

EBウイルスベクターを用いた系統的遺伝子機能解析システムの全構築

●三輪 佳宏

筑波大学基礎医学系

〈研究の目的と進め方〉

ゲノム解析によって大量に蓄積された塩基配列情報を元に、系統的に簡便にかつ迅速に機能解析を進めるためには、現状の解析技術だけでは不十分である。そこで、Epstein-Barrウイルスのレプリコンを応用したEBVベクターの利点を生かし、網羅的な機能解析手法の開発を目的として研究を進める。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) 大規模プロモーターライブラリーの構築
各遺伝子の発現制御に必要な十分なプロモーター・エンハンサーの効率よい回収方法の確立を目指し、ヒトゲノムDNA断片をEGFPにつないだライブラリーをEBベクター上に構築し、細胞に導入後、EGFPの蛍光を指標に様々な強度のプロモーター活性を示すDNA断片を回収する。
- 2) テトラサイクリン (Tet) 制御発現系の発展型の開発
遺伝子の中には単純な過剰発現では細胞が死んだり増殖が停止してしまうため実験が成立しないものが数多く存在する。これらの問題を解決するためには、発現状態を自在にかつ厳密にコントロールできる発現ベクターの開発が必要である。EBVベクターにTet制御発現系を組み合わせることで、簡便に短期間で改良を進めることができる系を確立し、これを利用して、発展型Tet制御発現系の構築を行う。
- 3) EBV-ベクターの可視化による核内情報の解析
DNA結合タンパク質を介してEGFPをEBVベクター上に結合させることにより、生きた細胞中でEBVベクターを可視化できるシステムを開発する。この実験系を応用することにより、複製、転写等の現象と核内のDNA配置との相関を解析することを可能にする。

〈研究期間の成果〉

- テーマ1) 転写誘導活性をもつ数百クローンのDNA断片を得ることができた。しかし、それらの大半は非常に活性の低い弱いプロモーターであり、強力なものはわずかであった。
- テーマ2) 2種類のベクターを確実に同時に細胞に導入し、安定に維持させることができるベクターを開発するためには、EGFPに加えて2カラーフローサイトメトリーに使うことができる他の蛍光タンパク質が必要であった。そこで赤色蛍光タンパク質DsRedを改良した結果、そのまま発現させると非常に低い蛍光しか示さないのに対して、tandem dimerにすることにより30倍以上の強力な蛍光を発生し非常に優れたマーカーになることを見いだした。これを使った2カラーフローサイトメトリー系の構築にも成功し、当初の目的通り確実にdouble transfectionできる発現系を構築することができた。これを用いて、厳密な制御が可能なTet発現系を構築することができた。

さらにTet結合タンパク質の動態を解析した結果、実際にはDNA結合だけではなく、分解制御を受けていることを見いだした。この成果は本プロジェクトでの期間の後

に、生きた動物個体内のTet系抗生物質をイメージングするまったく新しい実験システムの構築につながり、特許出願に結びついた。

テーマ3) EGFPをベクターDNA上に結合させて解析しようとしても、DNAに結合していないもので光ってしまうため、イメージングにおいてS/N比が非常に低くなってしまい、検出が困難であることが明らかとなった。しかしながらテーマ2)で見いだしたように、DsRedのように分子集合しない状態では分解されるが、分子集合にともなって分解が停止するという性質を利用すれば、生きた細胞中でタンパク質間相互作用を可視化するシステムを構築できると考え、これを用いればDNA上の蛍光タンパク質のみを検出することが可能になるのではないかと考えた。そこで、当初の予定を変更していくつかのDNA結合タンパク質において、タンパク質間相互作用を検出できるか解析したところ、Runx2-CBF β とNFkBp50とp65の相互作用を検出できることを見いだした。

〈国内外での成果の位置づけ〉

この研究機関内では完成できなかったが、その後さらにプロモーター領域の詳細な改良を勧めた結果、細胞への導入後4日程度でTet誘導性の発現を実現できるよい発現ベクターを構築することができた。このベクターを用いた共同研究により、4本の論文を発表することができた。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

- テーマ1) プロモーター活性を示すDNA断片そのものは非常に多数得られたが、大半は非常に低い活性しか示さず、ゲノム上での位置は特定したが、その当時これらの活性の詳細を解析するまでには至らなかった。
- テーマ3) 2年間の期間内には完成させることができなかったが、その後DsRedを用いた多因子間相互作用をマルチカラー解析できる実験系を構築することができた。

〈今後の課題〉

より高度な分子イメージングシステムの構築を進める。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 3) 特許出願 2005-269074