

「生命活動のプログラム」
平成 9 年度採択研究代表者

岡崎 恒子

(藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授)

「哺乳類人工染色体の開発と個体の形質転換への利用」

1. 研究実施の概要

染色体の維持・継承には複製起点・セントロメア・テロメア（線状ゲノムの場合）が必要とされる。酵母の系ではこれら三領域を持つミニ染色体が人工的に構築され（酵母人工染色体）巨大 DNA のクローニングベクターとして使用されている。高等真核細胞では複製起点とセントロメアの DNA 配列が決定されていないが、三領域を持つことで安定維持される人工染色体を形成出来ればこれら機能領域の限定やその性質を明らかにするために有用であり、且つ人工染色体自体は宿主染色体外に存在維持されるクローニングベクターとして利用価値が高い。代表者らは人工染色体形成能によって哺乳類細胞の複製起点やセントロメア機能に必須な DNA 構造の限定や機能構造を決定する方針で研究を進めてきたが、最近ヒト培養細胞 (HT1080) に導入すると染色体外で安定に維持継承される人工染色体 (HAC 或いは MAC) を形成し得る酵母人工染色体 (α 7C5hTEL YAC; ヒト (哺乳類) 人工染色体前駆体アルフォイド YAC) の構築に成功した。この成果を基に本研究課題では、(1) 哺乳類染色体のセントロメア/キネトコアの機能構造、(2) ヒト人工染色体 (HAC) の構造・形成過程並びに安定維持に関わる領域、(3) HAC(MAC) を遺伝子導入ベクターとして使用する可能性、(4) 人工染色体のマウス胚への導入法の確立とマウス個体の発生・分化・減数分裂過程における維持率、(5) 遺伝子治療、物質生産などへの哺乳類人工染色体の利用法、等に関する研究を行う計画である。平成 10 年度に於いては以下の研究を行った。セントロメア/キネトコアの機能構造に関する研究では、CENP-A を含むセントロメア特異的ヌクレオソームの解析に進展があった。CENP-A を含むヌクレオソームを HeLa 細胞より分離し構成分子を解析した。また精製した CENP-A とヒストン H4, H2A, H2B を用いてセントロメア特異的ヌクレオソームの *in vitro* 再構成を行った。原子間力顕微鏡 (AFM) によるヌクレオソームの可視化に成功しているが、AFM の探索針にカーボンナノチューブを採用し解像力を高めることに成功した。HAC の構造に関しては、これまでの解析から 20 - 50 個の前駆体 YAC が末端領域で連結した構造が示唆されていた。連結部位の DNA 配列を解析し、ヒトテロメア配列、酵母テロメア配列、

挿入配列が順番に存在することを見出した。この結果から、導入した前駆体 YAC の末端に存在する酵母テロメア配列が挿入配列と非相同的末端結合反応により繋がり数メガ塩基対の巨大 HAC が形成されたものと推定された。HAC(MAC) を遺伝子導入ベクターとして使用するために、マウス胚で検出可能なマーカーを持ち新たな遺伝子の導入部位を備えた前駆体 YAC の構築を進めた。既存の HAC を微小核細胞導入技術を用いて異種細胞に導入する試みを開始した。この方法は今後人工染色体の利用に関して有効な手段と成り得ると考えている。

2. 研究実施内容

(1) 哺乳類染色体のセントロメア・キネトコアの機能構造の解析 (A~D各グループ):

染色体上のセントロメア・キネトコア領域の分子構造の解析並びに *in vitro* におけるセントロメアクロマチンの再構成系の構築を目指して研究を進めた。C, Aグループはセントロメア抗原蛋白 CENP-A と CENP-B に対するモノクローン抗体を作成し、これら抗体を用いて HeLa 染色体から免疫沈降法 (CHIP) によりセントロメア特異的ヌクレオソームを単離精製し、CENP-A と CENP-B が同一複合体に含まれている事を見出した。Bグループも抗 CENP-A 或いは抗 CENP-C 抗体で CHIP を行い、沈殿画分に CENP-A, CENP-B, CENP-C が同時に回収されることを見出した。これらの結果は、DNA を介してセントロメア蛋白が相互作用を持つモデルを支持している。CグループとAグループは *in vitro* でセントロメア特異的ヌクレオソームの再構成を行うために、CENP-A, ヒストン H4, CENP-B 等の多量産生系をバキュロウイルスの系を用いて確立し、また HeLa 細胞から4種のコアヒストンを分離精製し、ヌクレオソームの再構成を試みた。再構成クロマチンの構造解析には、生化学的手法並びにDグループとの共同研究による原子間力顕微鏡 (AFM)を用いた。通常4種のコアヒストンからと同様に、H3の代わりにCENP-Aを含むヒストンからもヌクレオソームの形成が観察されたが、さらに効率をあげるための条件の検討が必要である。DグループはAFMの解像力を増すために、市販のスキャン用チップの先端(直径15nm程度)にカーボンナノチューブ(直径5nm)を付着させる方法を開発した。これによりDNA鎖の纏れ等の解析においてもDNA鎖の上下関係がはっきり可視化出来るようになった。

(2) ヒト人工染色体 (HAC) の構造・形成過程並びに安定維持に関わる領域の解析 (A・Bグループ):

第一世代 HAC (7C5HT) を形成した前駆体 YAC (α 7C5hTEL YAC) (全長約100kb) には、ヒト21番染色体セントロメア α 21-I 領域由来のアルフォイド80kbp、ヒトテロメア配列と哺乳類細胞で働く選択マーカーが存在している。 α

21-I アルフォイド領域の特徴は、アルフォイド基本単位 (171bp) が 11 個連なった (1868bp) 高度繰り返し単位から構成されていて、CENP-B box (17bp) がほぼひとつおきの monomer に規則的に存在している点にある。HAC のサイズは 2-5 Mbp (前駆体 YAC の 20-50 倍のサイズ) で細胞当たり 1 コピー存在した。非選択培地中での脱落率が細胞周期当たり 0.5-1.5% であり、各種セントロメア抗原蛋白が局在することから、活性あるキネトコア構造が形成されていると考えられた (Aグループ、Bグループ)。ヒト染色体ペインティングプローブを用いた FISH によっては、HAC 中に宿主染色体由来の巨大な挿入配列は検出されないため、前駆体 YAC の巨大化が宿主染色体の断片化を伴って生じたとは考えられなかった (Bグループ)。一方、 α 21-I 配列は前駆体 YAC から切り出されるのと同じ長さの断片として HAC から切り出され、YAC のアーム部分も末端テロメア領域以外は切り出される断片の長さに変化がみられなかった (Aグループ)。これらの結果から HAC は導入した YAC が末端部分で連結して巨大化したものと推定されたので、YAC が相互に連結する領域の構造解析を行った (Aグループ)。HAC から YAC 末端部を含む 4 種の制限酵素断片 (左右末端由来各 2 種) を検出し、内 3 個のクローン化に成功し DNA 配列を決定した。これらクローンにはヒトテロメア配列、酵母テロメア配列は導入した YAC と同じ状態で保存されていて、酵母テロメアの外にヒトゲノム或いは酵母ゲノム由来の配列が繋がって存在していることが判明した。この結果から導入した YAC がテロメア配列末端で挿入配列と非相同的末端結合反応により共有結合で繋がって巨大化したものと推定された。挿入配列の役割は今後の研究課題である。 α 21-I 配列アルフォイド配列に活性セントロメア・動原体構造形成能があるか否か、また HAC 形成にはアルフォイド領域の長さがどの程度必要かを検討するために、前駆体 YAC の α 21-I アルフォイド配列を片側から種々の長さに欠失したシリーズを作成し、形質転換細胞を得た。欠失の度合いと人工染色体形成能或いは安定性との間の相関を解析中である (Bグループ)。

(3) 各種哺乳類細胞で人工染色体を遺伝子導入のベクターとして使用するための技術の開発 (Aグループ、Eグループ) :

この研究の重要課題の一つは、HAC を高等真核細胞への遺伝子導入のベクターとして使用する可能性を探ることにある。10 年度には様々な実験系に対応出来る第二世代の YAC ベクターの構築を行った (Aグループ、Eグループ)。また前駆体 YAC に新たに巨大遺伝子を導入する方法の開発にも着手した。さらに HAC に直接遺伝子を導入する方法の開発や HAC を微小核細胞を介して新たな細胞に導入する技術の検討も行った (Aグループ)。

(4) 人工染色体のマウス胚への導入法の確立とマウス個体の発生・分化・減数分裂過程における維持率の解析 (A、Eグループ) :

マウスの個体レベルで人工染色体の維持を解析するためには、人工染色体前駆体 YAC の導入された細胞を個体中で簡単に見分ける検出法の開発が必要である。このために GFP 或いは β -geo を挿入した人工染色体前駆体 YAC を構築しつつある。この完成を待って ES 細胞の形質転換を行い、色づけされたキメラマウスの作出へと進む計画である。個体発生の過程での人工染色体の安定性が明らかになったら、減数分裂を経た生殖細胞への伝達機構を解析し、人工染色体を個体を対象としたベクターとして使用するための条件や、人工染色体による遺伝子治療法開発のための基礎データを得たいと考えている。

3. 主な研究成果の発表 (論文発表)

- J. Iwahara, T. Kigawa, K. Kitagawa, H. Masumoto, T. Okazaki, S. Yokoyama:
A helix-turn-helix structure unit in the human centromere protein B(CENP-B).
EMBO Journal, 17, 827-837 (1998)
- M. Ikeno, B. Grimes, T. Okazaki, M. Nakano, K., Saito, H. Hoshino, N. I. McGill, H. Cooke and H. Masumoto:
Construction of YAC based mammalian artificial chromosomes.
Nature Biotech., 16, 431-439 (1998)
- C. Obuse, T. Okazaki and H. Masukata:
Interaction of transcription factor YY1 with a replication-enhancing element, REE1, in an autonomously replicating human chromosome fragment.
Nuc. Acids Res., 26, 2392-2397 (1998)
- Y. Ogawa, T. Okazaki and H. Masukata:
Association of autonomous replication activity with replication origins in a human chromosome.
Exp. Cell Res., 243, 50-58 (1998)
- K. Yoda, S. Ando, A. Okuda, A. Kikuchi and T. Okazaki:
In vitro assembly of the CENP-B/ α -satellite DNA/core histone complex:
CENP-B causes nucleosome positioning
Genes to Cells, 3, 533-548, (1998)
- H. Masumoto, M. Ikeno, M. Nakano, T. Okazaki, B. Grimes, H. Cooke and N. Suzuki:
Assay of centromere function using a human artificial chromosome.
Chromosoma, 107, 406-416, (1998)

他 4 件