「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。これら三領域を持ち安定維持される哺乳類人工染色体を形成出来れば、機能領域の研究に有用であり、且つ人工染色体は宿主染色体外に安定に維持される挿入容量の高い新しいタイプのクローニングベクターとしても利用価値が高いと期待される。代表者らは、アルフォイド配列とヒトテロメア配列を持つ酵母人工染色体（α7C5hTEL YAC）を前駆体として、ヒト培養細胞HT1080中にヒト人工染色体 (HAC)を形成することに成功している。この成果を基に本研究課題では、⑴ヒト染色体セントロメア/キネトコアの機能構造解析と構造の可視化、⑵ヒト並びに哺乳類細胞で安定維持される人工染色体（HAC或いはMAC）の構築と必須領域の構造、⑶人工染色体を遺伝子導入ベクターとして使用するための技術開発、⑷人工染色体のマウス胚への導入法の確立とマウス個体における維持と遺伝子発現、⑸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ことを目的としている。

平成11年度は⑴、⑵、⑶の項目に関する研究を重点的に行い、ヒトセントロメアクロマチンの特異的構成因子の決定、セントロメア特異的ヌクレオソームの再構成、特異的アルフォイド配列と鎖長に依存した人工染色体形成、ベクター機能を持つHACの構築等に成功した。今後は⑷、⑸の項目についても解析をすすめる計画である。

２．研究実施内容

⑴　a.セントロメア特異的クロマチンの単離とその構成因子の解析：ヒト培養細胞を用いて染色体上のセントロメア・キネトコア領域の分子的構造（特異的DNA配列と構成蛋白因子）を明らかにする研究を行った。セントロメア構造蛋白CENP-A, CENP-B, CENP-C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ヒト培養細胞よりクロマチン免疫沈降法（CHIP）によりセントロメアクロマチンを単離精製する方法を確立した。CENP-AはヒストンH3のバリアントで活性セントロメア領域のヌクレオソームの構成成分と考えられ

ている。そこでグリセロール濃度勾配遠心法でヒト細胞クロマチン断片を分画した後、抗CENP-A抗体を用いてCHIP法でCENP-A含有クロマチンを回収し、DNA分画はクローン化後配列を決定し、蛋白分画は抗体反応により解析した。解析結果は、CENP-Aヌクレオソームが特殊なアルフォイド配列上に特異的に形成されていること、CENP-A、CENP-B、CENP-CがDNAを介して同一のクロマチン上に複合体を形成していることを示した。この結果はヒトセントロメアクロマチンの分子レベルでの基本構造の一部を明らかにした重要な成果である（依田、舛本、岡崎グループ）。また、セントロメア蛋白間の相互作用を酵母Two　hybrid 系を用いて解析し、CENP-BとCENP-C間の相互作用を見い出し作用領域を限定した（舛本グループ）。

b. セントロメア特異的ヌクレオソームの再構成系の構築と構造の可視化: In vitroでセントロメア特異的ヌクレオソームを再構成するために、CENP-A,ヒストンH4等をバキュロウイルス系で多量発現し精製した。また4種のコアヒストンをHeLa細胞より精製分離した。アルフォイド配列を含む環状DNAとこれらヒストン蛋白、NAP-1, Topo I を用いてヌクレオソーム再構成を行い、再構成ヌクレオソームの構造解析を生化学的手法と原子間力顕微鏡（AFM）で行った。H2A, H2B, H4の存在下でCENP-AはH3の代わりにヌクレオソームを形成するがその構造は通常のヌクレオソームと基本的には同じであった。DNA配列に対する特異性は見られなかった（依田、竹安、岡崎グループ;Proc. Natl. Acad. Sci., in press)。この系はCENP-Aヌクレオソームに配列特異性を付加する因子の検索やキネトコア再構成に道を拓く点で重要である。

⑵　ヒト並びに哺乳類細胞で安定維持される人工染色体（HAC或いはMAC）の構築と必須領域の構造：

我々はヒト21番染色体アルフォイド領域（α21-1;CENP-B box がほぼ一つおきのアルフォイドモノマーに存在する領域)80kbpとヒトテロメア配列を持つ前駆体YAC DNAをヒト細胞に導入して、ヒト細胞中で安定維持されるHACを形成させることに成功している。構造解析の結果から、HACは前駆体YACがテロメア末端で20-50個繋がり巨大化した構造であることが判明した。従ってHAC中 には20-50個の80kbアルフォイド配列が非アルフォイド配列（YAC腕配列）で分断された状態で存在している点が、メガ塩基対の連続するアルフォイド配列から成る宿主染色体セントロメアの構造と相違している（岡崎、舛本グループ）。YAC中のアルフォイドの鎖長と安定な人工染色体形成能との関係を決定するために、アルフォイド配列を片側から種々の長さに欠失したYACを構築し人工染色体形成能を比較したところ、人工染色体形成能もその安定性もアルフォイド配列が短くなるとともに下落することが判明した（舛本グループ）。

⑶　人工染色体を遺伝子導入ベクターとして使用するための技術開発:

様々な哺乳類細胞で遺伝子導入ベクターとして使用可能な人工染色体の構築を試みた。既存の前駆体YACの左腕にlox部位を挿入し、このYACを用いてヒト細胞中でHACを構築した。次いでヒト細胞中でCre蛋白を発現させて人工染色体中に新たな遺伝子を挿入することに成功した。今後遺伝子発現の条件や安定性を決定し、利用にむけて更に改良を試みる計画である。

３．主な研究成果の発表（論文発表）

○K. Yamada, H. Ogawa, S. Honda, and T. Okazaki : A GCM Motif Protein Is Involved in Placenta-specific Expression of Human Aromatase Gene. J. Biol.Chem.; 274, 32279-32286, 1999.

○M. Ohtsuka, S. Makino, K. Yoda, H. Wada, K. Naruse, H. Mitani, A. Shima, K. Ozato, M. Kimura and H. Inoko : Construction of a Linkage Map of the Medaka (Oryzias latipes) and Mapping of the Da Mutant Locus Defective in Dorsoventral Patterning, Genome Research, 9, 1277-1287, 1999.

○S. Akita, H. Nishijima, Y. Nakayama, F. Tokumasu and K. Takeyasu : Carbon Nanotube Tips for a Scanning Probe Microscope: Their Fabrication and Properties. J. Phys. D: Appl. Phys., 32; 1044-1048, 1999.

○H. Nishijima, S. Kamo, S. Akita, Y. Nakayama, K.I. Hohmura, S.H. Yoshimura and K. Takeyasu : Carbon-nanotube Tips for Scanning Probe Microscopy : Preparation by a Controlled Process and Observation of Deoxyribonucleic Acid. Appl. Phys. Lett., 74 : 4061-4063, 1999.

○M.H. Sato, K. Ura, K. I. Hohmura, F. Tokumasu, S.H. Yoshimura, F. Hanaoka and K. Takeyasu : Atomic Force Microscopy Sees Nucleosome Positioning and Histone HI-induced Compaction in Reconstituted Chromatin. FEBS Lett., 452: 267-271, 1999.

○C. Yoshida, F. Tokumasu, K.I. Hohmura, J. Bungert, N. Hayashi, T. Nagasawa, J.D. Engel, M. Yamamoto, K. Takeyasu, K. Igarashi : Long-range Interaction of cis-DNA Elements Mediated by Architectural Transcription Factor Bachl. Genes to Cells, 4 : 643-655,1999.