

「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、染色体の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大き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。代表者らは、ヒト 21 番染色体に由来するアルフォイド配列(α 21-1) 80kb とヒトテロメア配列を組み込んだ酵母人工染色体(YAC)を前駆体として、ヒト培養細胞 HT1080 中で人工染色体(HAC)を de novo に形成させることに成功している。この成果を基に、本課題では、ヒト染色体セントロメアの機能領域の解析並びに HAC の構築技術、HAC の利用に関する基礎技術の開発を進めている。

平成13年度には以下の研究成果を得た。(1)抗 CENP-A モノクローン抗体を作製し、これを用いて HeLa 間期細胞染色体セントロメ領域の分離に成功し、特異的構成因子を検出した。(2)HAC 形成には CENP-B の結合配列 (CENP-B box)を持つ一定以上の鎖長のアルフォイド配列が必要とされる。(3)CENP-B box に CENP-B が結合すると DNA に湾曲がもたらされる。(4)部位特異的組み換え機構により遺伝子の挿入が可能な HAC、ならびに巨大ゲノム断片として遺伝子を挿入した HAC を構築し、挿入遺伝子からの発現を解析した。(5)HAC を分離したり、他の細胞株に移入する方法(特にマウス ES 細胞やマウス受精卵への HAC の導入法)の検討をおこなった。(1)で同定された網羅的遺伝子群の研究はセントロメア特異的蛋白とこれらの相互作用の研究への道を拓く。(2、3)はセントロメア形成に於ける DNA の関与を明確化する研究。(4)は HAC をベクターとして利用するための解析。(5)は HAC を持つマウス個体の作出や遺伝子治療モデル実験系確立を目指した研究である。

2. 研究実施内容

(1) セントロメア・キネトコアの特異的構成因子の分離同定

CENP-A に対する極めて特異性の高いモノクローン抗体の作製に成功した(特許申請)。Micrococcal Nuclease (MNase) 処理した間期 HeLa 細胞染色体より、この CENP-A 抗体を用いて染色体免疫沈降(ChIP)によりセントロメア・キネトコア領域を分離し、セントロメアクロマチンの構成因子と分子構造を解析した。ChIP によって回収された DNA/蛋白複合体に存在する DNA をクロー

ン化し、塩基配列を決定したところ、全体の 76%が CENP-B box 配列を持つ I-型の α サテライト DNA であった。このアルフォイド DNA は、細胞に導入すると de novo に HAC 形成能を持つことを我々が報告している配列である。複合体蛋白中には CENP-A, -B, -C, -H, mis6 等が存在した。このことからセントロメア・キネトコアが特異的に分離されたことが明らかであり、この複合体を CENP-A/-B/-C/クロマチン複合体とよぶ。(Andoら, Molec. Cell. Biol., 2002) (依田・岡崎グループ)。単離された CENP-A/-B/-C/クロマチン複合体中の蛋白成分を SDS-PAGE によって分離し、総ての蛋白質について質量分析法によってアミノ酸部分配列を決定し、遺伝子解析により多数の既知ならびに未知遺伝子を同定した{依田グループと小布施力史博士(奈良先端大)との共同研究}。また CENP-H, mis6 等の既報セントロメア蛋白遺伝子をクローニングし、抗体を作製した。今後各分子の蛋白間相互作用等を明らかにしてゆく(依田・岡崎グループ)。酵母の two hybrid 法を用いて蛋白間の相互作用を解析した結果、CENP-B の酸性ドメインと CENP-C との相互作用が検出された(舛本グループ)。

(2) HT1080 細胞中で de novo にセントロメア・キネトコアを形成しうる DNA 配列の性質

HT1080 細胞中での HAC 形成能を指標に、セントロメア・キネトコア形成能を持つ DNA 配列を特定する解析を行った。これまで効率良く HAC を形成する前駆体 YAC には、アルフォイド配列としてヒト 21 番染色体から分離された、CENP-B box が一個おきのアルフォイド基本単位に存在する 11mer の高次繰り返し単位からなる全長約 80kb の配列が使われてきた (α 21-I 配列)。 α 21-I 配列を BAC 或いは PAC 等に挿入した環状構築物からも HAC が形成される。In vitro で完全合成した約 60kb の 11mer 繰り返し配列を用いた解析で、同様の HAC 形成能が検出されたので、 α 21-I 配列中の未検出の混在配列によりセントロメアキネトコア形成がもたらされた可能性は完全に否定された。更に総ての CENP-B box 配列に 2 塩基置換を導入した合成 11mer 配列をもとに 60kb 配列を作製し解析したが、この分子には HAC 形成能は存在しなかった。この実験結果は CENP-B がアルフォイド配列中の CENP-B box に結合することが de novo の HAC 形成に必要であることを示している。一方、前駆体 YAC 中のアルフォイド配列の長さとの関係を明らかにするために、アルフォイド配列の全長を順次短くした前駆体を用いて HAC の形成効率を解析したところ、鎖長が短くなるにつれて形成効率が低下し、10kb では HAC が全く形成されず染色体への挿入のみが起こった。挿入部位ではセントロメア蛋白の集合が起きなくヘテロクロマチン化がおきていた。また、ヘテロクロマチン構造をとった異所的アルフォイド挿入部位に、一過的ヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤処理によりセントロメア・キネトコア蛋白の再集合を誘発できた。(舛本グループ)

(3) セントロメア DNA と蛋白との相互作用の解析

アルフォイド DNA 上の CENP-B 結合領域(CENP-B box)と CENP-B の DNA 結合領域(129 残基)との複合体を 2.5 オングストロームの分解能で X 線結晶解析した。蛋白は helix-turn-helix モチーフを含む二箇所のドメインで CENP-B box に結合し、DNA がそれぞれの結合部位で kink して kink-strait-kink 構造をとり、全体として 59° 湾曲していた。これらの構造はセントロメアクロマチン構造と何らかの関係があると推定される(Tanaka ら, EMBO J, 2001)。(東大横山茂之研と岡崎グ

ループとの共同研究)。

染色体の凝縮を行うコンデンシンの再構成系の、SMC2量体並びに non-SMC3量体を含むコンデンシン5量体を用いて、DNA との相互作用を原子間力顕微鏡によって可視化し、染色体の凝縮作用についての機構モデルを得た(Yoshimura ら,Current Biology,2002)(竹安グループと柳田充弘研との共同研究)。

(4) 人工染色体を遺伝子導入ベクターとして利用する研究

Cre-lox による部位特異的組み換え機構により遺伝子の挿入が可能な修飾 lox 部位を持つ前駆体 YAC を構築し、この YAC-DNA から HT1080 中で HAC を形成させた。修飾 lox 部位では遺伝子の挿入反応が lox-lox 間の切り出し反応に優先するので、前駆体 YAC が多数コピー連なっているために lox 部位が多数存在する HAC においても遺伝子の挿入を優先させることが出来た。薬剤耐性遺伝子と GFP からなるマーカー遺伝子を lox 部位に挿入して、挿入された遺伝子の発現を解析した。様々なコピー数を HAC に導入したが、発現は全般的に抑えられる事が判明した。また同一クローン由来の HAC 保有細胞に於いても、細胞の世代毎に発現レベルが変動した。遺伝子導入部位がセントロメア構造の影響を受け、しかもその影響が安定していないことを示している。HAC 上のこの様なセントロメアに近い部位に遺伝子を導入する場合には、LCR 等の構造が存在し遺伝子発現が保証された構築物を導入する必要があると考えられる(Abe ら、投稿準備中)(岡崎グループ)。前駆体 YAC(7C5htel)と β -globin ゲノム領域(130kb)を持つ YAC を混合導入する方法で HT1080 中で HAC を作成した。この HAC には β -globin 領域が複数コピー存在していた。 β -globin HAC はマウス A9 細胞を経てヒト白血病細胞 K562 への移入し発現を解析する予定である(岡崎グループ)。パーキンソン病の遺伝子治療モデルの開発を旨として、カテコールアミン代謝系の最初の遺伝子で、テトラヒドロピオプテリン(BH4)合成を律速する酵素、GTP シクロヒドロラーゼ I (GCH)、を持った HAC の作製を行った。前駆体 BAC と GCH のゲノム領域 180kb を含む BAC とを HT1080 に混合導入して、GCH をもつ HAC を二種類得た。この GCH-HAC を有する HT1080 はそのままでは GCH 活性がないが、インターフェロンにより GCH 活性が誘導されたので、本来の発現制御機構が機能していると考えられる。マウス A9 細胞に移入出来ているので、マウス胚性幹細胞への移入を試みている。テトラヒドロピオプテリン(BH4)は、カテコールアミン合成やセロトニン合成の補酵素として重要であり、GCH-HAC は今後パーキンソン治療への HAC の利用のモデル系として解析をすすめてゆく予定である(岡崎グループと一瀬宏研との共同研究)。

(5) HAC を分離したり他の細胞株に移入する試み

HAC は HT1080 細胞でしか形成出来ない。従って、現段階では形成後に HAC を希望する細胞株に移す必要がある。HAC 保有 HT1080 をマウス A9 と融合した後、微小核細胞融合法によって A9 から希望する細胞に HAC を移す方法を試みている。すでに構築した HAC を順次 A9 に移しているが A9 から更に分化細胞や胚性幹細胞へ移入する実験は今後の課題である。また HAC を分離精製し、マウス受精卵へ注入する予備実験を試み、問題点を明確にした。(岡崎グループ)

3. 研究実施体制

(1) 基礎研究技術開発グループ

研究分担グループ長名:岡崎恒子(藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授)

研究項目:セントロメア・キネトコアの機能構造の解析

ベクター機能をもったHACの開発

HACからの遺伝子発現

研究課題の総括

研究分担グループ長名:舛本寛(名古屋大学大学院理学研究科 講師)

研究項目:セントロメア・キネトコアの機能構造の解析

HAC形成に必須なDNA配列の特徴と長さの解析

研究分担グループ長名:依田欣哉(名古屋大学生体応答研究センター 助手)

研究項目:セントロメア・キネトコアの構成分子の解析、特に蛋白分子の網羅的解析

再構築系の解析

研究分担グループ長名:竹安邦夫(京都大学大学院生命科学研究科 教授)

研究項目:染色体の画像解析と可視化並びに HAC の可視化

セントロメアDNAと蛋白質との相互作用の可視化

(2) マウス胚導入グループ

研究分担グループ長名:岡崎恒子(藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授)

研究項目:マウス胚幹細胞への人工染色体移入法の検討

マウス受精卵への人工染色体の導入法の検討

人工染色体を持ったマウス個体の作出

(3) 基盤的遺伝子治療グループ

研究分担グループ長名:一瀬宏(藤田保健衛生大学総合医科学研究所 教授)

研究項目:パーキンソン病の遺伝子治療への人工染色体の利用法の検討

研究分担グループ長名:斉藤英彦(名古屋大学医学部 教授)

研究項目:血液細胞への人工染色体の導入法の開発

4. 研究成果の発表

(1) 論文発表

※(①藤田保健衛生大学 ②名大.院理.生命理学 ③名大.生物分子応答センター ④京大.院.生命科学 ⑤神奈川歯科大学 ⑥東京大学とする)

- Y. Tanaka^⑥, O. Nurekia^⑥, S. Fukai^⑥, S. Kawaguchi^⑥, M. Ikuta^⑥, J. Iwahara^⑥, T. Okazaki^① and S. Yokoyama^⑥. Crystal structure of the CENP-B protein-DNA complex: the DNA-binding domains of CENP-B induce kinks in the CENP-B box DNA. EMBO J. 20, 6612-6618 (2001)

- S. Sakaue^④, K. Yoshikawa^④, S.H. Yoshimura^④ and K. Takeyasu^④. Histone core slips along

DNA and prefers positioning at the chain end. Phys. Rev. Lett., 87, 078105-1-4 (2001)

- S.H. Yoshimura④, K. Hizume④, A. Murakami④, T. Sutani④, K. Takeyasu④ and M. Yanagida④. Condensin architecture and interaction with DNA: Regulatory non-SMC subunits bind to SMC heterodimer and restrain its assembly on DNA. Current Biology 19, 508-513 (2002)
- 岡崎恒子①: Never Give Up! 蛋白質核酸酵素 **46**, 1387-1391 (2001)
- 岡崎恒子①: 不連続複製機構-仮説が実証されるまで. 蛋白質核酸酵素, **47**, 249-260 (2002)
- 岡崎恒子①: 岡崎フラグメントと不連続複製機構. 生化学, **74**, 103-117 (2002)
- 吉村成弘④ 竹安邦夫④. 遺伝子のナノ構造生物学. 生化学, 73, 264-268 (2001)
- 吉村成弘④ 竹安邦夫④. 原子間力顕微鏡と分子生物学の接点～遺伝子のナノバイオロジー～. 電子顕微鏡, 36, 99-105, (2001)

(2) 特許出願

H13 年度特許出願件数 1 件 (CREST 研究期間累積件数1件)