

DNA トランスフェクション法

研究協力者 関 口 睦 夫
(九州大学医学部生化学教室)

共同研究者 西 本 毅 治
関 口 猛
(九州大学理学部生物学教室)

序 論

先天異常の要因を明らかにする上で、その異常の遺伝的背景を知ることがきわめて重要である。特に遺伝的要因がはっきりしている場合には、その基礎となっている遺伝子を同定し、それを分離することができれば、その診断のみならず将来の治療への手がかりも得られるであろう。しかし先天異常は多くの場合その表現型からその原因となっている酵素や他の生化学的異常を知ることが難しく、cDNA を用いるクローニングには限界がある。そこでそのような場合に通用し得る方法として DNA トランスフェクション法について検討した。

これまで DNA トランスフェクション法によってヒトの各種の癌から癌遺伝子が分離されている。その原理は癌組織から抽出した DNA をマウス NIH3T3 細胞に移入し、その細胞がトランスホームしたことを指標として遺伝子をクローニングするものである。この場合移入された癌遺伝子は、正常細胞中に存在するそれに対応する遺伝子、すなわちプロトオンコジンに対して優性の性質を示すので、表現型の変化をみることができるのである。しかし多くの難病や先天性異常の原因となっている変異遺伝子は正常の遺伝子に対して劣性の性質を示すので、癌遺伝子のクローニングに用いられた方法をそのまま適用することはできない。この場合には変異遺伝子をもつ細胞に正常細胞の DNA を移入し、正常型へ変化した細胞を分離して、それから遺伝子をクローニングする必要がある。そこでそのモデルシステムとして、温度感受性 (ts) の細胞増殖を示す変異細胞を用いて実験を行った。

結 果

実験に用いた ts 株 (BN462) は、ハムスター胎児腎細胞株 BHK21 をニトロソグアニジンで処理して突然変異をおこさせ、FuDR 存在下に選択培養して得たものである。この株は33.5℃で培養するともとの株と同じように増殖するが、39.5℃では増殖できない。G1 期にしたこの細胞を高温にした時の高分子物質の合成を調べると、蛋白質、RNA の合成はほぼ正常におこるが、DNA 合成が特異的に抑えられることがわかった。このことはこの細胞は G1 期から S 期への進行を制御する遺伝子に欠損をもつことを示唆する。この遺伝子は HGPRT の遺伝

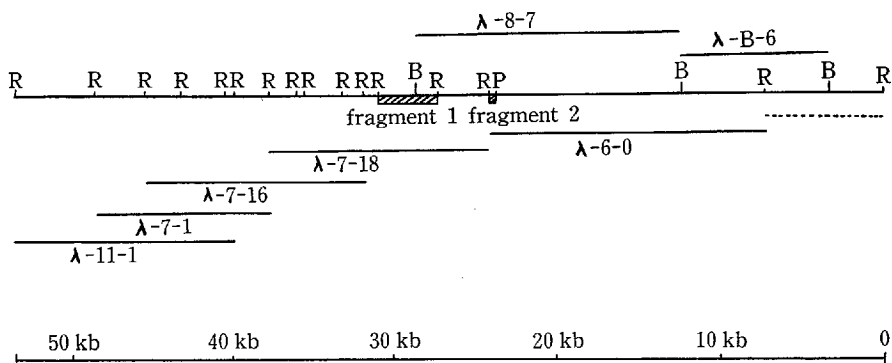


図1 tsBN462 変異を相補する DNA 領域の制限酵素地図。二次トランスホーマントの DNA のライブラリーから分離された7つのラムダクローンを含むヒト DNA の部分も示す。斜線の部分はサザンブロットで検出されるが、ラムダクローンには見出されなかった領域である。R; Eco RI, B; Bam HI, P; Pvu II の各制限部位。

子にリンクしているので、X染色体上に存在すると考えられる。

tsBN462 株にヒトの KB 細胞から抽出した高分子 DNA をリン酸カルシウムの沈澱とともに与え、その後33.5°Cで1日培養した後、39.5°Cに移して培養した。その結果非常に低い頻度ではあるが、39.5°Cでふる ts+株が得られた。コントロールとして tsBN462 株自体から抽出した DNA を与えた場合にはそれよりはるかに少ない数の ts+株が出現した。次に ts+株の中にヒトの DNA が入っているかどうかを知るため、ts+株から抽出した DNA を EcoRI で処理したのち ³²P でラベルしたヒトの DNA をプローブとしてサザンブロット解析を行った。その結果ヒト DNA で処理したのち得られた ts+10株のうち3株にヒトの DNA の存在が検出された。この中には ts 変異を制御する遺伝子とは無関係の DNA も含まれていると考えられるので、その遺伝子を濃縮するため、上記の第一次 ts+トランスホーマントから抽出した DNA を tsBN462 株へ与え、第二次トランスホーマントの DNA を EcoRI で処理したのち上と同じ方法でサザンブロットを行ったところ、共通して特有のバンドが見出された。それらのバンドはそれぞれ17, 7.2, 5.6, 3.5, 3.2, 2.8, 2.2 Kb の大きさを示し、それらを合計すると約41 Kbであった。おそらくこの上に tsBN462 株の変異を制御する遺伝子が存在すると考えられた。

この DNA をクローニングするために、第二次トランスホーマントから抽出した DNA を EcoRI または BamH3 で部分分解し、ラムダファージベクター (シャロン 4A または L47-1) に挿入してライブラリーをつくった。³²P でラベルした Alu をプローブとしてブランクハイブリダイゼーションを行い、その中から7つの組換え体を分離した。その中に含まれているヒトの DNA についてそれぞれ制限酵素分解パターンを調べ、50 Kb の全領域にわたる制限酵素地図を作製した。それには第二次トランスホーマントに見出されたほとんどすべての EcoRI のバンドが含まれていた。図1はその結果を示したものである。

先に述べたように tsBN462 変異を制御する遺伝子はヒトのX染色体上に存在している。ク

ローニングした DNA が果して X 染色体由来かどうかを調べるために、異なる数の X 染色体をもつ細胞の DNA を *EcoRI* で分解して電気泳動し、それにクローニングした DNA 中の Alu 配列を含まない断片をプローブとしてプロットハイブリダイゼーションを行った。用いた DNA は正常の男性 (XY), 正常の女性 (XX), 異常の男性 (XXY), 異常の女性 (XXXX) 由来のもので、バンドの強さは X 染色体の数に比例することがわかった。このことはクローニングした DNA が X 染色体由来のものであることを強く示唆する。なおこのバンドは一次および二次トランスホーマントには存在したが、もとの tsBN462 株には検出できなかった。

次にこの遺伝子に対応する mRNA を検出するため、クローニングした DNA 中の 2 つの小断片を用いてノーザンブロットングを行った。用いたプローブは図 1 に示す 3.5 Kb のフラグメント 1 と 0.8 Kb のフラグメント 2 である。対数増殖にある BHK21 細胞より抽出した細胞質 RNA を電気泳動し、上記のフラグメント 1 をプローブとして調べたところ、約 0.4 Kb の RNA のバンドが検出された。一方フラグメント 2 をプローブとした場合には全くバンドが検出されなかったため、この部分はイントロンの部分ではないかと考えられる。フラグメント 1 とハイブリッドをつくるバンドは tsBN462 株から抽出された RNA にも検出された。ts 性は塩基置換によって生じる可能性が高いため、このこともここで検出された RNA が tsBN-462 抑制遺伝子の産物であることを裏付けている。

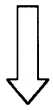
考 察

DNA トランスフェクション法を用いることにより、細胞増殖の G1 から S 期への進行を制御すると思われる遺伝子をクローニングすることができた。この遺伝子の産物と思われる RNA も検出できたので、すでに確立された方法を用いてその cDNA クローンを得ることも可能である。さらにこの cDNA を適当な発現ベクターに挿入すれば、その蛋白産物の同定や分離もできよう。

このように細胞増殖の ts 性という一般的な性質を指標にして、その背後にある遺伝子をクローニングできたことの意義は大きい。この方法はこのモデル系で示された突然変異細胞のみならず、培養細胞の状態で選択可能な形質を示す変異にかかわる遺伝子をクローニングするための基本的な方法になると考えられる。ただこの方法を先天異常などの解析に用いる場合には、その細胞を永続的増殖の状態にすること、その細胞へ効率的に DNA をとりこませる条件を確立することが必要である。殊にヒトの細胞の場合は DNA をとりこむ能力が低いので、ここで用いられたリン酸カルシウム法以外にエレクトロポレーションやレトロウイルスなどの適当なベクターを用いる方法についても検討する必要がある。

発 表 論 文

- 1) Sekiguchi, T., Sekiguchi, M. and Nishimoto, T. : A human X-linked gene required for G1 phase progression cloned by DNA transfection of a temperature-sensitive mutant of BHK21 cell line. *Molec. Cell. Biol.* submitted.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



序論

先天異常の要因を明らかにする上で、その異常の遺伝的背景を知ることはきわめて重要である。特に遺伝的要因がはっきりしている場合には、その基礎となっている遺伝子を同定し、それを分離することができれば、その診断のみならず将来の治療への手がかりも得られるであろう。しかし先天異常は多くの場合その表現型からその原因となっている酵素や他の生化学的異常を知ることが難しく、cDNA を用いるクローニングには限界がある。そこでそのような場合に通用し得る方法として DNA トランスフェクション法について検討した。これまで DNA トランスフェクション法によってヒトの各種の癌から癌遺伝子が分離されている。その原理は癌組織から抽出した DNA をマウス NIH3T3 細胞に移入し、その細胞がトランスホームしたことを指標として遺伝子をクローニングするものである。この場合移入された癌遺伝子は、正常細胞中に存在するそれに対応する遺伝子、すなわちプロトオンコジンに対して優性の性質を示すので、表現型の変化をみることができるのである。しかし多くの難病や先天性異常の原因となっている変異遺伝子は正常の遺伝子に対して劣性の性質を示すので、癌遺伝子のクローニングに用いられた方法をそのまま適用することはできない。この場合には変異遺伝子をもつ細胞に正常細胞の DNA を移入し、正常型へ変化した細胞を分離して、それから遺伝子をクローニングする必要がある。そこでそのモデルシステムとして、温度感受性(ts)の細胞増殖を示す変異細胞を用いて実験を行った。