

# プロモータートラップによるT細胞刺激に应答して誘導される遺伝子の探索

●山崎 晶

千葉大学大学院医学研究院遺伝子制御学

## 研究の目的と進め方

本研究は、マーカー遺伝子がランダムに挿入されたプロモータートラップ細胞ライブラリーを用いて、未知遺伝子も含め、特定の発現パターンを示す遺伝子群を網羅的に解析することを目的とする。具体的には、T細胞をモデルとしてGFP、或いは $\beta$ -Geoをマーカーとしたプロモータートラップ細胞ライブラリーを構築し、様々なT細胞抗原受容体(TCR)刺激に伴って発現が上昇する遺伝子(群)を探索する。異常の解析により方法論を確率し、広く様々な細胞への応用をはかる。また、得られた細胞クローンをさらに刺激の種類、時間、免疫抑制剤の有無で比較し、特異的に誘導される遺伝子のパターンを明らかにする。すなわち、多様なT細胞応答を規定する遺伝子発現パターンを網羅的に解析するのみならず、既知遺伝子だけでなく、未知遺伝子をも対象としたクラスター解析の方法論確立を目的としたものである。

## 2001年度の研究の当初計画

- 1)改良型トラップベクターの構築
- 2)ホスト細胞の樹立とトラップ細胞ライブラリーの構築
- 3)TCR刺激によるTCR応答性クローンの取得
- 4)トラップ遺伝子の取得

## 2001年度の成果

- 1)GFP, blastidine deaminase-Geoをレポーターとしたレトロウイルストラップベクターを構築し、実際にトラップベクターとして機能することを確認した。
- 2)TCR刺激に対して死を起こさない抗原特異的T細胞ハイブリドーマ2B4.PTを樹立し、この細胞を用いてT細胞トラップライブラリーを構築した。
- 3)T細胞トラップライブラリーより、抗TCR抗体刺激に应答してレポーター遺伝子の発現が有意に上昇するクローンを、GFPを指標としたcell sorting,  $\beta$ -Geoを用いた薬剤耐性能により取得した。

4)それらの応答クローンより、RACE法を用いてトラップされた遺伝子を単離した。単離された遺伝子はそれぞれ、known4個、unknown3個であり、何れもこれまでTCR下流での誘導が報告されていないものであった。

## 国内外での研究の位置づけ

標的遺伝子がレポーター遺伝子との融合mRNAとして発現し安定化されるため、従来単離が困難であった遺伝子も取得できる可能性もある。未知遺伝子に関する情報も機能を指標に網羅的に得ることができ、有用なゲノム情報を提供できると考えられる。不応答性に陥ったB細胞の遺伝子発現パターンをマイクロアレイを用いて正常B細胞と比較した例はあるが(Glynn et al., Nature 403 : 672-6, 2000)、プロモータートラップを用いたT細胞での解析は報告がない。

## 達成できなかったこと、予想外の困難、その理由

抗TCR刺激でレポーター遺伝子の発現が有意に上昇するクローンの大量の取得とその後の刺激の差異による応答の網羅的解析。

- 1)全遺伝子を効率良くトラップした細胞ライブラリーが構築できていない可能性がある。
- 2)本研究で用いているT細胞株(2B4.PT)は、主に1本の染色体から大部分の転写が起こっていることを示唆する知見が蓄積しており、トラップ遺伝子がnullになった場合、細胞生育、増殖に必須の遺伝子であるとクローン取得が不可能となる。

## 今後の課題

- ・非感染細胞の効率良い除去、誘導能獲得クローンの薬剤選択の閾値の設定
- ・トラップベクター感染前に刺激前処理することによるT細胞応答遺伝子に偏ったトラップ細胞ライブラリーの構築。