

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

脳21 (2001.10) 4巻4号:403～409.

ポストゲノムのジーンディスカバリー

板東良雄, 片山泰一

技術

ポストゲノムのジーンディスカバリー

ばんどうよしお かたやまたいいち
板東良雄, 片山泰一

大阪大学大学院医学系研究科ポストゲノム疾患解析学講座プロセッシング機能形態分野
(〒565-0871 吹田市山田丘2-2)
E-mail: ybando@anat2.med.osaka-u.ac.jp, katayama@ant2.med.osaka-u.ac.jp

実験のコツと注意点

ポストゲノム時代を迎え、蛋白質の機能解析がますます重要視されつつあり、疾患に関する蛋白質の探索（ジーンディスカバリー）は、現在まで未解明だった難治疾患の治療法や創薬への道を切り開くと期待されている。近年、蛋白質レベルにおけるジーンディスカバリー技術は従来までのDNAやRNAレベルでの遺伝子探索法に比してよりパワフルな技術として発展しており、比較的簡便に利用できる技術となってきた。

はじめに

20世紀後半に始まったヒトゲノムプロジェクトもついに終了の段階にまできている。WatsonとCrickがゲノムの実体であるDNAの構造（二重らせん構造）を解明して以来、誰がこのような急速な科学の発展を予測したであろう。同プロジェクトが我々に与えた影響は計り知れないことは言うまでもないが、ヒトゲノム配列の決定により今まで原因不明だった神経難病の責任遺伝子や関連遺伝子が解明される日も近いかもしれない。実際、DNAアレイのように短時間で大多数の遺伝子の動きを同時に見ることができる技術も進歩し、既にさまざまな疾患における遺伝子発現の解析が数多く報告されており、遺伝子発現プロファイリングも可能となりつつある。また患者の体質に合わせた治療が求められている現在、テーラーメイド医療の確立

に向けたSNP（Single Nucleotide Polymorphism）プロジェクトも着々と進められており、本格的なポストゲノム時代に入ったと言える。

1. プロテオーム解析の現状と問題点

ポストゲノム時代における我々の使命は、疾患時にどのような遺伝子がどのように発現するのか、さらには合成された蛋白質がどのような機能を果たしているかという問題を解明することであろう。DNA、RNAレベルにおける解析は上述した通り、急速に技術が進歩していることは言うまでもない。しかしながら、特に真核細胞においてはmRNAの発現量と蛋白質の発現量に必ずしも相関性が見られないこと、合成された蛋白質は糖鎖修飾、リン酸化や分解酵素による切断などさまざまな翻訳後修飾を受けることにより、その蛋白質としての機能を発揮することができる。したがって、ポストゲノム時代を迎え、蛋白質レベルでの解析（プロテオーム解析）はなくてはならない技術となりつつある。現在のところ、プロテオーム解析の主流は二次元電気泳動法による解析がほぼ唯一の手法といえる。検出法にもよるが、約2,000個程度の蛋白質のスポットを1枚のゲル上に容易に検出することができる。この検出される蛋白質のスポットは細胞内の状況に応じて生じる発現量の変化や修飾による変化を反映しており、このようなアプローチにより病態に関連した新しい蛋白質が見出された例も既に報告されている。しか

しながら、大量の試料を要すること、そして何よりも蛋白質の性質や翻訳後修飾によって分離精製法を変えなければならず、分子生物学のように単一のプロトコールが存在しない。すなわち、ポストゲノム時代の重要な一分野を築くことを期待されている一方で、コストパフォーマンスの問題、分離精製やアミノ酸シーケンス技術にかなり熟練を要するなど、まだまだ技術的な問題点も数多く残っている。

2. ポストゲノムのジーンディスカバリー

分子生物学の分野においても「ポストゲノム型分子生物学」というべき分野が急速に発展している。「ポストゲノム型分子生物学」とは、「ゲノムプロジェクトにより得られた遺伝情報データベースをもとに、遺伝子がどのように発現し、その転写産物の諸性質が生物の表現型にどのような影響を与えるかについてより体系的かつ網羅的に理解する」学問と位置付けることができる。一方、発現クローニング法は蛋白質を実際に細胞内で発現（抑制）させることによる表現型の変化を指標とする、蛋白質の機能を重視したクローニン

グ法として非常に有効な手法であり、まさに「ポストゲノム型分子生物学」的手法として、今後ますます脚光を浴びると考えられる技術である。しかしながら、利便性の良い種々のDNA、RNAレベルのクローニング法（例えば、Differential Display, Subtraction法¹⁾）、また外来性の遺伝子導入効率やコピー数の問題が大きな壁となっていた。本稿では、図1に示すような細胞死を抑制する因子の探索法について、産業技術総合研究所で開発されたりボザイムを用いたジーンディスカバリー法、我々の教室で行っているレトロウイルスを用いたジーンディスカバリー法について紹介したい。リボザイム法は細胞死促進因子をアンチセンス法によって抑制することにより、レトロウイルス法は細胞死防御因子の強制発現によってともに細胞死を抑制すると推測される。

3. 遺伝子ノックダウン法

蛋白質の機能を解析する際、目的蛋白質を発現させる系（強制発現系）と抑制する系（強制抑制系）が頻繁に用いられている。近年のポストゲノム型分子生物

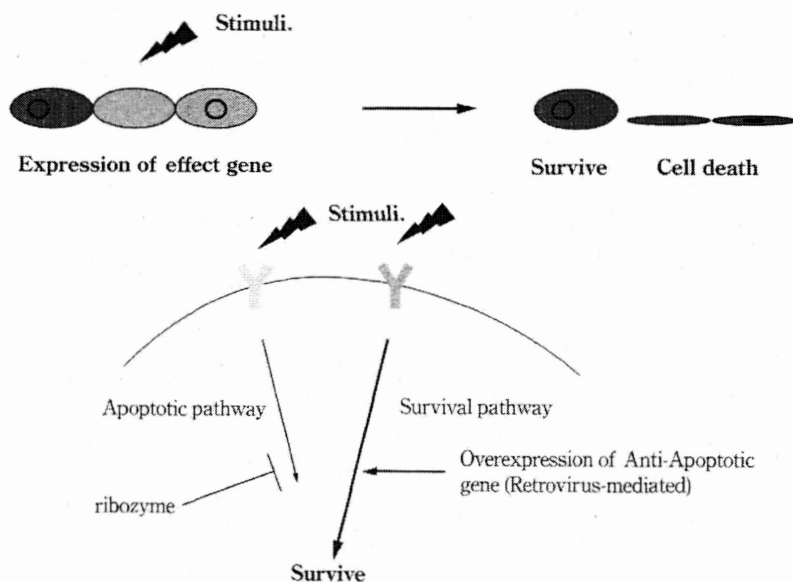


図1 細胞死の系における発現クローニング法の原理

発現クローニング法（ジーンディスカバリー法）は細胞の表現型の変化をもとにクローニングする方法である。細胞死の系におけるリボザイム法は細胞死を促進する因子を抑制することにより、またレトロウイルス法は細胞死を防御する因子を細胞内に強制発現させることにより、細胞死を回避する細胞群が存在する。リボザイム法は導入されたりボザイムの塩基配列から、レトロウイルスは発現した因子の塩基配列から、キーとなる因子を同定することができる。

学においては以前にもまして短時間かつ効率よく遺伝子ノックアウト（ノックダウン）する技術が必要となっていることは言うまでもない。現在までにこのような遺伝子ノックダウン法は、相同組替えによる遺伝子ノックダウン法、ドミナントネガティブ法、アンチセンス法、RNAi法²⁾、リボザイム法³⁾が開発されている。後ほど紹介するレトロウイルスを用いたジーンディスカバリー技術が前者の応用であるのに対して、後者によるジーンディスカバリー法は近年まで存在しなかった。例えば、細胞死を促進する因子の探索は困難であった。しかしながら、この遺伝子ノックダウン法を用いてジーンディスカバリーができれば後者のアプローチも可能となるわけである。

4. リボザイムの発見とその機能

1981年にCechらが、テトラヒメナのrRNAの研究中、蛋白質酵素の存在しない系でその前駆体RNAのイントロンRNAの自己切断により切り出されることを発見し、リボザイム（ribozyme; ribonucleic acid + enzyme, Rz）と命名した。このリボザイムの発見は、RNAは遺伝情報を蛋白質に翻訳する際の仲介物質であり、酵素活性を有するのは蛋白質のみであるという従来の常識を覆すものであった。つまり、リボザイムとは触媒機構をもつRNA一般を指す総称であり、狭義にはRNA鎖を配列特異的に切断するRNA分子のことである。現在までにさまざまなリボザイムが同定されているが、中でもハンマーヘッド型リボザイム（以下、単にリボザイムとする）はRNA分子間（トランス）で切断することができる小型のリボザイムとして広く研究されており、遺伝子治療や特定遺伝子の機能解析のツールとして注目されている⁴⁾。

5. リボザイム(Rz)による標的因子の発現抑制機構

Rzは構造的にステムI、ステムループII、ステムIIIと活性中心部位の四つの領域から構成される（図2）。中でも活性中心領域はマグネシウムイオンの配位する領域であり、リボザイムの触媒能を左右する重要な役割を担っている。ステムIとステムIIIは基質認識部位であり、この配列を標的遺伝子と相補的な配列に設計すれば、ほぼどんな遺伝子に対するRzも構築する

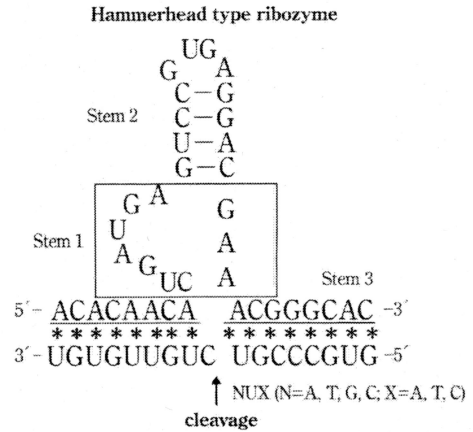


図2 ハンマーヘッドリボザイムの構造

mRNA認識部位は自由に変えることができる。これが細胞内でDNAから転写されると、途中のループ領域の根元部分にMgイオンが入り、認識したmRNAを切断する。

ことができる。このRzを細胞内で発現させることによって標的遺伝子のmRNAが切断され、結果的に標的遺伝子の細胞内発現が抑制される⁴⁾。

6. ランダムリボザイムライブラリー(rRz)の構築と遺伝子導入

我々はこのリボザイムの基質認識部位にランダムな配列を導入することにより、理論上⁴⁾¹³とおりのrRzを構築することに成功した（図3）。このrRzを市販の遺伝子導入試薬を用いて神経芽細胞腫SKNSH細胞に一過性に遺伝子導入を行った後、小胞体ストレスであるtunicamycinを負荷することにより細胞死を誘導した⁵⁾。Mock群がほぼ100%細胞死を起こす条件下でrRz導入により生き残った細胞群から導入されたプラスミドを回収し、シーケンスにより導入されたRzの塩基配列を決定した。さらに、この配列をもとにターゲット遺伝子を同定した。我々は既にいくつかの細胞死促進因子と思われる遺伝子群の同定に成功しており、現在個々の遺伝子に対する解析を進めている（未発表データ、図4、表1）。

7. レトロウイルスを用いたジーンディスカバリー

近年、アデノウイルスやレトロウイルスなどのウイルスゲノムを用いた高効率の遺伝子導入法により、神経細胞においても高効率に発現できることが確認され

技術

ている。目的や条件に応じて使用するウイルスベクターを検討する必要があるが、神経系において最も頻繁に使われているウイルスベクターはアデノウイルスと

表1 候補遺伝子のリストの一例

リボザイムの塩基配列から同定された候補遺伝子のリストの一例。未発表データであるため、またプロファイリング中であるために具体的なクローン名の表記は控えさせていただいた。

	候補遺伝子	細胞内局在	機能
1	1-47	核, 細胞質	細胞死関連因子
2	1-67	核	細胞死関連因子
3	2-32	核	細胞死促進因子
4	2-45	核	細胞死促進因子
5	2-77	細胞膜	細胞死関連因子
6	2-84	核	細胞死促進因子
7	2-34	?	KIAA, 脳に高発現
8	2-53	?	KIAA, 脳に高発現
9	2-122	?	KIAA, 脳に高発現
10	2-135	?	KIAA, 脳に高発現

レトロウイルスであろう。レトロウイルスは、RNAを遺伝子としてもち、ウイルスにコードされた逆転写酵素によりそのゲノムRNAをDNAに変換する増殖過程をもつRNAウイルスである。このウイルスをベクターとして利用すれば、高力価のウイルスが比較的簡単に得られることに加えて、標的細胞にほぼ100%感染させることができる。また感染後、レトロウイルスDNAは宿主細胞のゲノムに安定に組み込まれるため、実質的にすべての感染細胞がウイルスによって持ち込まれた遺伝子を発現することができ、広範囲の細胞型での高発現を可能にする強力なエンハンサーエレメントを持っている。さらに詳細な内容については、参考著書が数多く存在しているので、そちらを参考にさせていただきたい⁶⁾。

レトロウイルスを用いた発現クローニング法は、1994年～1995年にかけて樹立されている⁷⁻⁹⁾。この方法は従来の大腸菌やCOS細胞を利用した発現クロー

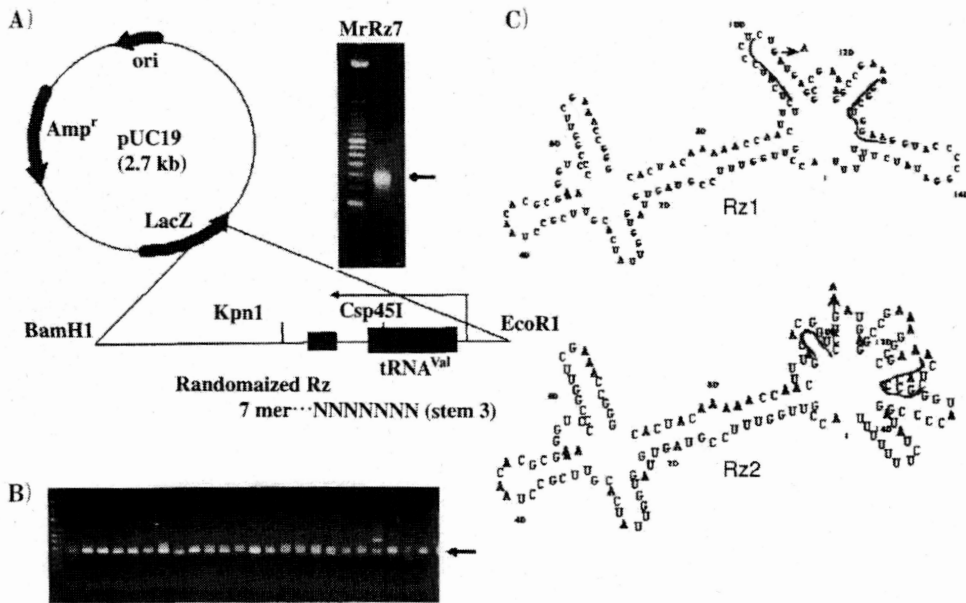


図3 ランダムライズリボザイムの構造

A: ランダムライズリボザイム発現系とランダムライズリボザイムのPCR。ステムI, IIIのmRNA認識部位をN7merとランダムライズし、合成後にPCRによって増幅した (Mr: マーカー, Rz7: リボザイムライブラリー)。

B: 構築後におけるランダムライズリボザイムの各コロニーのコロニーPCR。構築後のベクターを大腸菌にトランスフォーム後、ランダムにコロニーを選択し、コロニーPCRを行った (一番左端のレーンのみマーカー)。ほとんどすべてのクローンにおいて約100bp付近にリボザイムのバンドが認められた。

C: ランダムライズリボザイム二次元構造予測の一例。我々はtRNAとの連結型を採用しているため、クローバー構造とリボザイム構造の両方が認められる。下線部が基質認識配列部分と予測される。また、G→Aに置換することにより、このリボザイムを不活化することができる。この構造によってターゲット遺伝子の基質認識部にアクセスできるかどうかが決まる。

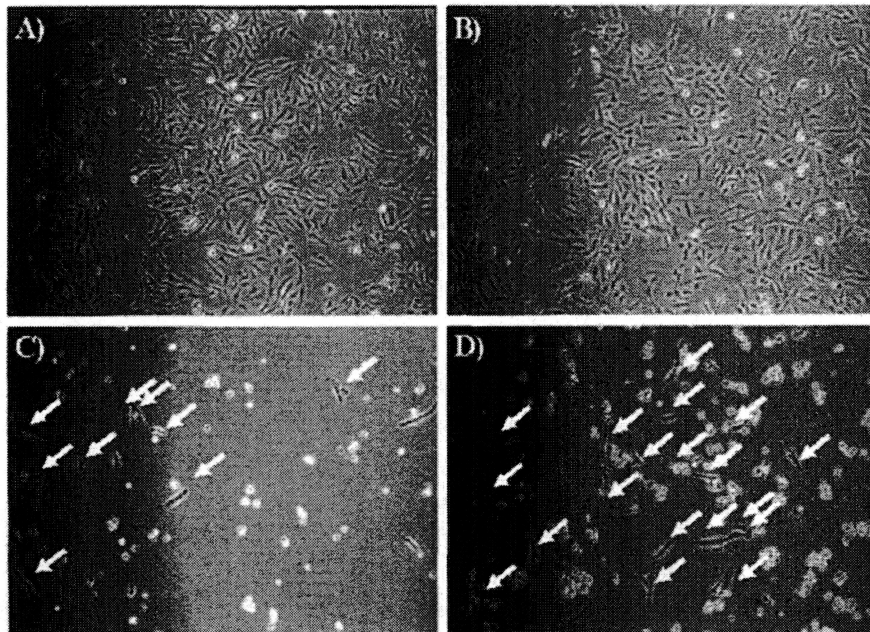


図4 リボザイム導入によって細胞死が抑制される細胞群が存在する

ランダムイズリボザイムを遺伝子導入した後, tunicamycin 2 $\mu\text{g/ml}$ 48hr 負荷した。明らかにリボザイム導入により, 細胞死が抑制された細胞群が存在した。
コントロール (Mock; A, rRz; B), tunicamycin 2 $\mu\text{g/ml}$ 48hr 負荷 (Mock; C, rRz; D).

ニング方法とは異なり, レトロウイルスが感染する細胞ならどんな細胞でも利用でき, 一度感染が成功すればその発現はアデノウイルスなど他のウイルスベクターに比べて長期間にわたって安定であるという利点がある。そのため, 従来の方法に比べて応用範囲も広く, レトロウイルスによる遺伝子導入により, さまざまな細胞において蛋白質の機能を指標として遺伝子が同定できるのである。一般的に発現クローニング法は多数のランダムな遺伝子を細胞内であらかじめ発現させておき, 目的に応じた負荷 (刺激) を与えた際に生じる表現型 (phenotype) の変化によって, 特定の機能をもった遺伝子を探索する技術である。

8. レトロウイルスライブラリーベクターの構築

我々は GFP を連結したレトロウイルスベクターにヒト脳由来の cDNA library をその発現制御を可能にするために TET-system の直下に導入した (図5)。TET-system については成書や論文で数多く紹介されているため, ここでは簡単に触れるのみにさせていただく。まず, この system は TET-ON/OFF が恒常的に導入されている細胞株を必要とするため, 我々は TET-

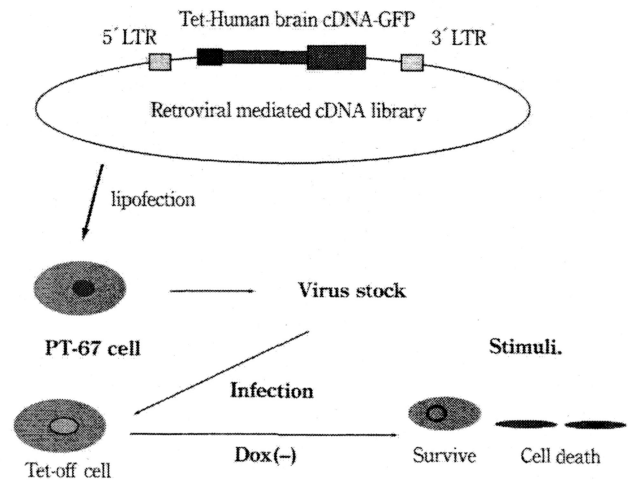


図5 レトロウイルスベクターによるジーンディスカバリー法

我々の用いたレトロウイルスベクターの概略図とジーンディスカバリー法について示した。

OFF 発現系細胞株を樹立した。TET-OFF 発現系は通常, Tetracyclin (あるいは Doxycyclin) 存在下ではその下流のターゲット遺伝子は発現抑制される。したがって, Doxycyclin を抜いた状態 (TET-OFF) でのみ, 初めてターゲット遺伝子は発現することができる¹⁰⁾。

9. レトロウイルスの作製

レトロウイルスのパッケージングはBOSC23やPT-67細胞のようなパッケージング細胞で行われる。作製したライブラリーベクターを通常のリポフェクション法により遺伝子導入する。ただし、ライブラリーベクターの場合、高力価のウイルスを回収する必要がある。導入効率の高い遺伝子導入試薬を用いることを薦める。通常は2~3日後に高力価のウイルスが回収できるため、遺伝子導入後2~3日目の培養上清液を回収し、その中に含まれるウイルスの力価をNIH3T3細胞において限界希釈法などにより測定する。ライブラリーの場合、 10^6 pfu/ml程度の力価があればよい。

10. ターゲット細胞へのレトロウイルスの感染

一般的なレトロウイルス感染方法と同様であるが、一つの細胞に複数の遺伝子が導入されることを防ぐために1 m.o.i以下（あるいは感染効率10~30%）になるように感染させる。感染効率を高くすると一つの細胞に多数のインテグレーションが生じ、後々のスクリーニングに大きな影響を及ぼし、解析に時間がかかる。

11. スクリーニング

現段階では解析可能な系に制約があるが、基本的には表現型の変化が顕著な系ほど短時間かつ簡便に目的の遺伝子をクローニングできることは言うまでもない。我々は、ウイルス感染後48 hr後にDoxycyclinを培養上清中から取り除き、導入した遺伝子発現をON

にし、さらに24 hr後にERストレスとしてtunicamycinによる負荷を与えた。スクリーニングはほぼ100% Mock細胞が細胞死を起こす条件下でMock細胞との比較で評価した。その結果、我々はレトロウイルス由来の遺伝子発現によって細胞死を回避した細胞群をいくつか得ることに成功した（図6）。生き残った細胞からゲノムDNAを分子生物学的手法により抽出した後、レトロウイルスベクターに特異的な配列のプライマーを用いてPCRにより、候補遺伝子をサブクローニングする。また、生き残った細胞（陽性細胞）をそのまま培養しておき、一般的な細胞死アッセイなどにより、スクリーニングによって得られた結果について再度評価を行う。1stスクリーニング終了時のコロニー数が非常に多い場合は、擬陽性を含んでいることが多いと考えられるため、2nd（場合によっては3rd）スクリーニングを行うか、系について再考しなければならない。最終的には、サブクローニングした遺伝子をシーケンスにより、塩基配列を決定し、データベースを用いてターゲット遺伝子を同定する。遺伝子の全長スクリーニング等については他の分子生物学の著書を参考にさせていただきたい。

III おわりに

我々は現在、どちらのジーンディスカバリー法によっても有用な遺伝子を複数単離することに成功しており（未発表データ）、個々の遺伝子の評価、細胞死のプロファイリングを精力的に行っている。またさまざま

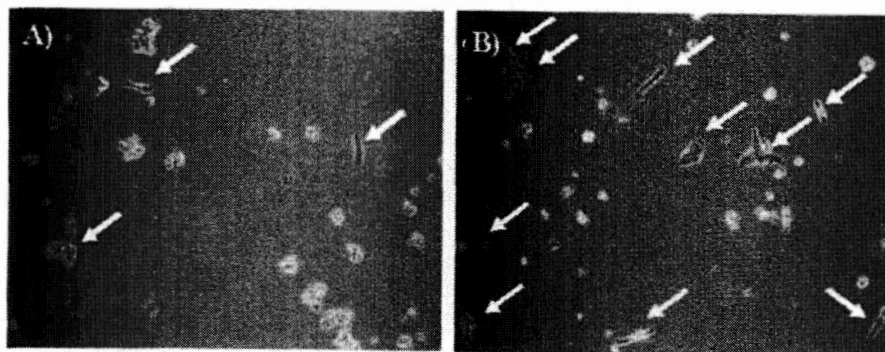


図6 レトロウイルス導入によって細胞死が抑制される群が存在する
レトロウイルスライブラリーベクターを導入した後、tunicamycin $10 \mu\text{g/ml}$ 48 hr 負荷した後の細胞。A: Mock, B: Library

まな系（神経細胞分化，ゴルジストレスなど）への適応についても検討しており，今後ますます期待できる技術と考えている．リボザイムを用いた遺伝子ノックダウン法は既にエイズやがんの遺伝子治療やさまざまな医薬品への応用に用いられており^{11,12)}，このような技術を応用したジーンディスカバリー法は新規遺伝子探索法としても非常に優れているだけでなく，キーとなる因子の同定も可能である．また，各国の研究者がこぞって遺伝子の機能を解析し，特許をとるのに躍起になっている現在，非常に短期間の間に新規遺伝子を単離できるこの技術は我々に自信すら与えてくれるといっても過言ではない．一方，レトロウイルスを用いる大きなメリットはスクリーニング中に得られる細胞群が既に恒常安定細胞であり，解析にかかる時間が大幅に短縮される点と1細胞あたりのcDNAのコピー数をかなり厳密にコントロールできる点である⁹⁾．そういった観点からもレトロウイルスを用いたジーンディスカバリーは従来までの問題を多くの面で克服した素晴らしいシステムである．また，レトロウイルス由来の発現蛋白の細胞内局在を利用したスクリーニング方法（signal sequence trap 法¹³⁾，FL-REX 法¹⁴⁾）も既に開発されており，今後ますます注目される技術として確立される日も近い．

謝辞

執筆にあたり，このような機会を与えてくださった遠山正彌教授（大阪大学大学院医学系研究科ポストゲノム疾患解析学講座プロセッシング機能形態学分野）に深謝いたします．また，ランダムリボザイムによるジーンディスカバリー法は多比良和誠教授（東京大学大学院工学研究科・産業技術総合研究所併任）のもと，川崎広明助手（同大学院同研究科）・須山英悟氏・大貫玲子氏（同研究所ジーンディスカバリーチーム）によって開発された技術であります．特に本稿の内容は大貫玲子氏との共同開発によるものであり，この場をお借りしまして深謝いたします．

参考文献

- 1) 津田 学：ディファレンシャルディスプレイ．*脳* 21 1 : 81-88, 1998.
- 2) Elbashir SM, et al : Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411 : 494-498, 2001.
- 3) Kawasaki H, et al : Distinct roles of the co-activators p300 and CBP in retinoic-acid-induced F9-cell differentiation. *Nature* 393 : 284-289, 1998.
- 4) 多比良和誠：RNA 研究の最前線 26-31, 2001.
- 5) Katayama, et al : Presenilin-1 mutations downregulate the signaling pathway of the unfolded-protein response. *Nature Cell Biol* 1 : 479-485, 1999.
- 6) 南木浩二：高力価レトロウイルスを用いた神経系への遺伝子導入．*脳* 21 2 : 247-254, 1999.
- 7) Rayner JR, et al : A simple and efficient procedure for generating stable expression libraries by cDNA cloning in a retroviral vector. *Mol Cell Biol* 14 : 880-887, 1994.
- 8) Whitehead I, et al : Expression cloning of oncogenes by retroviral transfer of cDNA libraries. *Mol Cell Biol* 15 : 704-710, 1995.
- 9) Kitamura T, et al : Efficient screening of retroviral cDNA expression libraries. *Proc Natl Acad Sci USA* 92 : 9146-9150, 1995.
- 10) Gossen M, et al : Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science* 268 : 1766-1769, 1995.
- 11) Kuwabara T, et al : A novel allosterically trans-activated ribozyme, the maxizyme, with exceptional specificity in vitro and in vivo. *Mol Cell* 2 : 617-627, 1998.
- 12) Warashina M, et al : RNA-protein hybrid ribozymes that efficiently cleave any mRNA independently of the structure of the target RNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 : 5572-5577, 2001.
- 13) Kojima T, et al : A signal sequence trap based on a constitutively active cytokine receptor. *Nature Biotechnol* 17 : 487-490, 1999.
- 14) Misawa K, et al : A method to identify cDNAs based on localization of green fluorescent protein fusion products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 3062-3066, 2000.