

総括研究報告書

遺伝子工学的手法による病態モデル培養細胞系の作出と その標準化に関する研究

主任研究者 田中憲穂 財)食品薬品安全センター
 秦野研究所 細胞毒性学研究室 室長

研究要旨

我々は、研究資源の開発と整備を目的とし、ヒトゲノム解析や遺伝性疾患の病因解明のための研究資材として、遺伝子工学的手法を用いた病態モデル培養細胞系の作出と細胞の品質管理手法の開発にとりくんできた。

1) これまで、ゲノム解析や遺伝性疾患原因遺伝子のクローニングに有用な、単一ヒト染色体導入雑種細胞のクローニングを行ってきた。また、遺伝子解析の研究資材として有用な、げっ歯類単一染色体雑種細胞の作成方法の検討を行ってきた。本年度は、マウスおよびラット単一染色体雑種細胞ライブラリーの作製を行った。

2) ニワトリ Pre-B 細胞株 DT40 は極めて高頻度に相同組み換えを起こすことから、DT40 細胞中でヒト染色体を改変することが可能である。本研究では A9 細胞に導入されているからヒト単一染色体を DT 細胞にマウスに再導入し、単一ヒト染色体を含む DT40 細胞ライブラリーを作製することにより、遺伝子マッピングや機能解析、さらには染色体高次構造解析の資材とすることを目的とした。前年度に作製したヒト 2 番、3 番、5 番、6 番、7 番、11 番、14 番、21 番、22 番染色体を保持する DT 細胞に加え、8 番、18 番、19 番染色体を各々保持する細胞クローンを作製した。さらに、父及び母由来の明らかなヒト 11 番染色体も DT 細胞へ導入した。

3) これまでに PCR 法、蛍光 in situ hybridization (FISH 法)を用いた実験動物由来細胞株の遺伝的性状解析手法の開発・改良を行ってきた。本年度は、rDNA の FISH 法および仁形成体の銀染色による、マウス系統の識別法の開発を行った

4) トランスジェニックマウス、ノックアウトマウス等遺伝子改変動物に由来する細胞の研究資源化を目的として、コネクシン 43 遺伝子ノックアウトマウスからの細胞系作成をはじめとして、数系統のトランスジェニックマウスからの細胞系の収集・作成を行った。

分担研究者

田中 憲穂 財)食品薬品安全センター秦野研究所 研究部 室長

久郷 裕之 鳥取大学 医学部細胞工学教室 助手

加藤 秀樹 浜松医科大学付属動物実験施設 助教授

黒澤 務 大阪大学医学部附属動物実験施設 助教授

A. 研究目的

1) ヒト染色体ライブラリーの品質検査と細胞系の確立

薬剤耐性マーカー遺伝子で標識された外来染色体を有する雑種細胞株は、劣性遺伝病の原因遺伝子や、癌遺伝子のマッピング、染色体特異的 DNA マーカーの作製等に利用されており、ヒトゲノム解析の資材として極めて重要である。我々は、これまでに、Y 染色体を除く全てのヒト単一染色体を有するマウス細胞株の作成及び品質管理を行い、HSRRB(JCRB)細胞バンクを通じて、一般の研究者への配布を行ってきた。昨年度より、新たにげっ歯類単一染色体ライブラリーの作成を開始した。げっ歯類単一染色体を用いることにより、染色体導入後、目的とするヒトの癌や疾患関連遺伝子のマッピングが容易であるという利点があるが、これまでその樹立に関しては殆ど報告が無い。本研究では、げっ歯類の単一染色体雑種細胞を樹立し、性状解析および標準化を行い、研究資源として広く研究者の利用に供する。(田中)

2) ヒト染色体ライブラリーの作製とDNAおよび染色体解析

ニワトリ Pre-B 細胞株 DT は極めて高頻度に相同組み換えを起こすことが知られている。したがってこの DT40 細胞中でヒト染色体を改変することが可能である。本研究の目的は A9 細胞に導入されているヒト単一染色体を DT 細胞に再導入し、単一ヒト染色体を含む DT40 細胞ライブラリーを作製することにより、遺伝子マッピングや機能解析、さらには染色体高次構造解析の資材とする。(久郷)

3) 実験動物由来細胞株の性状確認および同定法の確立

株化細胞や、ミュータント系統、トランスジェニックおよびノックアウト系統などの胚の凍結保存バンクは、貴重な遺伝資源を保存する上で重要な役割を果たしている。しかしながら、運用の際に混入や取

り違い事故などが予想され、これらを未然に防ぐ手段が必要になる。これまでに、PCR 法や FISH を用いて細胞の遺伝的性状を明らかにする手法を開発してきたが、本年度は、rRNA をコードする rDNA の PCR 産物の遺伝的多型性を解析することを目的に SMXA RI (リコンビナント近交系)を対象として Ag-NOR バンド検出法(銀染色法)ならびに FISH 法を適用する基礎的研究を行なった。

4) トランスジェニック動物からの細胞収集

ノックアウトマウス、トランスジェニックマウスなどの遺伝子改変動物に由来する培養細胞株は、疾患関連遺伝子等の細胞レベルでの機能解析に極めて有用である。しかしながら、これまで遺伝子改変動物由来の細胞系に関する研究資材としての細胞ライブラリーは存在していなかった。昨年度より、新たに遺伝子改変動物に由来する培養細胞株の開発、収集を開始した。その一環として、コネクション 43 遺伝子ノックアウトマウスより繊維芽細胞を単離し、その性状解析を行い、研究資源として利用するための基礎データを得た。本年度は、トランスジェニックマウスから数系統の細胞系を確保したが、更に多くの細胞株の収集と性状解析を行い、遺伝子改変動物の細胞系を、研究資源として利用できるようにする。(黒澤)

B. 研究方法および研究結果

1) ヒト染色体ライブラリーの品質検査と細胞系の確立

本年度は、昨年度に引き続き、FM7 細胞をホストとし、マウス単一染色体雑種細胞ライブラリーの作製とスクリーニングを行った。FM7 細胞は、染色体数が 6~8 本と少なく、核型解析によるスクリーニングに適しているため、QFH 分染法によるマウス染色体の検索を実施した。その結果、得られたクローンでは完全長のマウス染色体を確認することができなかった。また、染色体標本上には、多数の小核が存在し、核型が不安定であることが示唆された。

親株の FM7 細胞では、このような小核は低頻度でしか観察されないため、導入染色体の脱落によって誘発されたものと考えられた。このことから、マウス染色体は、これまでに用いたチャーニーズハムスター細胞、ラットカンガルー細胞と同様に、インドホエジカ細胞中でも不安定なことが示唆された。

そこで、同じげっ歯類で、マウスについて遺伝的性状が明らかにされているラットを材料とすることにした。染色体供与細胞には、10 週齢の Crj (SD) IGS ラットから作製した初代繊維芽細胞を用い、薬剤耐性遺伝子の標識には、neo および EGFP 遺伝子を持つレトロウィルスベクター pLEIN を用いた。薬剤耐性遺伝子標識細胞は、一度マウス A9 細胞と融合し、染色体供与細胞とした。

染色体受容細胞には、ヒト HT-1080 細胞を用いることにしたが、まず、ヒト単一染色体雑種細胞のホストとして実績のある、マウス A9 細胞に試験的に染色体導入を行い、得られたクローンの性状解析を行った。その結果、得られたクローンでは、いずれも B 励起光下で pLEIN にコードされる EGFP 産物による緑色蛍光を呈し、ラット染色体が正常に導入されていることが示された。このことから、今回作製した染色体供与細胞により、ラット単一細胞ライブラリの作製が可能であることが示された。

一部のクローンについては、核型解析によって、核型レベルで完全長のラット染色体の存在が確認できた。今後、染色体供与細胞から、HT-1080 細胞への直接の染色体導入も実施する。また、HT-1080 はコルセミド処理により微小核を形成するが、げっ歯類細胞と比べると形成率が低いため、効率よく微小核を誘発する条件についても検討を行う。(田中)

2) ヒト染色体ライブラリーの作製と DNA および染色体解析

1. ニワトリ DT40 細胞を用いた単一ヒト染色体雑種細胞ライブラリーの作製

ヒト染色体を含むマウス A9 細胞をサイトカラシン

B (10 µg/ml) 中で遠心脱核し、微小核細胞を精製した。レシピエントのニワトリ由来 DT40 細胞を、ポリ-L-リジンでコーティングした 6 穴プレートに、 1×10^7 cells/well に播いた。この DT40 細胞をプレート底部に張り付けるためにプレートを 1,200rpm, 3 分間遠心を行った。2 時間、37°C のインキュベータ内で静置後、血清を含まない DMEM で 2 回洗浄した。上清の DMEM を静かに除去し、フィトヘムアグルチニン (PHA, 50µg/ml) を含む無血清培養液 2ml に懸濁した微小核細胞の懸濁液を加え、1,200 rpm, 3 分間の遠心を行った。上清を除去し、PEG 溶液 3ml を加え、微小核細胞融合した。翌日、ピペッティングにより細胞を分散し、24 穴プレートに播種し、選択培地に交換し、約 3 週間後に耐性クローンを分離した。得られた細胞クローンは、Alu-PCR banding pattern および染色体解析により導入染色体の状態を確認した。

本年度は、8 番、18 番、19 番及び父母由来の明らかな 11 番(父)、11 番(母)染色体を各々を完全に保持する細胞クローンを作製し、これまでに作製したものと合わせて 12 種類の染色体を各々保持する DT40 細胞を作製した。これらの細胞クローンは、DT40 細胞の高頻度相同組み換え能を利用し、ヒト染色体の改変の場を提供するものであり、ヒト人工染色体の作製やヒト染色体に欠失や転座を誘発させ、その機能解析を行うことにより疾病原因遺伝子をマッピングするための有用な資材になると考えられる。今後は、さらに他の染色体の導入を試み、単一染色体ライブラリーの完成を目指す

2. 相同配列を用いたターゲティングによるヒト染色体改変

ヒト 2 番、3 番、6 番、21 番、8 番、18 番、19 番染色体を保持する DT40 細胞クローンについて、相同遺伝子配列導入による染色体改変を行った。切断された染色体が細胞中で維持されるには、相同組み換え後に得られる染色体の末端にテロメア配列を挿入しなければならない。そこで我々は、1kb か

らなるヒトテロメア配列、及び選択マーカーとして PGKpuro を含むプラスミドベクターに相同配列を挿入した。相同配列は目的の染色体部位に相当するコスミドから切り出した染色体断片を用いた。制限酵素処理で得られた DNA 断片の中から約 10kb の断片を精製し、テロメア配列を含むターゲティングベクターへ挿入した。これを目的とするヒト単一染色体を保持する DT40 雑種細胞に導入した。その結果、頻度は異なるものの得られたクローン中 5%～20% の確立で目的とする領域にテロメアを付加し、それより末端の染色体を欠失させることができることが示された。さらに、ヒト染色体中のノックアウト実験に関しては、PGKpuro の両端に 2～5kb の相同領域をもつコンストラクトによって、30～50% のターゲティング・ノックアウトを行うことができた。(押村)

3) 実験動物由来細胞株の性状確認および同定法の確立

マウスの A/J 系統と SM/J 系統を親系統として作出されたリコンビナント近交系 (SMXA RI) を材料として使用した。各系統の脾臓細胞を採取し、20%FBS を含む RPMI1640 で培養し、染色体標本は常法により作製した。

仁形成体 (NOR:nucleolar organizer) を検出するためにスライド上の染色体標本に対して銀染色を施し、光学顕微鏡下で Ag-NOR バンドとして検出した。Ag-NOR バンドの検出法としての銀染色法を第 5 染色体の染色体異常を持つマウス、IST 系統の染色体標本を用いて検討した。その結果、一部の染色体の動原体部分が黒色に染色されたことから、同法を導入できたと考えられた。

また、FISH (fluorescence in situ hybridization) 法によって、FITC 標識した rDNA をプローブを用いて、直接染色体上に rRNA 遺伝子を検出した。

次に、rRNA 遺伝子を染色体上に検出するための方法として IST 系統の染色体標本を用いて検討した。結果として、銀染色法で黒色のバンドが認められた染色体の動原体部分に FITC シグナルを観

察した。以上の結果から、FISH 法についても導入できたと考えられた。(加藤)

4) トランスジェニック動物からの細胞収集

国内で遺伝子改変動物の開発・研究を行っている研究者にアンケートを行い、細胞株を作製した場合に JCRB 細胞バンクからの配布が可能な遺伝子改変動物を調査した。

有効な回答が得られたアンケートについて、その遺伝子改変動物の性状の文献調査を行い、有用と思われる遺伝子改変動物の情報を収集した。本年度は、すでに作製が完了している 2 株に加えて、6 系統の遺伝子改変動物について細胞配布が可能であることが確定した。

遺伝子改変動物は、論文発表、特許との関係や、樹立者の異動等によって承認が得られない場合が多く、通常の細胞株の収集よりも多少の困難が伴った。また、最近では、作出された遺伝子改変動物の系統は、凍結胚の状態で保存されることが多くなり、育成継続されているものからの細胞収集になることから、得られる系統が限定されることもある。

今回、収集が可能であることが確定した遺伝子改変動物は、臓器特異的プロモータによって特定臓器に改変遺伝子を発現したり、lox P システムによって臓器や発生ステージに特異的にゲノム操作が可能なもの、ES 細胞のフィーダ細胞として有用なものなど、多岐にわたる分野に利用可能なものと考えられる。

実際の細胞株作製にあたっては、動物の輸送、改変遺伝子が発現する特定臓器からの細胞分離法など、なお検討すべき事項が残されているが、今後、これらの問題解決とともに、さらなる収集作業を続けていきたい。(黒澤)

C. 結論

1) 単一染色体雑種細胞は、微小核融合法による染色体導入の供与細胞として、劣性遺伝病やがんの原因遺伝子のクローニングや、染色体特異的

DNA マーカー作製の資材としても利用されており、ヒトゲノム解析の資材として極めて重要である。これまでに、ヒト染色体を有するマウス細胞ライブラリーを作製および品質管理を行い、JCRB 細胞バンクから細胞の配布を行ってきた。本年度は、ヒトゲノム解析の資材として有用なげっ歯類単一染色体雑種細胞ライブラリーの作製を試みた。その結果、マウス単一染色体雑種細胞は、マウス染色体の不安定性のため、完全長のマウス染色体を有する雑種細胞クローンは得られなかった。一方、ラット単一染色体雑種細胞については、基礎的な検討を行い、本年度に作製した染色体供与細胞によって、ライブラリーの作製が可能であることが示された。(田中)

2) 外来遺伝子と相同組み替えが高頻度に生じるニワトリ Pre-B 細胞株 DT40 細胞に単一ヒト染色体を高頻度に導入する手法の改良技術を確立した。この手法を用い、前年度に作製したヒト 2 番, 3 番, 5 番, 6 番, 7 番, 11 番, 14 番, 21 番, 22 番染色体を保持する DT 細胞に加え、8 番, 18 番, 19 番染色体を各々保持する細胞クローンを作製した。さらに、父及び母由来の明らかなヒト 11 番染色体も DT 細胞へ導入した。加えて、DT 細胞中のヒト染色体改変技術の確立を行い、ヒト染色体を含む DT 細胞がヒト遺伝子の制御機構の解析やヒト人工染色体の作製に有用な資材であることを示した。(押村)

3) 実験動物に由来する培養細胞株は、医学・生物学の実験に広く用いられている。培養細胞株は、長期にわたる継続培養や、人為的なミスによるクロスコンタミネーションなどにより、性状が変化し、実験結果に大きな影響を与えることがあるため、常にその性状を確認しつつ実験を行わねばならない。本研究では、遺伝的性状の簡便な検査法の開発を目的としてきた。本年度は、rDNA の FISH 法および仁形成体の銀染色による、マウス系統の識別法の開発を行った。(加藤)

4) トランスジェニックマウスなどの遺伝子改変動物に由来する培養細胞株の多くは、個体レベルでの改変遺伝子の作用等がすでに解明されており、細胞レベルでの実験に有用な情報が容易に得られることから、実験資材として有用と考えられる。これまでに、コネクシン 43 遺伝子ノックアウトマウスに由来する繊維芽細胞株の作製を行い、個体レベルでの病態と細胞レベルでのコネクシン遺伝子欠損による機能変化について検討を行い、in vitro での実験に有用であることが示された。本年度から、遺伝子改変動物の開発・研究を行っている研究者に呼びかけを行い、遺伝子改変動物の収集および細胞株作製を開始した。(黒澤)

D. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 野津智美、田中宏美、久郷裕之、清水素行、押村光雄 “DT40 細胞を用いたヒト 3 番染色体の改変” 第 58 回日本癌学会(広島)平成 11 年 9 月
- 2) 野津智美、堀家慎一、田中宏美、Schulz TC、林田敏郎、寿典子、中山祐二、久郷裕之、清水素行、押村光雄 “DT40 細胞におけるヒト染色体改変、及び機能解析” 日本分子生物学会(福岡)平成 11 年 12 月

分担研究報告書

ヒト染色体ライブラリーの品質検査と細胞系の確立

分担研究者： 田中 憲穂 (財)食品薬品安全センター秦野研究所 細胞毒性学研究室長

研究要旨

単一染色体雑種細胞は、微小核融合法による染色体導入の供与細胞として、劣性遺伝病やがんの原因遺伝子のクローニングや、染色体特異的 DNA マーカー作製の資材としても利用されており、ヒトゲノム解析の資材として極めて重要である。これまでに、ヒト染色体を有するマウス細胞ライブラリーを作製および品質管理を行い、JCRB 細胞バンクから細胞の配布を行ってきた。本年度は、ヒトゲノム解析の資材として有用なげっ歯類単一染色体雑種細胞ライブラリーの作製を試みた。その結果、マウス単一染色体雑種細胞は、マウス染色体の不安定性のため、完全長のマウス染色体を有する雑種細胞クローンは得られなかった。一方、ラット単一染色体雑種細胞については、基礎的な検討を行い、本年度に作製した染色体供与細胞によって、ライブラリーの作製が可能であることが示された。

A. 研究目的

選択薬剤耐性マーカーで標識された外来単一染色体を有する雑種細胞は、微小核融合法による染色体導入の供与細胞として、劣性遺伝病やがんの原因遺伝子のクローニングなどに利用されている。また、染色体特異的 DNA マーカー作製の資材としても利用されており、ヒトゲノム解析の資材として極めて重要である。これまでに Y 染色体を除く全てのヒト染色体を有するマウス細胞ライブラリーを作製し、JCRB(HSRRB)細胞バンクの事業の一環として、品質管理および細胞の配布を開始した。また、ヒトゲノム解析に有用なマウス染色体単一染色体雑種細胞の作製およびスクリーニング手法を確立した。今年度は、マウス単一染色体雑種細胞ライブラリーに加え、ラット単一

染色体雑種細胞ライブラリーの作製をすすめ、リサーチリソースとして JCRB 細胞バンクへ供与することを目的とする。

B. 研究方法

1. マウス単一染色体ライブラリー細胞の作製

1) 染色体供与細胞

染色体供与細胞には、マウス系統間雑種胎仔より得た繊維芽細胞を用いた。系統間雑種細胞を用いたのは、単離したマウス単一染色体の親起源を、多型マーカーを用いて調べるためである。昨年度に作製した、BALB/c × C57 BL/6 雑種胎仔由来繊維芽細胞に、薬剤耐性遺伝子である neo 遺伝子と、オワンクラゲ由来の蛍光タンパク質である GFP (Green Fluorescent Protein) 遺伝子の融合遺伝子を

発現する pQBI-pgk をトランスフェクションしたものを染色体供与細胞とした。

2) 受容細胞と染色体導入

これまでに、チャイニーズハムスターV79 細胞、CHO-K1 細胞、DON 細胞、ラットカンガルー由来 Ptk-1 細胞を受容細胞に用いたが、導入した染色体の脱落が激しく、安定性を欠くことから、受容細胞としては不適切であることが分かった。そこで、本年度は、インドホエジカ胎仔由来繊維芽細胞に、pSV3gtp をトランスフェクションして不死化した FM7 細胞を受容細胞として用いた。1) で述べた染色体供与細胞をコルセミド処理後、サイトカラシン B 中で遠心脱核することにより、微小核を調製し、微小核融合法²⁾を行った。

2. ラット単一染色体ライブラリー細胞の作製

1) 染色体供与細胞

10 週齢の Crj (SD) IGS ラットをドライアイス麻酔後解剖し、腎臓、肺をミンズシ 0.25%トリプシンで細胞を分散した。細胞をディッシュに植え込み、増殖させた後、薬剤耐性遺伝子の標識を行った。

薬剤耐性遺伝子 neo と EGFP 遺伝子をコードする組替えレトロウイルスベクター pLEIN (Clontech) を、プロデューサー細胞である PT67 中で、MMLV 10A1 ウイルスエンベロップにパッケージングした。組替えウイルスを含む培養上清を、ラット初代繊維芽細胞に処理し、約 2 週間培養してインテグレートイドクローンを 63 クローン得た。これらのクローンをクローニングした。これらのクローンは、成体から単離したため、分裂余命が少なく老化兆候を示した。また、微小核形成能を確認したところ、コルセミド処理によってもほとんど微小核を形

成しないことが明らかになった。そのため、ブラスチジン耐性遺伝子を有する A9 細胞(マウス繊維肉腫由来)と、ポリエチレングリコール法で細胞融合後、G418、ブラスチジン 2 重選択によってホールセルハイブリッドを作製した。ホールセルハイブリッドは、クローンにより差はあるものの、コルセミド処理により微小核を形成したため、これを染色体供与細胞とした。

2) 受容細胞と染色体導入

染色体供与細胞には、マウス A9 細胞と、ヒト HT-1080 細胞(ヒト繊維肉腫細胞由来)を用いた。1) で述べた染色体供与細胞をコルセミド処理後、サイトカラシン B 中で遠心脱核することにより、微小核を調製し、微小核融合法²⁾を行った。

C. 研究結果および考察

1. マウス単一染色体ライブラリー細胞の作製

これまで、マウス単一染色体雑種細胞の作製を試みてきたが、得られた微小核融合細胞でのマウス染色体の脱落が激しく、断片化されたマウス染色体を有する細胞クローンしか得ることができなかった。そのため、マウス染色体を安定に保持する宿主細胞の検索、薬剤選択法の検討を行ったが、良好な結果を得ることはできなかった。

本年度は、昨年度に引き続き、FM7 細胞を宿主とし、クローンの作製とスクリーニングを行った。FM7 細胞は、染色体数が 6~8 本と少なく、核型解析によるスクリーニングに適しているため、QFH 分染法によるマウス染色体の検索を実施した。その結果、得られたクローンでは完全長のマウス染色体を確認することができなかった。また、染色体標本上には、多数

の小核が存在し、核型が不安定であることが示唆された。親株の FM7 細胞では、このような小核は低頻度でしか観察されないため、導入染色体の脱落によって誘発されたものと考えられた。このことから、マウス染色体は、これまでに用いたチャーニーズハムスター細胞、ラットカンガルー細胞と同様に、インドホエジカ細胞中でも不安定なことが示唆された。

2. ラット単一染色体ライブラリー細胞の作製

マウス染色体は、多岐にわたるホスト細胞株中のいずれでも不安定であることが示されたため、同じげっ歯類で、マウスについて遺伝的性状が明らかにされているラットを材料とすることにした。現在、ラットゲノム解析プロジェクトも進行しつつあり、ラット単一染色体雑種細胞の有用性は、マウスに劣らないものと考えられる。

げっ歯類の初代培養細胞は、ヒト初代培養細胞と異なり、継代培養により容易に不死化し、それに伴って遺伝子突然変異や染色体構造異常を生ずることが知られている。これらのゲノム変化を防ぐために、分裂余命の少ないラット成体を材料とした。このため、得られた薬剤標識細胞は老化兆候を示したため、マウス A9 細胞と融合し、染色体供与細胞とした。また、これによって、良好な微小核形成能を示した。

染色体受容細胞には、ヒト HT-1080 細胞を用いた。ヒト由来の細胞株は、コルセミドの毒性を強く受けるため、一般に微小核を形成しないが、HT-1080 細胞はコルセミド処理により微小核を形成し、微小核融合法による染色体導入に用いることができるため、近年、ヒト人工染色体の分野で用いられるようになってきた。そのため、ラット単一染色体雑種細胞のホストとしても有効であると考えられた。

まず、ヒト単一染色体雑種細胞のホストとし

て実績のある、マウス A9 細胞に試験的に染色体導入を行い、得られたクローンの性状解析を行った。その結果、得られたクローンでは、いずれも B 励起光下で pLEIN にコードされる EGFP 産物による緑色蛍光を呈し、ラット染色体が正常に導入されていることが示された。このことから、今回作製した染色体供与細胞により、ラット単一細胞ライブラリーの作製が可能であることが示された。

マウスとラットは、種が近いため、核型解析、FISH 法や PCR による染色体の識別が困難であったが、一部のクローンについては、核型解析によって、核型レベルで完全長のラット染色体の存在が確認できた。ラット染色体が確認できなかったクローンについては、ホストのマウス染色体と識別できなかったものと考えられるので、さらに HT-1080 細胞に染色体を移し変える必要がある。また、染色体供与細胞から、HT-1080 細胞への直接の染色体導入も実施するとともに、HT-1080 に効率よく微小核を誘発する条件についても検討を行う。

D. 結論

マウス単一染色体雑種細胞の作製を試みたが、マウス染色体の不安定性のため、完全長のマウス染色体を有する雑種細胞クローンは得られなかった。しかしながら、これらの断片化マウス染色体を有する細胞クローンは、非常に高精度なハイブリッドパネルとして利用することも可能であり、今後の応用について検討したい。

また、ラット単一染色体雑種細胞については、基礎的な検討を行い、本年度に作製した染色体供与細胞によって、ライブラリーの作製が可能であることが示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tanabe, H., Tanaka, N., Nakagawa, Y.,
Mizusawa, H., Human monochromosome
hybrid panel characterized by FISH in the
JCRB/HSRRB, Chromosomes Research,
2000, in press

2. 学会発表

なし

分担研究報告書

ヒト染色体ライブラリーの作製と DNA および染色体解析

分担研究者 久郷 裕之 鳥取大学医学部・助手

研究要旨

外来遺伝子と相同組み替えが高頻度に生じるニワトリ Pre-B 細胞株 DT40 細胞に単一ヒト染色体を高頻度に導入する手法の改良技術を確立した。この手法を用い、前年度に作製したヒト 2 番、3 番、5 番、6 番、7 番、11 番、14 番、21 番、22 番染色体を保持する DT 細胞に加え、8 番、18 番、19 番染色体を各々保持する細胞クローンを作製した。さらに、父及び母由来の明らかなヒト 11 番染色体も DT 細胞へ導入した。加えて、DT 細胞中のヒト染色体改変技術の確立を行い、ヒト染色体を含む DT 細胞がヒト遺伝子の制御機構の解析やヒト人工染色体の作製に有用な資材であることを示した。

A. 研究目的

ニワトリ Pre-B 細胞株 DT は極めて高頻度に相同組み換えを起こすことが知られている。したがってこの DT40 細胞中でヒト染色体を改変することが可能である。本研究の目的は A9 細胞からヒト単一染色体を DT 細胞にマウスに再導入し、単一ヒト染色体を含む DT40 細胞ライブラリーを作製することにより、遺伝子マッピングや機能解析、さらには染色体高次構造解析の資材とする。

B. 研究方法

一般的に、染色体導入に用いる微小核細胞融合法は、細胞の種類により多少異なるが、suspension type は、adherent type に比べて染色体の導入効率はやがる。特に、受容細胞に用いる DT40 細胞は、これまでの研究により染色体導入効率が極めて低いことが知られている。これまでに、DT 細胞へ効率良く染色体

導入を行う手法を確立し、それを用いて単一ライブラリーを作製してきた。本年度は、その手法を用いて引き続きライブラリーを作製すると同時に DT 細胞中のヒト染色体改変技術の確立を行った。

1. 微小核細胞の作製

ヒト染色体を含むマウス A9 細胞を遠心用フラスコ (25cm²) に播種し、5% 炭酸ガス気相、37°C 条件下で培養を行った。細胞密度が 70~80% に達した後、培養液をコルセミド含有培地 (20% FBS, DMEM, 0.05µg/ml colcemid) に変換し、2 日間培養を行った。2 日後、サイトカラシン B (10 µg/ml) 処理し、34°C、8000rpm で1時間の遠心分離を行った。遠心終了後、サイトカラシン B 溶液を除去し、微小核を無血清培地 12 ml に懸濁し回収する。この微小核懸濁液を 8µm、5µm、3µm のフィルターの順に通し、微小核を精製した。

2. 微小核細胞融合

ポリ-L-リジンでコーティングした6穴プレートに、 1×10^7 cells/wellのDT細胞を播いた。このDT40細胞をプレート底部に張り付けるためにプレートを1,200rpm, 3分間遠心を行った。2時間、37°Cのインキュベータ内で静置後、血清を含まないDMEMで2回洗浄した。上清のDMEMを静かに除去し、フィトヘムアグルチニン(PHA, 50 μ g/ml)を含む無血清培養液2mlに懸濁した微小核細胞の懸濁液を加え、1,200 rpm, 3分間の遠心を行った。上清を除去し、47%ポリエチレングリコール(PEG)溶液3mlを加え、1分間静置した。PEG溶液を吸い取り、無血清培地で4-5回洗浄し、その後、血清を含む培地で1日間培養する。ピペッティングにより細胞を分散し、24穴プレートに播種し、選択培地に交換し、約3週間後に耐性クローンを分離した。得られた細胞クローンは、Alu-PCR banding pattern および染色体解析により導入染色体の状態を確認した。

本年度は、8番、18番、19番染色体を各々保持する細胞クローンを作製した。また、父母由来の明らかな11番(父)、11番(母)染色体を各々を完全に保持する細胞クローンを作製した。

3. テロメア・ターゲティングによるヒト染色体改変

DT細胞中のヒト染色体ターゲティングの例として、11番染色体11p15領域のLIT1遺伝子上流のCpGアイランド(図1a)及びH19の繰り返し配列(図1b)のノックアウトを示した。

切断された染色体が細胞中で維持されるには、相同組み換え後に得られる染色体の末端にテロメア配列を挿入しなければならない。そこで我々は、1kbからなるヒトテロメア配列、及び選択マーカーとしてPGKpuroを含むプラ

ズミドベクターに相同配列を挿入した。相同配列は目的の染色体部位に相当するコスミドから切り出した染色体断片を用いた。この問題となるのは、その染色体断片の5'、3'末端が染色体上ではどちらがテロメア側でどちらがセントロメア側かということが分からないということである。そのため我々は、両方の向きに対して各々コンストラクトを行い、細胞へ導入した。特定領域のコスミドを制限酵素処理した後、得られたDNA断片の中から約10kbの断片を精製し、テロメア配列を含むターゲティングベクターへ挿入した。今回、染色体2番、3番、6番、21番、8番、18番、19番染色体について改変を行った。

C. 研究結果

これまでに作製したものと合わせて12種類の染色体を各々保持するDT40細胞を作製した。これらの細胞クローンは、DT40細胞の高頻度相同組み換え能を利用し、ヒト染色体の改変の場を提供するものであり、ヒト人工染色体の作製やヒト染色体に欠失や転座を誘発させ、その機能解析を行うことにより疾病原因遺伝子をマッピングするための有用な資材になると考えられる。今後は、さらに他の染色体の導入を試み、単一染色体ライブラリーの完成を目指す。

テロメア・ターゲティングに関しては、2番、3番、6番、21番染色体について改変を行ったが、その頻度は異なるものの得られたクローン中5%~20%の確立で目的とする領域にテロメアを付加し、それより末端の染色体を欠失させることができることが示された。さらに、ヒト染色体中のノックアウト実験に関しては、PGKpuroの両端に2~5kbの相同領域をもつコンストラクトによって、30~50%のターゲティ

図1a Targeted disruption of the human LIT1 CpG island using chicken DT40 cells

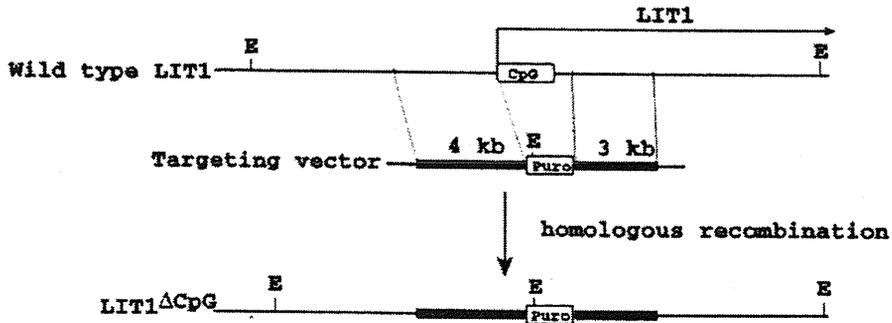
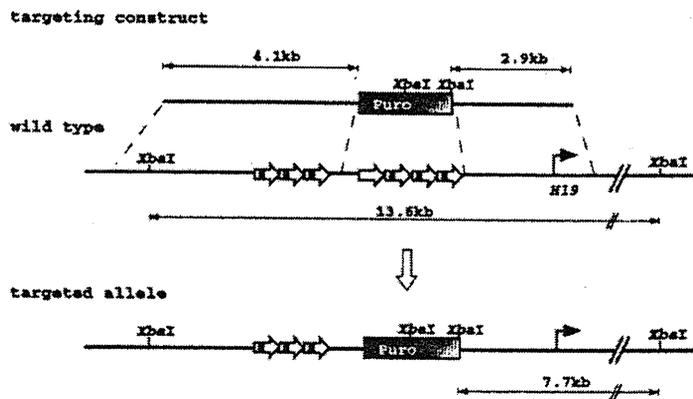


図1b Targeted disruption of the upstream repetitive region of human H19



ング・ノックアウトを行うことができた。

この DT 細胞中のヒト染色体におけるターゲティング頻度に差があることについては現在なお検討中であるが、可能性としては以下の点が推測される。

- 1) 相同領域中に繰り返し配列を伴う。-ヒト染色体中には Alu, L1 といった多くの繰り返し配列が存在し、これらの存在が相同組み換えの効率を下げるということが知られている。
- 2) 相同配列の長さ-相同領域の長さが長い程組み換え効率を上げると考えられる。

- 3) 不完全なクローニング-DT40 細胞は浮遊系の細胞であるため通常の方法ではクローニングができない。

我々は遺伝子の導入後の細胞を 96well に少量ずつ播き 1well から上がってきた細胞について 1 クローンとした。このため完全なクローニングがなされていない可能性も高い。正常な 3 番染色体を含む細胞と切断された染色体を含む細胞が混入している場合、STS PCR では切断された染色体を検出することは不可能である。この問題に対する対応として、サザン

ブロット解析等の解析方法をスクリーニングに用いるということも可能である。しかし STS PCR によるスクリーニングは手間がかからず、短時間で、また細胞数が少ない比較的早い時期から解析が可能であることを考えるとこちらの方が有用であると思われる。

これらが原因である場合、いずれに於ても改善することは比較的容易である。あらかじめ繰り返し配列の有無を確認することは可能であるし、相同領域の長さは自由に設定できる。クローニングについても作業の簡便化のためにこのような方法を用いているが、完全なクローニングももちろん可能である。今後さらに検討、改良を続けていく中で最初に得られた 10% の効率を、より高めていくことが可能であると考えている。

現在はこのようにして得られた改変染色体について、その染色体のもつ機能解析のため微小核細胞融合法によるヒト細胞への移入を行っている。DT40 細胞内で目的に応じて改変した染色体は、再びヒト細胞に戻すことにより本来その染色体が存在した環境下での機能の検討が可能である。また ES 細胞に移入することにより改変染色体の *in vivo* での検討も可能であるかも知れない。

以上、相同組み換えによる染色体の部位特異的改変は遺伝子のマッピング、及び機能解析に非常に有用である。しかしこれまでは哺乳類の細胞ではその頻度が著しく低いことから、一般的な手法とはなり得なかった。ここで DT40 細胞の出現により、基本的に目的とする部位の DNA さえ手に入れることができ

ば自由に染色体を改変することが可能となってきた。DT40 細胞を用いたさらなる展開が期待される。

D. 結論

- 1) DT40 細胞にヒト単一染色体を安定に効率よく導入する条件を確立した。
- 2) ヒト 5 番、6 番、7 番、8 番、14 番、18 番、19 番、21 番、22 番染色体を各々を完全に保持する DT40 細胞を樹立した。
- 3) ヒト染色体をテロメア・ターゲティングにより染色体欠失を生じさせる系を確立した。
- 4) ヒト染色体中の遺伝子をノックアウトし、遺伝子の機能や制御機構を解析するシステムを作製した。

E. 引用文献

- ① Kuroiwa Y, Shinohara T, Notsu T, Tomizuka K, Yoshida H, Takeda S, Oshimura M and Ishida I. Efficient modification of a human chromosome by telomere-directed truncation in high homologous recombination-proficient chicken DT40 cells. *Nucl. Acid Res.*, 26: 3447-3448, 1998
- ② Mitsuya K, Meguro M, Lee MP, Katoh M, Schulz TC, Kugoh H, Yoshida MA, Niikawa N, Feinberg AP and Oshimura M. LIT1, an imprinted antisense RNA in the human KvLQT1 locus identified by screening for differentially expressed transcripts using monochromosomal hybrids. *Hum. Mol. Genet.*, 8: 1209-1217, 1999
- ③ Lee MP, DeBaun MR, Mitsuya K, Galonek HL, Brandenburg S, Oshimura M and Feinberg AP. Loss of imprinting of a paternally expressed transcript, with antisense orientation to KVLQT1, occurs frequently in Beckwith-Wiedemann syndrome and is independent of IGF2 imprinting. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96: 5203-5208,

1999

F. 学会発表

1. 学会発表

- ① 野津智美、田中宏美、久郷裕之、清水素行、押村光雄 “DT40 細胞を用いたヒト3番染色体の改変” 第58回日本癌学会(広島)平成11年9月
- ② 野津智美、堀家慎一、田中宏美、久郷裕之、押村光雄、清水素行 “DT40 細胞を用いたヒト染色体の改変” 第44回日本人類遺伝学会(仙台)平成11年11月
- ③ Schulz TC, Takehara S, Kotobuki N, Uejima H and Oshimura, M. “Towards mouse transgenesis using translocated chromosomal fragments for intact human imprinted domains” Intl. Genomic Imprinting Meeting (Dublin), August 1999
- ④ 野津智美、堀家慎一、田中宏美、Schulz TC、林田敏郎、寿典子、中山祐二、久郷裕之、清水素行、押村光雄 “DT40 細胞におけるヒト染色体改変、及び機能解析” 日本分子生物学会(福岡)平成11年12月
- ⑤ 林田敏郎、西原茂城、寿典子、Schulz TC、押村光雄 “Genomic imprinting の解析のための DT40 細胞を用いた新しい手法” 日本分子生物学会(福岡)平成11年12月
- ⑥ Schulz TC, Takehara S, Kotobuki N, Uejima H, Niwa H and Oshimura, M. “Towards mouse transgenesis using a translocated human chromosomal fragment” 日本分子生物学会(福岡)平成11年12月

分担研究報告書

実験動物由来細胞株の性状確認および同定法の確立

分担研究者:加藤秀樹(浜松医科大学医学部附属動物実験施設)

研究協力者:六車香里(財団法人実験動物中央研究所)

研究要旨

実験動物に由来する培養細胞株は、医学・生物学の実験に広く用いられている。培養細胞株は、長期にわたる継続培養や、人為的なミスによるクロスコンタミネーションなどにより、性状が変化し、実験結果に大きな影響を与えることがあるため、常にその性状を確認しつつ実験を行わねばならない。本研究では、遺伝的性状の簡便な検査法の開発を目的としてきた。本年度は、rDNA の FISH 法および仁形成体の銀染色による、マウス系統の識別法の開発を行った。

A. 研究目的

rRNA (ribosomal RNA) をコードする rDNA 遺伝子を PCR 法により増幅させて得られる DNA の大きさ(bp)は動物種によって異なり、法医学分野においてその有用性が認められている。我々は、その手法を実験動物における動物種の同定に応用することを目的に実験を行ってきた。その過程で rDNA 遺伝子の PCR 産物は、ラットの場合はほとんど一定の大きさ(bp)であるにもかかわらず、マウスでは複数のバンドからなる幅広いバンドパターンを示し、系統によるパターンの差が認められることを見いだした。

本研究では、このパターンの系統差を遺伝学的に証明し、細胞株の系統識別に応用することを目的とした。

B. 研究方法

動物:マウスの A/J 系統と SM/J 系統を親系

統として作出されたリコンビナント近交系 (SMXA RI) を使用した。

染色体標本の作製:各系統の脾臓細胞を採取し、20%FBS (Fetal Bovine Serum) を含む RPMI1640 で培養した。ConA と LPS を培養液に加え、リンパ球の増殖を促した。染色体標本は常法により作製した。

銀染色法と FISH 法:16SrRNA, 28SrRNA は DNA によりコードされており、二次狭窄部位に仁形成体 (NOR:nucleolar organizer) として検出される。NOR を検出するためにスライド上の染色体標本に対して銀染色を施し、光学顕微鏡下で Ag-NOR バンドとして検出した。一方、FITC 標識した rDNA をプローブに用い、直接染色体上に rRNA 遺伝子を検出する方法としての FISH (fluorescence in situ hybridization) 法を導入した。

C. 研究結果および考察

Ag-NOR バンドの検出法としての銀染色法を第5染色体の染色体異常を持つマウス, IST 系統の染色体標本を用いて検討した。その結果, 一部の染色体の動原体部分が黒色に染色されたことから, 同法を導入できたと考えられた。

次に, rRNA 遺伝子を染色体上に検出するための方法として FISH 法について IST 系統の染色体標本を用いて検討した。結果として, 銀染色法で黒色のバンドが認められた染色体の動原体部分に FITC シグナルを観察した。以上の結果から, FISH 法についても導入できたと考えられた。

A/J 系統, SM/J 系統および 23 種類のリコンビナント近交系 (SMXA RI) の染色体標本作製中である。

Ribosomal DNA の PCR 産物は大きさあるいは長さ (bp) とその数に系統差が認められ, 電気泳動像としてはバンドパターンの違いとして観察される。一方, rDNA は染色体の二次狭窄部位に存在し, マウスでは系統毎にその分布が異なることが知られており, PCR 産物で観察される個々のバンドとの関係について興味を持たれる。

本研究の今後については, まず, 各系統の染色体標本作製を行なうと共に核 DNA を抽出すると共に核 DNA をテンプレートとして PCR を行ない産物のバンドパターンを系統毎に特定する。一方, 染色体標本について核型標本作製した後に Ag-NOR バンド処理を施し, 核バンドの染色体番号を特定する。PCR バンドパターンから得られた情報と Ag-NOR の染色体分布情報を総合し, PCR バンドと染色体番号との対応を試み, もし一致することが分かれば, rRNA の PCR 産物を用いたマウス系統

の識別が可能となり, 培養細胞株などの遺伝検査に有用である。

D. 結論

rRNA をコードする rDNA の PCR 産物の遺伝的多型性を解析することを目的に SMXA RI (リコンビナント近交系) を対象として Ag-NOR バンド検出法 (銀染色法) ならびに FISH 法を適用する基礎的研究を行なった。

E. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

分担研究報告書

トランスジェニック動物からの細胞収集

分担研究者： 黒澤 努 大阪大学医学部 附属動物実験施設 助教授

研究要旨

トランスジェニックマウスなどの遺伝子改変動物に由来する培養細胞株の多くは、個体レベルでの改変遺伝子の作用等がすでに解明されており、細胞レベルでの実験に有用な情報が容易に得られることから、実験資材として有用と考えられる。これまでに、コネクシン 43 遺伝子ノックアウトマウスに由来する繊維芽細胞株の作製を行い、個体レベルでの病態と細胞レベルでのコネクシン遺伝子欠損による機能変化について検討を行い、in vitro での実験に有用であることが示された。本年度から、遺伝子改変動物の開発・研究を行っている研究者に呼びかけを行い、遺伝子改変動物の収集および細胞株作製を開始した。

A. 研究目的

トランスジェニックマウスやノックアウトマウスなどの遺伝子改変動物は、特定の遺伝子機能を変えることによる、個体レベルでの機能変化を調べることを目的とし、これまでに多くの病態モデル動物が作製されてきた。従来は、ランダムな突然変異を誘発し、多数の変異個体をスクリーニングすることにより病態モデル動物が作製されてきたが、遺伝子改変動物の場合、原因遺伝子がすでに明らかであること、副次的な変異の影響を考慮する必要が無いことなどの利点があり、様々な分野で活用され始めている。これらの遺伝子改変動物に由来する培養細胞株の多くは、個体レベルでの改変遺伝子の作用等がすでに解明されており、細胞レベルでの実験に有用な情報が容易に得られることから、実験資材として有用と考えられるが、内外の細胞バンクで配布されてに

は至っていない。そこで、本年度から、遺伝子改変動物の開発・研究を行っている研究者に呼びかけを行い、遺伝子改変動物の収集および細胞株作製を開始した。

B. 研究方法

国内で遺伝子改変動物の開発・研究を行っている研究者にアンケートを行い、細胞株を作製した場合に JCRB 細胞バンクからの配布が可能な遺伝子改変動物を調査した。

有効な回答が得られたアンケートについて、その遺伝子改変動物の性状の文献調査を行い、有用と思われる遺伝子改変動物のリストを作製した。

C. 研究結果および考察

表1に、細胞配布が可能であることが確定した遺伝子改変動物のリストを示した。遺伝子

改変動物は、論文発表、特許との関係や、樹立者の異動等によって承認が得られない場合が多く、通常の細胞株の収集よりも多少の困難が伴った。また、最近では、作出された遺伝子改変動物の系統は、凍結胚の状態で保存されることが多くなり、育成継続されているものからの細胞収集になることから、得られる系統が限定されることもある。

今回、収集が可能であることが確定した遺伝子改変動物は、臓器特異的プロモータによって特定臓器に改変遺伝子を発現したり、loxP システムによって臓器や発生ステージに特

異的にゲノム操作が可能なもの、ES 細胞のフィーダ細胞として有用なものなど、多岐にわたる分野に利用可能なものと考えられる。

実際の細胞株作製にあたっては、動物の輸送、改変遺伝子が発現する特定臓器からの細胞分離法など、なお検討すべき事項が残されているが、今後、これらの問題解決とともに、さらなる収集作業を続けていきたい。

Knockout mouse

Cx43 ko (homo)	Connexin 43 をノックアウトしており、ギャップ結合による細胞間連絡に異常が認められる。
Cx43 ko (hetero)	

Transgenic mouse

EGFP-GPI tg	GPI 5'側と EGFP の融合タンパクを発現し、臓器における GPI の発現や、細胞内の GPI の局在を蛍光で確認できる。
LCK-Cre tg	p56 ^{lck} プロモータにより、T 細胞特異的に Cre 組換え酵素を発現。
GAG-Cre tg	初期胚から成体にいたる多様な臓器で Cre 組換え酵素を発現
GAG-CAT-Z tg	Cre 組換え酵素の発現により、CAT から lacZ に発現が切り替わる。loxP 系の確認用。
T3 ^b -IL12 p40 tg	T3 ^b プロモータにより、腸上皮に IL12 p40 を発現する。
AC-neo tg	G418 に耐性を示す、ES 細胞用フィーダーを作製できる。

D. 結論

トランスジェニックマウスやノックアウトマウスなどの遺伝子改変動物に由来する培養細胞株の作製・収集を目的とし、一連の作業を行った。本年度は、すでに作製が完了している 2 株に加えて、6 系統の遺伝子改変動物について細胞配布が可能であることが確定した。

E. 研究発表

- 論文発表
なし
- 学会発表
なし