝子群を

- (1) 細胞への効率良いcDNA発現ライブラリーの導入
- (2) 目的とする細胞形質を獲得した細胞の選択・選別
- (3) 部位特異的リコンビナーゼによるcDNAの染色体からの切り出し・回収
- (4) 回収されたcDNAの再導入による細胞の再形質転換

から構成される過程を繰り返すことにより、迅速かつ包括的に濃縮・単離する系を樹立することを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

ゲノム情報が急速に蓄積されつつある現在、その情報が本来有する生物活性の迅速な同定ならびにゲノム多型情報に対応する生物活性定量法の開発はきわめて重要である。本研究は、特定の細胞形質発現をつかさどる遺伝子群を

- (1) レトロウイルスベクターを用いた細胞内へのcDNA発現ライブラリーの導入
- (2) 責任遺伝子を決定したいと考える特定の生物学的形質を獲得した細胞の選択・選別
- (3) 部位特異的リコンビナーゼによるcDNAの染色体からの切り出しと回収
- (4) 回収されたcDNAの再導入による細胞の再形質転換

から構成されるサイクルを用い、目的遺伝子を迅速に単離する系を樹立することを目的とした。

まず、テトラサイクリンオペロンおよびラクオースオペロンを組み合わせることにより新たに開発したテトラサイクリンならびにIPTGの二重制御を受ける哺乳動物細胞誘導発現プロモーター (TcIP プロモーター)の下流に酵母由来の部位特異的リコンビナーゼであるKwリコンビナーゼをコードする遺伝子断片を接続し、インターロイキン3 (IL-3) 依存性マウスリンパ系細胞株BaF3に導入する。薬剤選択後得られた安定トランスフェクタントから、IPTG添加によりKwリコンビナーゼを誘導発現する安定変異細胞株を樹立する。次に、BaF3細胞株から調整したpoly A(+) RNAを用いてcDNAライブラリーを作製し、レトロウイルスベクター (MarX) に組み込む。MarXベクターはその3'LTR内にKwリコンビナーゼの認識配列が挿入されており、プロウイルスとして宿主ゲノム内に組み込まれたcDNAはKwリコンビナーゼによりゲノムから選択的に切り出される。同ベクターにBaF3由来cDNAを挿入し、哺乳動物細胞cDNA発現ライブラリーを作製する。得られたcDNAライブラリーをレトロウイルス感染

によりBaF/Kw細胞に導入し、IL-3非依存的に増殖可能な細胞を細胞選択後、Kwリコンビナーゼ発現依存的にIL-3非依存性増殖能を喪失する細胞の選択ならびに、得られた細胞からIL-3依存的細胞増殖シグナルを伝達するシグナル分子をコードするcDNAの単離を進める。

〈研究期間の成果〉

本研究では細胞増殖能をモデル形質としてリンパ系細胞のインターロイキン依存的細胞増殖制御に関連する遺伝子群の機能的クローニング法樹立を試みた。まず、テトラサイクリンならびにIPTGの二重制御を受ける誘導発現プロモーター (TcIP プロモーター) の下流に酵母由来の部位特異的リコンビナーゼであるKwリコンビナーゼ遺伝子を接続し、インターロイキン3 (IL-3) 依存性リンパ系細胞株BaF3に安定的に導入した。得られたトランスフェクタントから、IPTG添加によりKwリコンビナーゼを誘導発現する安定変異細胞株BaF/Kwを樹立した。次に、BaF3細胞株から調整したpoly A(+) RNAを用いてcDNAライブラリーを作製し、レトロウイルスベクター (MarX) に組み込む。MarXベクターは3'LTR内にKwリコンビナーゼの認識配列が組み込まれており、プロウイルスとして宿主ゲノム内に組み込まれたcDNAはKwリコンビナーゼによりゲノムDNAから選択的に切り出される。同ベクターにBaF3由来cDNAをunidirectionalに挿入し、約130万個の独立cDNAから構成される発現ライブラリーを作製した。なお、作製したライブラリーcDNAの平均長は0.8-1.0Kb程度であった。

- 1) MarX-lacZレトロウイルスをBaF/Kwに感染させた後、Kwリコンビナーゼを誘導発現させることにより染色体DNAからのlacZ遺伝子切り出しに成功した。
- 2) レトロウイルスcDNA発現ライブラリーをBaF/Kw細胞に感染後IL-3非存在下に培養し、自律的増殖能を獲得した細胞プールを複数樹立した。Kwリコンビナーゼの誘導発現により、自律増殖能を獲得した細胞プールからのレトロウイルスベクター由来cDNA回収を進めた。
- 3) 本システムをより一般化するため、HIV由来TATトランスダクションドメインを融合したKwリコンビナーゼを作成した。この融合蛋白がTATドメイン依存的に細胞膜ならびに核膜を自由に通過する能力を有することを確認した。組み換えTAT-Kw融合蛋白を、Kwリコンビナーゼ認識配列を有するテスト遺伝子に作用させ、TAT-Kwが機能的リコンビナーゼとして働くことを確認した。

〈国内外での成果の位置づけ〉

酵母に比較し哺乳動物細胞を用いた遺伝学的解析はきわめて難しい。その原因の一つは、表現系を指標とした目的遺伝子の迅速な単離・同定システムが存在しないためである。本研究から得られる成果はこの壁を打破する革新的な遺伝子の発現クローニング系の樹立を目指すものである。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

現時点における研究遂行の最大の問題点は、Kwリコンビナーゼの誘導の結果染色体からcDNAが切り出される細胞が全細胞の10%程度に留まっている点であり、この低い切り出し効率が壁となり細胞に自律増殖能を付与するcDNAの網羅的な解析が困難な状況となっている。この理由としては、誘導時におけるKwリコンビナーゼの細胞内発現レベルが十分な域に達していない可能性が考えられる。事実、Western blot法を用いた検討からBaF/Kw細胞におけるKwリコンビナーゼの発現はきわめて低いことが確認された。ヒトゲノム上にはKwリコンビナーゼの認識配列は存在しないが、Kwリコンビナーゼの細胞内高発現は細胞生存にとって何らかの問題を有する可能性は否定できない。

〈今後の課題〉

上記問題点を克服するためTAT-Kw融合蛋白を利用することが重要な鍵をにぎると考えている。TAT-Kwは組み換え蛋白の大量調整が可能であり、細胞外から高濃度のTAT-Kwを添加することによりゲノムDNAからの効率よいcDNA切り出し・回収が可能になるものと期待される。また、DNAリコンビナーゼとしてより一般的に利用されているCreリコンビナーゼ-LoxP系の導入も考えたい。将来的にはこのシステムを利用して、細胞周期・細胞運動・細胞形態等に異常をもたらす疾患遺伝子の単離・同定をすすめたいと考えている。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Ohtoshi, A., Maeda, T., Higashi, H., Ashizawa, S., Yamada, M., Hatakeyama, M. b3-endonexin as a novel inhibitor of cyclin A-associated kinase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 267: 947-952, 2000
2. Aso, T., Yamazaki, K., Amimoto, K., Kuroiwa, A., Higashi, H., Matsuda, Y., Kitajima, S., Hatakeyama, M.: Identification and Characterization of Elongin A2, a new member of the elongin family of transcription elongation factors, specifically expressed in the testis. *J. Biol. Chem.*, 275: 6546-6552, 2000
3. Ohtoshi, A., Maeda, T., Higashi, H., Ashizawa, S., Yamada, M., Hatakeyama, M.: Human p55CDC/Cdc20 associates with cyclin A and is phosphorylated by cyclin A-Cdk2 complex. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 268, 530-534, 2000
4. Mizuguchi, R., Noto, S., Yamada, M., Ashizawa, S., Higashi, H., Hatakeyama, M.: Ras and STAT are essential and sufficient downstream components of JAKs in cell proliferation. *Jpn. J. Cancer Res.*, 93, 527-533, 2000
5. 202261311
Ashizawa, S., Nishizawa, H., Yamada, M., Higashi, H., Kondo, T., Ozawa, H., Kakita, A. and Hatakeyama, M. Collective Inhibition of pRB Family Proteins by Phosphorylation in Cells with p16INK4a Loss or Cyclin E Overexpression. *J. Biol. Chem.* 276, 11362-11370, 2001
6. 202261327
Kondo, T., Higashi, H., Nishizawa, H., Ishikawa, S.,

Ashizawa, S., Yamada, M., Makita, Z., Koike, T. and Hatakeyama, M. (2001) Involvement of pRB-Related p107 Protein in the Inhibition of S-Phase Progression in Response to Genotoxic Stress. *J. Biol. Chem.* 276, 17559-17567, 2001

7. 0202261574

Yamada, M., Kondo, T., Ashizawa, S., Takebayashi, T., Higashi, H. and Hatakeyama, M. Role of pRB-family/E2F complex in the inhibition of IL-3-dependent lymphoid cell proliferation. *Cytokine* 17, 91-97, 2002

8. 0202261327

Higashi, H., Tsutsumi, R., Muto, S., Sugiyama, T., Azuma, T., Asaka, M. and Hatakeyama, M. SHP-2 tyrosine phosphatase as an intracellular target of *Helicobacter pylori* CagA protein. *Science* 295, 683-686, 2002

9. Higashi, H., Tsutsumi, R., Fujita, A., Yamazaki, S., Asaka, M., Azuma, T. and Hatakeyama, M. Biological activity of the *Helicobacter pylori* virulence factor CagA is determined by variation in the tyrosine phosphorylation sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 14428-14433, 2002