

「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(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、(1)ヒト染色体セントロメア/キネトコアの機能構造解析、(2)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、(3)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、(4)人工染色体のマウスへの導入法の確立とマウス個体における人工染色体の維持と遺伝子発現、(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ことを目的としている。

平成12年度は(1)、(2)、(3)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の構築と遺伝子の挿入に成功し発現レベルを検討した。(4)に関してはマウスES細胞へのHACの導入に必要な技術の検討をおこなった。今後は(3)(4)の項目について改良を目指した解析を進めるとともに、(5)の項目についても検討をはじめの計画である。

2. 研究実施内容

(1) ヒト染色体セントロメア・キネトコア領域クロマチンの構造解析：

CENP-AはヒストンH3のバリエーションで活性セントロメア領域にのみ存在している。CENP-AがヒストンH3の代わりにヒストンH2A, H2B, H4と共にヌクレオソームを形成しうることを、精製したCENP-Aとヒストンを用いたin vitroヌクレオソーム再構成系によって示した。形成されたCENP-Aヌクレオソームと正常ヌ

クレオソームとの構造を生化学的手法と原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて比較検討した。ヒストン 8 量体のまわりを DNA が巻いているという基本構造は両者においてほぼ同一であることが明らかになった。(依田、岡崎、竹安チーム : P. N. A. S., 2000)。

セントロメア・キネトコア領域のクロマチン構造を解析するために CENP-A, CENP-B, CENP-C に対するモノクローン或いはポリクローン抗体を作成し、これらの抗体を用いてセントロメア特異的ヌクレオソームを免疫沈降法 (CHIP) により分離し、タンパク・DNA 複合体を解析した。CENP-A/-B/-C を含む複合体が、高頻度に CENP-B box 配列を持つアルフォイド配列 (α 型アルフォイド配列) 上に存在していることが明らかになった。特に注目されるのは、精製 DNA として導入したとき活性キネトコア構造を持った HAC を de novo に形成する性質のある α 型アルフォイド DNA 配列上に、in vivo でも活性セントロメアの指標と考えられる CENP-A ヌクレオソームが存在している事実である。また CENP-B が結合したアルフォイド配列上ではヌクレオソームの位置がポジショニングしていることも明らかになった (依田、岡崎チーム : Mol. Cell. Biol. 印刷中)。CENP-B の酸性アミノ酸ドメインと CENP-C が直接相互作用を持つことを酵母 two hybrid 法により示した。CENP-B box への結合領域を含むが酸性領域を欠く CENP-B の N 末端ポリペプチドや完全長 CENP-B を HeLa 細胞で発現させると、両者共にセントロメアのアルフォイド領域に分布する。これら細胞から調製したクロマチン画分を抗 CENP-C 抗体で免疫沈殿すると、完全長 CENP-B は回収されたが、N 末ポリペプチドは回収されなかった。この結果は細胞内でも CENP-B と CENP-C との間には直接の蛋白間相互作用が存在していることを示唆している (舩本チーム)。AFM を生物材料の可視化に用いる試みは数年前に始められたにすぎないがこの間の進歩は大きい。カーボンナノチューブの開発と利用により AFM の解像力が上昇し、DNA と蛋白の複合体の解析精度があがった (竹安チーム、様々な生物試料の解析に関する論文参照)。この課題では、依田らにより再構築された CENP-A ヌクレオソームの AFM による解析に成功しているが (P. N. A. S., 2000) 今後は人工染色体の解析にも AFM を用いる計画で実験条件を検討中である。

- (2) ヒト (哺乳類) 細胞中で安定維持される人工染色体 (HAC or MAC) の構築と必須領域の構造 :

(前駆体 YAC からのヒト人工染色体の形成) ヒトテロメア配列と α 型アルフォイド配列 (70kb - 80kb) を持つ YAC からヒト細胞中で維持される人工染色体 (HAC) がすでに形成されている (舩本、岡崎チーム : Nature Biotech., 1998)。この成果は α 型アルフォイド配列が導入細胞中で de novo にセントロメア・キネトコアを形成しうる事を示している。形成された HAC は導入した前駆体 YAC が約

30個タンデムに連なった巨大構造をなし、恐らくは環状構造をとっていると推定される。分離されたHACが総て巨大化していたのは、染色体として安定維持されるのに一定以上のサイズが必要であるためと考えられる。HAC形成に必要なとされる α I型アルフォイド配列の長さを明らかにするために、YAC中の α I型アルフォイド配列の長さを短縮化した場合のHACの形成効率を解析した。アルフォイド断片のサイズを30kbに縮めるとHACの形成効率と安定性がともに低下し、10kbのものからは人工染色体は形成されず全て宿主染色体上に取り込まれた。どちらの場合もYACの重複化は起こっていた。以上の結果は、活性あるセントロメアを形成するシス因子がアルフォイドDNAであること、更に前駆体YAC中のアルフォイドのサイズが一定以上必要であることを示している（舩本チーム）。

（BACからのHACの形成）前駆体YACは調製に困難が伴うので、より取り扱いの容易な環状構造前駆体からのHAC形成を試みた。50kbアルフォイド配列、複製起点、選択マーカ―を持ちテロメア配列を持たないBACを構築しHT1080細胞に導入したところ、形質転換株の約10%にHACが形成されていた。形成されたHAC上にはCENP蛋白群が存在し、分裂期に安定に分配された。BAC由来のHACは環状構造でテロメア配列を必要としない。またHACのサイズは導入した前駆体BACのサイズの数十倍に巨大化していた（岡崎チーム）。

(3) 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と問題点の検討：

CRE/loxの系を用いて既知のDNA断片を様々なコピー数挿入することが可能なHACの構築を行った。この目的で従来の前駆体YACのアーム部分にloxP部位を付加し、この前駆体YACからde novoにlox部位を持つHACを形成させた。CRE/loxの系を用い、PuroRとGFPかd2GFP（半減期が2hr）遺伝子の断片を挿入し、それぞれのマーカ―遺伝子の発現とそれに影響を与える因子について解析した。導入した遺伝子の発現をノーザンプロットで解析すると、PuroRもGFPも共に抑制されていた。また挿入されたマーカ―遺伝子の発現とHACの不安定性には相関があると考えられる結果がえられた。以上の結果はHACを発現ベクターとして用いる上で克服すべき問題点である（岡崎チーム）。

(4) 人工染色体をマウス胚へ導入するための基礎技術の検討：

HACによるマウスの形質転換によって個体内におけるHACの維持、分配能を評価することが出来る。しかしこれまでにマウス細胞ではde novoにHACが構築できていない。そのためヒト細胞でde novo形成されたHACをマウス細胞へ移動させる技術を確認することを先ず試みた。微小核細胞融合法（MMCT法）によってHT1080中のHACを先ずマウスA9細胞へ導入し、更に同法によってA9よりES細胞に導入し、これからキメラマウスを作成する方法である。これまでにA9細胞

にHACを導入し、A9細胞中のHACがヒト培養細胞と同程度の安定性を保つことを確認した（岡崎チーム）。またキメラマウス組織においてES由来の細胞を簡易に同定するためにES細胞をEGFPによって形質転換した。このES細胞を用いてキメラマウスを作成し、ES細胞の形質転換がキメラ形成に大きな影響を与えないことを確認した（真貝チーム）。

3 . 主な研究成果の発表（論文発表）

K. Yoda, S. Ando, S. Morishita, K. Houmura, K. Takeyasu, K. Hashimoto and T. Okazaki :

Human centromere protein A(CENP-A) replaces hstone H3 in nucleosome reconstitution in vitro

Proc. Natl. Acad. Sci(U. S. A.)97, 7266-7271, 2000.

K. Yamada, H. Ogawa, G. Tamiya, M. Ikeno, M. Morita, S. Asakawa, N. Shimizu, T. Okazaki :

Genomic organization, chromosomal localization, and the complete 22 kb DNA sequence of the human GCMA/MCM1, a placenta-specific transcription factor gene.

Biochem. Biophys. Res. Commun. 278, 134-139, 2000.

S.H. Yoshimura, C. Yoshida, K. Igarashi and K. Takeyasu AFM proposes a 'Kiss and Pull' mechanism for enhancer function.

J. Electron Microscopy, 49 : 407 - 413, 2000.

K.I. Hohmura, Y. Itokazu, S.H. Yoshimura, G. Mizuguchi, Y. Masamura, K. Takeyasu, Y. Shiomi, T. Tsurimoto, H. Nishijima, S. Akita and Y. Nakayama :
AFM with carbon nanotube resolve the subunit organization of protein complexes.

J. Electron Microscopy, 49 : 415 - 421, 2000.

S.H. Yoshimura, R.L. Ohniwa, M.H. Sato, F. Matsunaga, G. Kobayashi, H. Uga, C. Wada and K. Takeyasu :

DNA phase transition promoted by replication initiator.

Biochemistry, 39 : 9139 - 9145, 2000.

Y. Shiomi, J. Usukura, Y. Masamura, K. Takeyasu, Y. Nakayama, C. Obuse, H. Yoshikawa and T. Tsurimoto :

ATP-dependent structural change of the eukaryotic clamp loader protein, RFC.
Proc. Natl Acad. Sci. USA, 97, 14127-14132, 2000.