

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4787960号
(P4787960)

(45) 発行日 平成23年10月5日(2011.10.5)

(24) 登録日 平成23年7月29日(2011.7.29)

(51) Int.Cl. F I
 C 1 2 N 5/10 (2006.01) C 1 2 N 5/00 1 O 2
 C 1 2 N 15/09 (2006.01) C 1 2 N 15/00 Z N A A

請求項の数 3 (全 20 頁)

(21) 出願番号	特願2006-16080 (P2006-16080)	(73) 特許権者	504202472
(22) 出願日	平成18年1月25日(2006.1.25)		大学共同利用機関法人情報・システム研究
(65) 公開番号	特開2007-195430 (P2007-195430A)		機構
(43) 公開日	平成19年8月9日(2007.8.9)		東京都立川市緑町10番3号
審査請求日	平成20年9月2日(2008.9.2)	(74) 代理人	110000084
			特許業務法人アルガ特許事務所
		(74) 代理人	100068700
			弁理士 有賀 三幸
		(74) 代理人	100077562
			弁理士 高野 登志雄
		(74) 代理人	100096736
			弁理士 中嶋 俊夫
		(74) 代理人	100117156
			弁理士 村田 正樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 セントロメア局在タンパク遺伝子のコンディショナルノックアウト細胞

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1又は2のアミノ酸配列からなるか、又は配列番号1又は2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、CENP-H及びCENP-Iに結合し、セントロメアへ局在し染色体分配を制御する機能を有するタンパク質CENP-K又はCENP-Mの遺伝子の染色体上における機能が欠損しており、テトラサイクリンに应答するプロモーターの下流に挿入された当該CENP-K又はCENP-Mの遺伝子を有する、テトラサイクリン应答性CENP-K又はCENP-Mノックアウト細胞。

【請求項2】

テトラサイクリンに应答するプロモーターの下流に挿入された前記CENP-K又はCENP-Mの遺伝子が、テトラサイクリンに应答するプロモーターの下流に前記CENP-K又はCENP-Mの遺伝子を挿入されたプラスミドとして存在するものである請求項1記載のノックアウト細胞。

【請求項3】

テトラサイクリンの非存在下で前記CENP-K又はCENP-Mを発現し、テトラサイクリンの存在下で前記CENP-K又はCENP-Mを発現しないものである請求項1又は2記載のノックアウト細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、セントロメアに局在するタンパク質の遺伝子のコンディショナルノックアウト細胞に関する。

【背景技術】

【0002】

生物が生命を維持するためには、全ゲノム情報を包括する構造体である染色体は安定に保持・増殖されなければならない。正常な細胞では、ほぼ決まった時間周期で染色体の複製と分配が正確に行われる。染色体の複製・分配といった基本的な生体反応に狂いが生じると染色体の異数化、がん化など細胞に対する悪影響が生じる。したがって、染色体分配機構の解明は、がん化の制御につながると考えられる。

10

【0003】

細胞分裂時に両極から伸びた紡錘体が染色体の特殊構造を捕まえて、娘細胞へ分配することで染色体分配はおこる。その際、紡錘体が捕らえる染色体の特殊構造はセントロメア（動原体）と呼ばれている。従って、セントロメアは染色体分配に重要な働きを担っている。また、がん細胞のように過剰な分裂を行う細胞では、セントロメアを構成するあるタンパク質が過剰に発現していることが報告されている（非特許文献1）。CENP-H及びCENP-Iは染色体分配に関わるセントロメア構成タンパク質であり、CENP-HとCENP-Iが結合していることは報告されている（非特許文献2）。ただし、CENP-HやCENP-Iは、染色体分配において未同定のタンパク質と作用して巨大複合体として機能すると予想されている（非特許文献3）。他のセントロメアタンパク質と同様に未同定のセントロメアタンパク質は、がん細胞で過剰に発現していることが予想される。したがって、未同定のセントロメアタンパク質は、制がん薬剤のターゲットになる可能性を秘めている。また、当該未同定のセントロメアタンパク質の機能解明やがん研究のためには、当該タンパク質遺伝子をノックアウトした細胞が必要になる。

20

【非特許文献1】Tomonaga et al., Cancer Res., 63, 3511-3516, 2003

【非特許文献2】Nishihashi et al., Dev. Cell, 2, 463-476, 2002

【非特許文献3】Fukagawa, Exp. Cell Res., 296, 21-27, 2004

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

本発明の目的は、セントロメアに局在し、CENP-H及びCENP-Iに結合して染色体分配を制御しており、制がん薬剤のターゲットとして有用な新規タンパク質を見出し、そのタンパク質遺伝子のノックアウト細胞を提供することにある。

30

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明者は、がん細胞の増殖制御を目指してセントロメアを構成するタンパク質について研究を行い、特にCENP-H及びCENP-Iに注目し、これに結合するタンパク質を探索してきた。その結果、今般、CENP-H及びCENP-Iに結合し、セントロメアへ局在し染色体分配を制御する機能を有する5種のタンパク質を見出した。そして、さらに研究してきたところ、そのうちの2種のタンパク質CENP-K及びCENP-Mは細胞増殖に必須であり、遺伝子を破壊するとノックアウト細胞は樹立できないことが判明した。そこで、さらに研究を続け、テトラサイクリンに応答するプロモーターの下流にCENP-K又はCENP-M遺伝子を挿入して細胞に導入し、当該細胞の染色体上のCENP-K又はCENP-M遺伝子をノックアウトすれば、テトラサイクリン応答性のコンディショナルCENP-K又はCENP-Mノックアウト細胞が得られることを見出し、本発明を完成した。

40

【0006】

すなわち、本発明は、配列番号1又は2のアミノ酸配列からなるか、又は配列番号1又は2のアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、セントロメアに局在し、かつCENP-H及びCENP-Iに結

50

合性を有するタンパク質 CENP - K 又は CENP - M の遺伝子の染色体上における機能が欠損しており、テトラサイクリンに応答するプロモーターの下流に挿入された当該 CENP - K 又は CENP - M の遺伝子を有する、テトラサイクリン応答性 CENP - K 又は CENP - M ノックアウト細胞を提供するものである。

【発明の効果】

【0007】

CENP - K 及び CENP - M は、セントロメアを構成するタンパク質である CENP - H 及び CENP - I に結合し、かつセントロメアへ局在する性質を有することから、染色体の分配に深く関与しているタンパク質である。そして、本発明のコンディショナルノックアウト細胞は、細胞のがん化のメカニズム解明や染色体分配機能解明に有用なモデル細胞である。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

CENP - K 又は CENP - M は、配列番号 1 又は 2 のアミノ酸からなるか、又は配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加したアミノ酸配列からなり、セントロメアに局在し、かつ CENP - H 及び CENP - I に結合性を有するタンパク質である。ここで配列番号 1 が CENP - K のアミノ酸配列、配列番号 2 が CENP - M のアミノ酸配列である。ここで、上記 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列と配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列との相同性は、好ましくは 90% 以上、より好ましくは 95%、さらに好ましくは 98% 以上である。

20

【0009】

また、CENP - K 又は CENP - M をコードする遺伝子としては、前記タンパク質をコードするものであれば制限されないが、例えば配列番号 6 又は 7 の塩基配列からなる DNA、又は配列番号 6 又は 7 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジエントな条件下でハイブリダイズし、かつ CENP - H 及び CENP - I に結合性を有するタンパク質をコードする DNA が挙げられる。ここで、ストリンジエントな条件とは、例えば 0.1% SDS を含む 0.2 × SSC 中 50、又は 0.1% SDS を含む 1 × SSC 中 60 の条件である。

【0010】

30

配列番号 1 又は 2 のアミノ酸配列及び配列番号 6 又は 7 の塩基配列は、ニワトリ由来のタンパク質及びそれをコードする遺伝子である。しかし、前記の如く 1 又は数個のアミノ酸配列が欠失、置換又は付加されたアミノ酸配列からなり、かつ CENP - H 及び CENP - I に結合性を有する限り、ヒトを含む哺乳類由来のタンパク質も本発明に含まれることは言うまでもない。

【0011】

セントロメアに局在するタンパク質の同定は、生化学的手法や遺伝学的手法を用いることで数多く試みられている。しかしながら、存在量の少なさや抽出技術の困難さから、新しくセントロメアタンパク質を同定したという成功例は数少ない。また、既存のセントロメアタンパク質にタグをつけたタンパク質を細胞内で大量発現させて、結合タンパク質を同定する試みが最近さかんに行われている。しかしながら、大量発現することで、そのタンパク質がセントロメア以外の場所に局在し、セントロメアに局在するセントロメアタンパク質同定がうまくいかないなど技術的な問題点が数多くあった。

40

【0012】

CENP - K 又は CENP - M は、例えばニワトリ DT40 細胞を用いて、以下の如くして分離できる。すなわち、ニワトリ DT40 細胞内では、相同組み換えが高頻度でおこるために遺伝子改変を効率的に行うことができる。セントロメアタンパク質 CENP - H 又は CENP - I の発現を 100% タグ付きの融合タンパク質に置き換えた細胞株を樹立した。この細胞株では、タグ付きの CENP - H や CENP - I がセントロメア以外に局在してしまうという前記問題点が克服できていた。そこでこれらの細胞株を用いてクロマ

50

チン画分を調製し、抗タグ抗体を用いた免疫沈降法によりCENP-H及びCENP-Iと結合するタンパク質を同定した。得られたペプチド配列をもとにcDNAクローニングすることにより、配列番号1又は2のアミノ酸配列からなる2種類のタンパク質CENP-K又はCENP-M得られる。

【0013】

得られたCENP-K又はCENP-Mは、これをGFP融合タンパク質等の標識タンパク質として細胞内で発現させれば、細胞周期を通じてセントロメアへ局在することが確認できる。

【0014】

かくして得られたCENP-K又はCENP-M及びこれらの遺伝子は、アミノ酸配列又は塩基配列が判明したので、前記手段に限定されず、ペプチド合成等により製造することもでき、通常の遺伝子組み換え手段により製造できることは言うまでもない。

【0015】

CENP-K又はCENP-Mは、CENP-H及びCENP-Iに結合し、かつセントロメアへ局在する。従って、染色体の分配に必須のタンパク質である。

【0016】

本発明において、CENP-K又はCENP-Mをコードする遺伝子の機能を欠損させたとは、該遺伝子の遺伝子産物であるCENP-K又はCENP-Mが正常に産生されないようにしたことをいい、CENP-K又はCENP-M自体が産生しない場合、及び一部を欠損するなどして機能を発現し得ないタンパク質を産生する場合は含まれる。

【0017】

CENP-K又はCENP-Mを直接ノックアウトさせたところ、ノックアウト細胞は樹立できなかつた。これは、CENP-K及びCENP-Mがいずれも、細胞増殖に必須のタンパクであることを示している。そこで、細胞に、テトラサイクリンに应答するプロモーターの下流にCENP-K又はCENP-M遺伝子を挿入したプラスミドを導入した後、染色体上のCENP-K又はCENP-Mをノックアウトしたところ、テトラサイクリン非存在下ではCENP-K又はCENP-Mが発現するため、細胞増殖し、一方、テトラサイクリン存在下ではCENP-K又はCENP-Mが発現しないため細胞増殖しなくなる特性を有するコンディショナルノックアウト細胞が樹立できた。

【0018】

テトラサイクリンに应答するプロモーターとしては、例えばプラスミドベクターpUHD10 (Gossen and Bujard, Proc. Natl. Sci. USA, 89, 5547-5551)が用いられる。テトラサイクリンに应答するプロモーターを有するベクターとしては、プラスミドでもファージでもよいが、プラスミドが好ましい。テトラサイクリンに应答するプロモーターを有するプラスミドは、pTRE2(クローンテック社)として市販されているものを使用することができる。

【0019】

テトラサイクリンに应答するプロモーターの下流にCENP-K又はCENP-M遺伝子を挿入するには、例えばpTRE2のマルチクローニングサイトを制限酵素で切断し、CENP-K又はCENP-Mの完全長cDNAとライゲートして、大腸菌に形質転換することにより行うことができる。

【0020】

テトラサイクリンに应答するプロモーターの下流にCENP-K又はCENP-M遺伝子を挿入されたプラスミド等を、細胞に導入するには、例えばプラスミドを制限酵素で切断して、線状化したのち、エレクトロポレーション(550V, 25 μ F)法等により行われる。

【0021】

次に、染色体上のCENP-K又はCENP-M遺伝子をノックアウトする。このノックアウトは、例えばCENP-K又はCENP-Mの遺伝子領域の一部又は全部を相同組み換え方法によって、染色体上の当該遺伝子を破壊することにより行なわれる。相同組み

10

20

30

40

50

換えは、他の遺伝子、例えば薬剤耐性遺伝子との間に相同組み換えを行うことにより、CENP-K又はCENP-Mの遺伝子の領域を細胞から欠失させることにより行うのが好ましい。

【0022】

テトラサイクリンに応答するプロモーターの下流にCENP-K又はCENP-M遺伝子を導入された細胞から、本発明のコンディショナルノックアウト細胞を樹立するには、具体的には次の如くして行われる。CENP-Mを例にして説明する。

宿主としては例えば、ニワトリのB細胞由来のDT40細胞を用いることができる。DT40細胞は2倍体であるため、CENP-Mが2ローカス存在する。そこで、2つのノックアウトコンストラクトを作成して順次遺伝子破壊を行う。はじめに、薬剤耐性遺伝子、例えばヒステジノール耐性遺伝子(hisD遺伝子)を含むノックアウトコンストラクトを導入する。このノックアウトコンストラクトがCENP-Mの遺伝子領域と相同組み換えを起こすと、CENP-Mのエキソン3からエキソン7がhisD遺伝子と置き換わり、CENP-Mの一つの遺伝子領域が破壊される。1遺伝子座が破壊された細胞へもう一つの薬剤耐性遺伝子、例えばピユーロマイシン耐性遺伝子を含む2つ目のノックアウトコンストラクトを導入して2遺伝子座も完全に破壊する。ノックアウト株の全ゲノムDNAを抽出して制限酵素で消化してゲル電気泳動後、DNAをフィルターに転写する。フィルターをラベルしたのちハイブリダイズして、遺伝子置換を起こしている細胞を選択する。

【0023】

また、CENP-Kは、性染色体にコードされているため1ローカスのみ存在している。従って、1ローカスの破壊ですべてのCENP-K遺伝子が破壊されるため、前記CENP-M遺伝子のノックアウトの一段階だけの操作を行えばよい。

【0024】

かくして得られるコンディショナルノックアウト細胞は、テトラサイクリン非存在下ではCENP-K又はCENP-M遺伝子を発現するので細胞増殖する。一方、テトラサイクリン存在下では、CENP-K又はCENP-M遺伝子を発現しない(ノックアウトされる)ので、増殖できない。従って、本発明のノックアウト細胞は、がん治療薬のスクリーニングモデル細胞として、また染色体分配の機構解明に有用である。

【実施例】

【0025】

次に実施例を挙げて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に何ら限定されるものではない。

【0026】

(1)細胞内のCENP-H又はCENP-Iタンパク質の全てをタグ付き融合タンパク質に置換された細胞株の確立

CENP-H遺伝子あるいはCENP-I遺伝子のゲノム領域と相同性のある約10Kbのゲノム配列をプラスミドベクターpBSへクローン化する。そのプラスミドへクローン化されたゲノム領域へ薬剤耐性遺伝子(ヒスチジノール耐性遺伝子あるいはピユーロマイシン耐性遺伝子)を挿入したプラスミドを構築する(ノックアウトコンストラクト)。エレクトロポレーション法(550V、25マイクロF)を用いて、制限酵素NotIで切断されたノックアウトコンストラクトをDT40細胞へ導入して、ノックアウトコンストラクトとゲノム領域が置換したニワトリDT40細胞株(CENP-HあるいはCENP-Iノックアウト株)を樹立する。相同組み換えの有無は、サザンハイブリダイゼーションで確認できる。平行して、CMVプロモーターの下流でFLAGタグ融合CENP-HあるいはCENP-Iタンパク質が発現するプラスミドベクターを構築する(FLAGタグ融合ベクター)。FLAGタグ融合ベクターをエレクトロポレーション法を用いて、CENP-HあるいはCENP-Iノックアウト株へ導入した。これらの細胞株では、野生型のCENP-HあるいはCENP-Iタンパク質がノックアウトされて、FLAGタグ融合CENP-HあるいはCENP-Iタンパク質が発現しているため、細胞内の全てのCEN

N P - HあるいはC E N P - Iタンパク質がF L A Gタグ融合C E N P - HあるいはC E N P - Iタンパク質に置き換わっている。

【 0 0 2 7 】

(2) C E N P - K及びC E N P - Mの分離

(1) で得た細胞を大量培養して間期の細胞を集めた。D o u n c eホモジナイザーを用いて細胞を破碎し、遠心分離によって核を調製する。核を緩衝液A (2 0 m M H E P E S - K O H p H 8 . 0 / 1 5 0 m M K C l / 1 m M D T T) に懸濁した後、超音波破碎し、遠心分離によってD N Aを含む画分を調製した。D N Aを含む画分に最終濃度3 m MのCa Cl₂を添加し、さらにマイクロコッカール・ヌクレアーゼを加えて4 1時間反応させ、D N Aを切断することによって、D N Aに結合しているタンパク質を可溶化した。K C l及びN P - 4 0をそれぞれ最終濃度3 0 0 m M及び0 . 1 %になるよう添加し、続いて抗F L A G抗体を固定化したレジンに添加して4 3時間攪拌した。抗F L A G抗体を固定化したレジンに遠心分離によって回収し、緩衝液B (2 0 m M H E P E S - K O H p H 8 . 0 / 3 0 0 m M K C l / 1 m M D T T / 0 . 1 % N P - 4 0) を用いて洗浄した。抗F L A G抗体を固定化したレジンに0 . 1 M Glycine p H 2 . 5 溶液を添加して1分間静置した後、遠心分離によって溶液を回収した。溶液に等量の2 0 %トリクロロ酢酸及び5倍量のアセトンを添加し、- 2 0 で2時間静置し、遠心分離によってタンパク質を回収した。

10

【 0 0 2 8 】

(3) タンパク質の同定

回収されたタンパク質をS D S - P A G Eによって分離した後、銀染色で検出し、ゲルを切り出して質量分析を行うことで各タンパク質の部分アミノ酸配列を決定した。各タンパク質の部分アミノ酸配列は、以下の通りである。

20

【 0 0 2 9 】

(C E N P - 4 0) Asp Gly Gly Gly Arg Met Pro Ala Ala Pro Leu Ala Gln Gly Lys Val Glu Arg

【 0 0 3 0 】

(C E N P - 3 5) Lys Gln Trp Thr Leu Tyr Ser Val Ser Pro Leu Tyr Lys Phe Ser Ser Ala Asp Leu Lys Asp Tyr Ala Arg Met Leu Gly Val Phe Ile Ala Ala Glu Lys Arg

【 0 0 3 1 】

(C E N P - 3 3) Lys Ala Glu Leu Glu Ser Leu Gln Arg Asp Leu Ser Phe Leu Val Lys Phe Thr Gly Ile Gln Ile Thr Ser His Ser Lys Lys Thr Leu Glu Lys Thr Gly Asn Arg

30

【 0 0 3 2 】

(C E N P - K) Arg Asn Pro Glu Leu Ile Ser Thr Asn Pro Glu Val Leu Leu Leu Leu Gly Glu Glu Glu Leu Gln Lys

【 0 0 3 3 】

(C E N P - M) Asn Val Gln Ala Ser Leu Ala Tyr Val Asp Val Arg Phe Phe Leu Gly Lys Val Cys Phe Leu Val Thr Gly Val Gly Arg Ala Asn Asn Cys Ser Val Glu Met

【 0 0 3 4 】

C E N P - I - G F P、C E N P - H - G F P、あるいはC E N P - H - 3 × F L A G融合タンパクを発現する細胞を大量培養し、クロマチン画分を調製した。抗G F P抗体あるいは抗F L A G抗体を用いてタンパク複合体を免疫沈降し、銀染色によってタンパクを検出した。得られた結果を図1に示す。コントロール実験として、野生型のD T 4 0細胞(wt)を大量培養し、クロマチン画分を調製して抗G F P抗体あるいは抗F L A G抗体を用いた免疫沈降実験を行った。ここで、検出されるタンパク質は、抗体の非特異的吸着により沈降されるタンパク質である。C E N P - I - G F P、C E N P - H - G F P、あるいはC E N P - H - 3 × F L A G融合タンパクを発現する細胞で、特異的に沈降され、コントロール実験で沈降される5本のバンドに着目して、それらをC E N P - I、C E N P - H、C E N P - 4 0、C E N P - 3 5、C E N P - 3 3、C E N P - K、C E N P - Mと

40

50

命名した。

CENP - 40、CENP - 35、CENP - 33、CENP - K、CENP - Mの各タンパクは、CENP - HやCENP - Iと特異的に結合することから、これらが構成的にセントロメアに局在するタンパク複合体であると考えられた。CENP - HをCENP - H - FLAGに置き換えた細胞から調製したサンプルとCENP - IをCENP - I - FLAGに置き換えた細胞から調製したサンプルで共通に見られる5本のバンドを切り出して部分的アミノ酸配列を決定した。

【0035】

(4) 得られた部分アミノ酸配列をもとにプローブを調製し、ニワトリ胚由来のcDNAライブラリーをスクリーニングした。各種タンパク質に関して複数種類のcDNAクローンを得て、得られたすべてのcDNAクローンの塩基配列を決定した。その結果すべての種類のタンパク質に関して開始コドンと予想されるATGが見いだされ、完全長のcDNAの塩基配列が決定できた。(CENP - Kが配列番号1及び6、CENP - Mが配列番号2及び7、CENP - 40が配列番号3及び8、CENP - 35が配列番号4及び9、CENP - 33が配列番号5及び10にそれぞれ対応する)。それらのcDNAを参考にプライマーを設計して、PCR反応を行いストップコドンを取り除いたcDNAを得て、その断片をpEGFPN1(クローンテック社)のBamHIサイトへクローン化した。それぞれのプラスミドは、ストップコドンが取り除かれてGFPのコード領域と融合している(GFP融合発現プラスミド)。GFP融合発現プラスミドをDT40野生型細胞あるいはCENP - H - RFP発現細胞(セントロメア領域が赤で標識されている細胞)へ導入して、GFP融合タンパク質としてそれぞれのタンパク質を安定に発現させた。それぞれのGFP融合タンパク質の安定発現細胞を集めて、PBSで洗浄後、サイトスピン法によってスライドグラス上に貼付けた。スライドグラスを3%パラホルムアルデヒドに15分間浸透させ、細胞を固定した。細胞をPBSでリンスした後0.3マイクロg/mLのDAPIで細胞核及び染色体を染色した。作成したスライドグラスを蛍光顕微鏡へ供してGFP融合タンパク質の細胞内局在を緑チャンネルで観察した。細胞形態によって、細胞分裂期の細胞と間期の細胞の区別が可能となる。5種類すべてのタンパク質がCENP - HやCENP - Iと同様に細胞周期を通じて点状のドットとして観察された。CENP - Hと局在をとともにすることから、すべてのタンパク質が細胞周期を通じてセントロメアへ局在していることが確認できた(図2~図6)。

【0036】

(5) CENP - Kノックアウト細胞

ニワトリのB細胞由来のDT40細胞を宿主に用いた。遺伝子破壊はCENP - Kの遺伝子領域の一部を欠損させたプラスミドコンストラクトと薬剤耐性遺伝子を結合させたノックアウトコンストラクトを細胞へ導入して、当該遺伝子領域と相同組み換え法によって、ノックアウトコンストラクトと遺伝子領域を置換させて遺伝子領域の一部を細胞から欠失させることで行った。

【0037】

CENP - Kは、細胞増殖に必須である遺伝子のために、この遺伝子を破壊すると細胞が死滅して、細胞を得ることができない。DT40細胞は2倍体であるため、CENP - Kが2ローカスあることが予想されるが、CENP - Kは性染色体上にコードされているため、1ローカスのみ存在している。したがって、1ローカスの破壊ですべてのCENP - Kの遺伝子が破壊される。

【0038】

そこで、遺伝子破壊に先立ち、テトラサイクリンに応答するプロモーターの下流にCENP - KのcDNAをつないだプラスミド作成した。またテトラサイクリン応答プラスミドtTA(クローンテック社)を用意した。CENP-Kプラスミドを100μgに対してtTAを20μgの割合で混ぜ、混ぜたプラスミドDNAをエレクトロポレーション法(550V 25μF)によって、細胞へ導入した。2つのプラスミドがインテグレートした細胞をサザンハイブリダイゼーションにより選別した。この細胞は、テトラサイクリン非存在下では、本プロモーター

から C E N P - K が安定に発現する。すなわち、この細胞では、C E N P - K は、本来の遺伝子領域からとテトラサイクリンに应答するプロモーターの 2 カ所から発現している。

【 0 0 3 9 】

この細胞へ図 7 に示すノックアウトコンストラクトを導入した。このノックアウトコンストラクトは、C E N P - K のゲノム領域をクローン化した後、エキソン 4 からエキソン 8 の部分を取り除き、h i s D 遺伝子を挿入して構築したものである。このノックアウトコンストラクトをエレクトロポレーション法 (550V 25 μ F) によって、細胞へ導入した。1mg/ml のヒスチディノールに耐性を示すクローンを拾った。このノックアウトコンストラクトが C E N P - K の遺伝子領域と相同組み換えを起こすと、C E N P - K のエキソン 4 からエキソン 8 がヒスチディノール耐性遺伝子 (h i s D 遺伝子) と置き換わり、C E N P - K の遺伝子領域が破壊される。ノックアウトコンストラクトを導入して h i s D 遺伝子を発現する細胞株を複数選択して全ゲノム DNA を抽出して制限酵素 N h e I および X h o I で消化してゲル電気泳動後、DNA をフィルターに転写した。フィルターを図 7 で示す p r o b e を放射能ラベルしたのちハイブリダイズして、遺伝子置換を起こしている細胞を選択した。DNA 置換が起きていないと約 1 7 k b にバンドがでる (図 8 の w i l d - t y p e) が、C E N P - K の遺伝子領域が破壊されている約 1 3 k b (図 8 の k n o c k o u t) のバンドをしめす。図 8 に示すようなバンドパターンが得られる細胞が目的のコンディショナルノックアウト細胞株である (# 1 0 - 8 9) 。

【 0 0 4 0 】

得られた C E N P - K のコンディショナルノックアウト細胞は、テトラサイクリンに应答するプロモーターからのみ C E N P - K を発現している。この細胞へテトラサイクリンを終濃度で 2 マイクログラム / m l 加えることで、このプロモーター活性が失われ、C E N P - K の遺伝子発現が抑制されることが期待される。そこで、テトラサイクリンの添加後、時間を追って細胞内の C E N P - K の量をウエスタンブロット法にて測定した (図 9) 。テトラサイクリンを添加後ある時間のたった細胞を 1 0 の 5 条個ずつ集めて、4%SDS に溶解して超音波破碎した。全細胞タンパク質を SDS-電気泳動に供し、泳動後ゲルをニトロセルロースフィルターへ移した。フィルターをスキムミルクでブロック後抗 C E N P - K 抗体と 1 時間以上インキュベートした。HRP ラベルした抗ウサギ抗体でタンパク質を検出した。その結果、テトラサイクリン添加後 2 4 時間でほとんど C E N P - K タンパク質が検出できなかった。また、テトラサイクリン添加後 4 8 時間で細胞増殖は止まり、その後細胞は死滅することが確認できた (図 1 0) 。細胞増殖の測定を行うためには、適当時間の培養後細胞をトリパンブルーで染色することによって細胞数をカウントした。以上の結果より、セントロメアタンパク質 C E N P - K のコンディショナルノックアウト細胞の樹立が確認できた。

【 0 0 4 1 】

(6) C E N P - M ノックアウト細胞

ニワトリの B 細胞由来の D T 4 0 細胞を宿主に用いた。遺伝子破壊は C E N P - M の遺伝子領域の一部を欠損させたプラスミドコンストラクトと薬剤耐性遺伝子を結合させたノックアウトコンストラクトを細胞へ導入して、当該遺伝子領域と相同組み換え法によって、ノックアウトコンストラクトと遺伝子領域を置換させて遺伝子領域の一部を細胞から欠失させることを行った。

【 0 0 4 2 】

C E N P - M は、細胞増殖に必須である遺伝子のために、この遺伝子を破壊すると細胞が死滅して、細胞を得ることができない。D T 4 0 細胞は 2 倍体であるため、C E N P - M は 2 ローカス存在する。そこで、はじめに 1 ローカスの C E N P - M 遺伝子座 (図 1 1 , 1 s t アリル) を C E N P - M エキソン 2 からエキソン 4 をヒスチディノール耐性遺伝子 (h i s D 遺伝子) と置き換えることにより破壊した。ノックアウトコンストラクトは、C E N P - M のゲノム領域をクローン化した後、エキソン 2 からエキソン 4 の部分を取り除き、h i s D 遺伝子を挿入して構築したものである。このノックアウトコンストラクトをエレクトロポレーション法 (550V 25 μ F) によって、細胞へ導入した。1mg/ml のヒス

ティディノールに耐性を示すクローンを拾った。このロックアウトコンストラクトがCENP-Mの遺伝子領域と相同組み換えを起こすと、CENP-Mのエキソン2からエキソン4がヒスティディノール耐性遺伝子(hisD遺伝子)と置き換わり、CENP-Mの1遺伝子領域が破壊される。ロックアウトコンストラクトを導入してhisD遺伝子を発現する細胞株を複数選択して、全ゲノムDNAを抽出する。DNAを制限酵素SalIで消化してゲル電気泳動後、DNAをフィルターに転写した。フィルターを図11で示すprobeAを放射能ラベルしたのちハイブリダイズして、遺伝子置換を起こしている細胞を選択した。DNA置換が起きていないと約17kbにバンドがでる(図12のwild-type)が、1遺伝子座のCENP-Mの遺伝子領域が破壊されると、17kbに加えて13.5kb(図12の1st)のバンドをしめす。

10

【0043】

2遺伝子座の遺伝子破壊に先立ち、テトラサイクリンに応答するプロモーターの下流にCENP-MのcDNAをつないだプラスミド作成した。またテトラサイクリン応答プラスミドtTA(クローンテック社)を用意した。CENP-Mプラスミドを100µgに対してtTAを20µgの割合で混ぜ、混ぜたプラスミドDNAをエレクトロポレーション法(550V 25µF)によって、細胞へ導入した。2つのプラスミドがインテグレートした細胞をサザンハイブリダイゼーションにより選別した。この細胞では、テトラサイクリン非存在下では、本プロモーターからCENP-Mが安定に発現する。すなわち、この細胞では、CENP-Mは、まだ遺伝子破壊されていない1遺伝子座のCENP-M遺伝子領域からとテトラサイクリンに応答するプロモーターの2カ所から発現している。

20

【0044】

この細胞へピユーロマイシン耐性遺伝子を含むロックアウトコンストラクトを導入した。このロックアウトコンストラクトがCENP-Mの2番目の遺伝子領域(図11、2ndアレル)と相同組み換えを起こすと、CENP-Mのエキソン2からエキソン4がピユーロマイシン耐性遺伝子と置き換わり、CENP-Mのすべての遺伝子領域が破壊される。作成したロックアウト細胞の全ゲノムDNAを抽出して制限酵素SalIで消化してゲル電気泳動後、DNAをフィルターに転写した。フィルターを図11で示すprobeAを放射能ラベルしたのちハイブリダイズして、遺伝子置換を起こしている細胞を選択した。DNA置換が起きていないと約17kbにバンドがでる(図12のwild-type)が、1遺伝子座のCENP-Mの遺伝子領域が破壊されると、17kbに加えて13.5kb(図12の1st)のバンドをしめす。また、1遺伝子座にcDNAを導入した細胞でも同様のパターンを示す(1st+cDNA)。2遺伝子座とも破壊されている細胞では、17kbのバンドはでずに、14.5kbと13.5kbのバンドをしめす(2nd+cDNA)。これが目的のロックアウトクローンの遺伝子座のパターンである。この細胞をP1-38と呼んでいる。

30

【0045】

得られたCENP-Mのコンディショナルロックアウト細胞は、テトラサイクリンに応答するプロモーターからのみCENP-Mを発現している。この細胞へテトラサイクリンを終濃度で2マイクログラム/ml加えることで、このプロモーター活性が失われ、CENP-Mの遺伝子発現が抑制されることが期待される。そこで、テトラサイクリンの添加後、時間を追って細胞内のCENP-Mの量をウエスタンブロット法にて測定した(図13)。テトラサイクリンを添加後ある時間のたった細胞を10の5条個ずつ集めて、4%SDSに溶解して超音波破碎した。全細胞タンパク質をSDS-電気泳動に供し、泳動後ゲルをニトロセルロースフィルターへ移した。フィルターをスキムミルクでブロック後抗CENP-M抗体と1時間以上インキュベートした。HRPラベルした抗ウサギ抗体でタンパク質を検出した。その結果、テトラサイクリン添加後48時間でほとんどCENP-Mタンパク質が検出できなかった。また、テトラサイクリン添加後72時間で細胞増殖は止まり、その後細胞は死滅することが確認できた(図14)。細胞増殖の測定を行うためには、適当時間の培養後細胞をトリパンブルーで染色することによって細胞数をカウントした。以上の結果より、セントロメアタンパク質CENP-Mのコンディショナルロックアウト細胞の樹立が

40

50

確認できた。

【図面の簡単な説明】

【0046】

【図1】CENP-I-GFP、CENP-H-GFP、あるいはCENP-H-3×FLAG融合タンパク質を発現する細胞から得られた抽出液を、抗GFP抗体あるいは抗FLAG抗体を用いて免疫複合体を免疫沈降させた結果を示す図である。図中、WTは野生株細胞を示す。

【図2】CENP-40の細胞内局在を示す図である。a、bはM期、cは間期であり、CENP-40は緑、DAPIは青に染色されており、細胞核及び染色体を示している。

【図3】融合タンパク質(merge)、DAPI(細胞核)、CENP-35及びCENP-Hの細胞内局在を示す図である。

10

【図4】融合タンパク質(merge)、DAPI(細胞核)、CENP-33及びCENP-Hの細胞内局在を示す図である。

【図5】CENP-Kの細胞内局在を示す図である。CENP-Kは緑、DAPI(細胞核)は青に染色されている。

【図6】融合タンパク質(merge)、DAPI(細胞核)及びCENP-Mの細胞内局在を示す図である。CENP-Mは緑、DAPIは青に染色されている。

【図7】DT-40細胞のCENP-K遺伝子ノックアウトコンストラクトを示す図である。

【図8】ノックアウト細胞選択のためのハイブリダイズ結果を示す図である。

20

【図9】ノックアウト細胞がCENP-Kを産生していないことを示す図である。

【図10】テトラサイクリン(Tet)存在下(+Tet)及び非存在下(-Tet)におけるCENP-Kノックアウト細胞の増殖速度を示す図である。

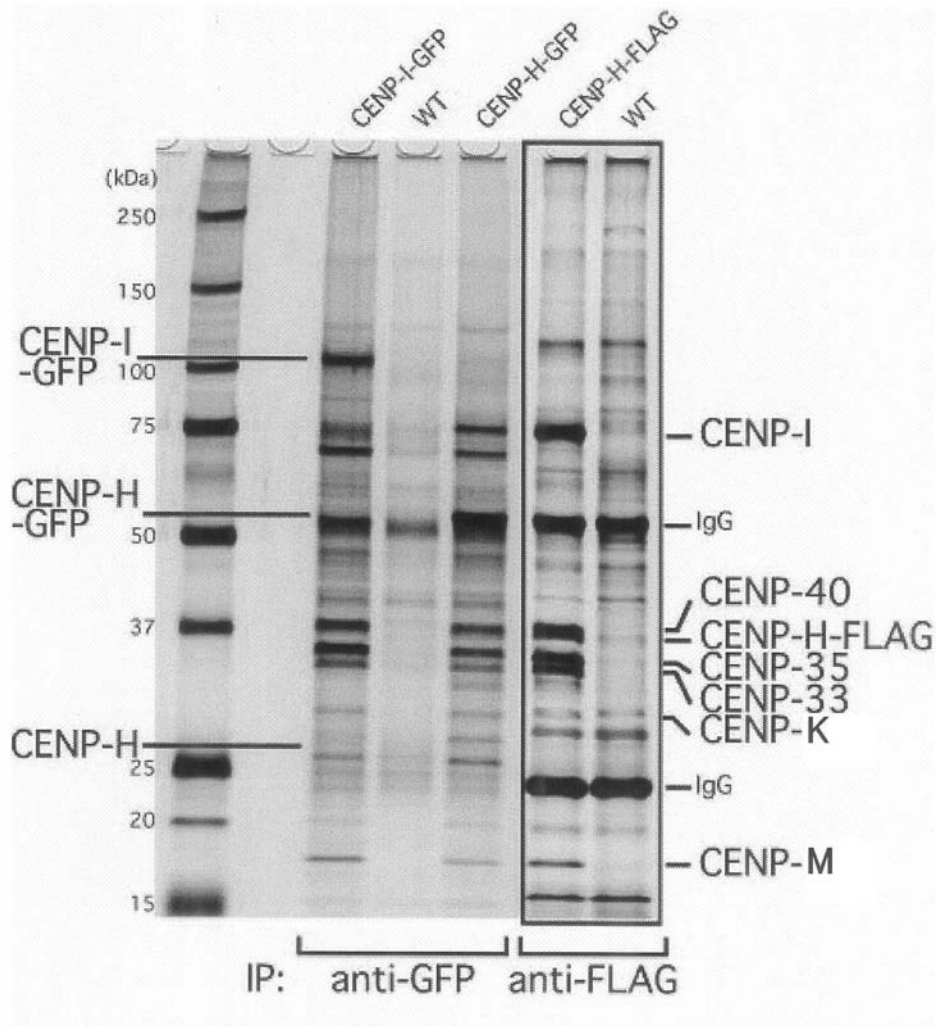
【図11】DT-40細胞のCENP-M遺伝子ノックアウトコンストラクトを示す図である。

【図12】ノックアウト細胞選択のためのハイブリダイズ結果を示す図である。

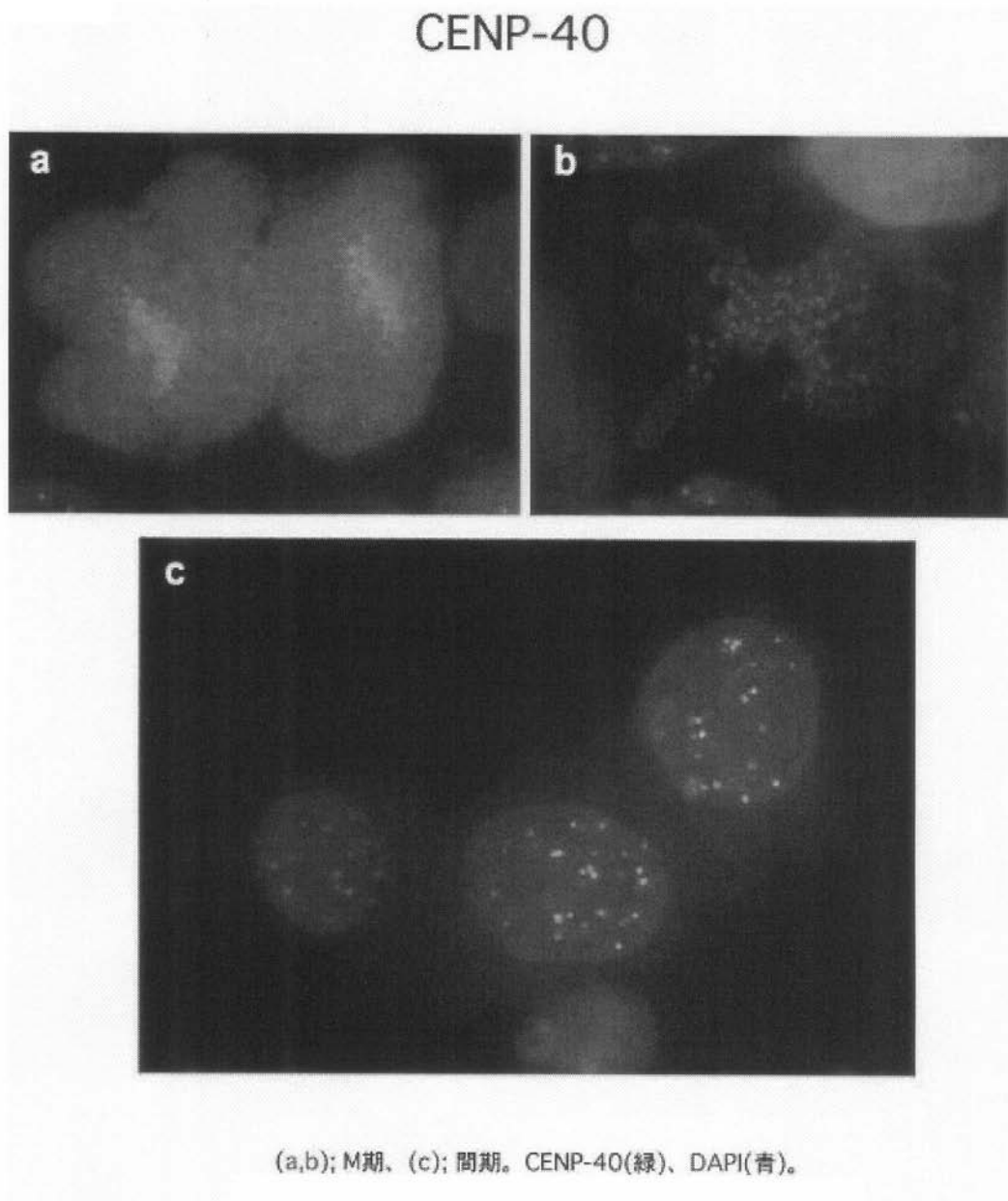
【図13】ノックアウト細胞がCENP-Mを産生していないことを示す図である。

【図14】テトラサイクリン(Tet)存在下(+Tet)及び非存在下(-Tet)におけるCENP-Mノックアウト細胞の増殖速度を示す図である。

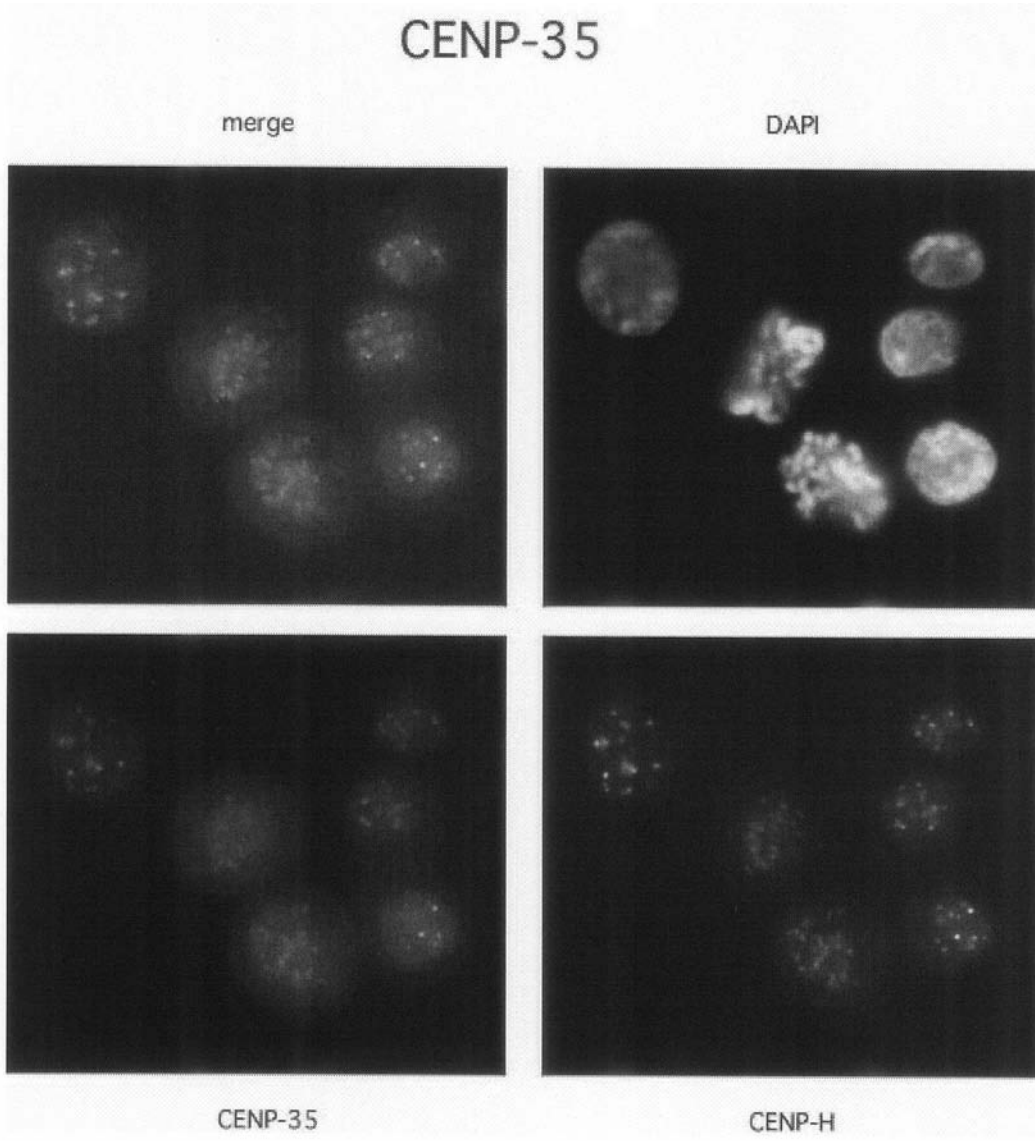
【 図 1 】



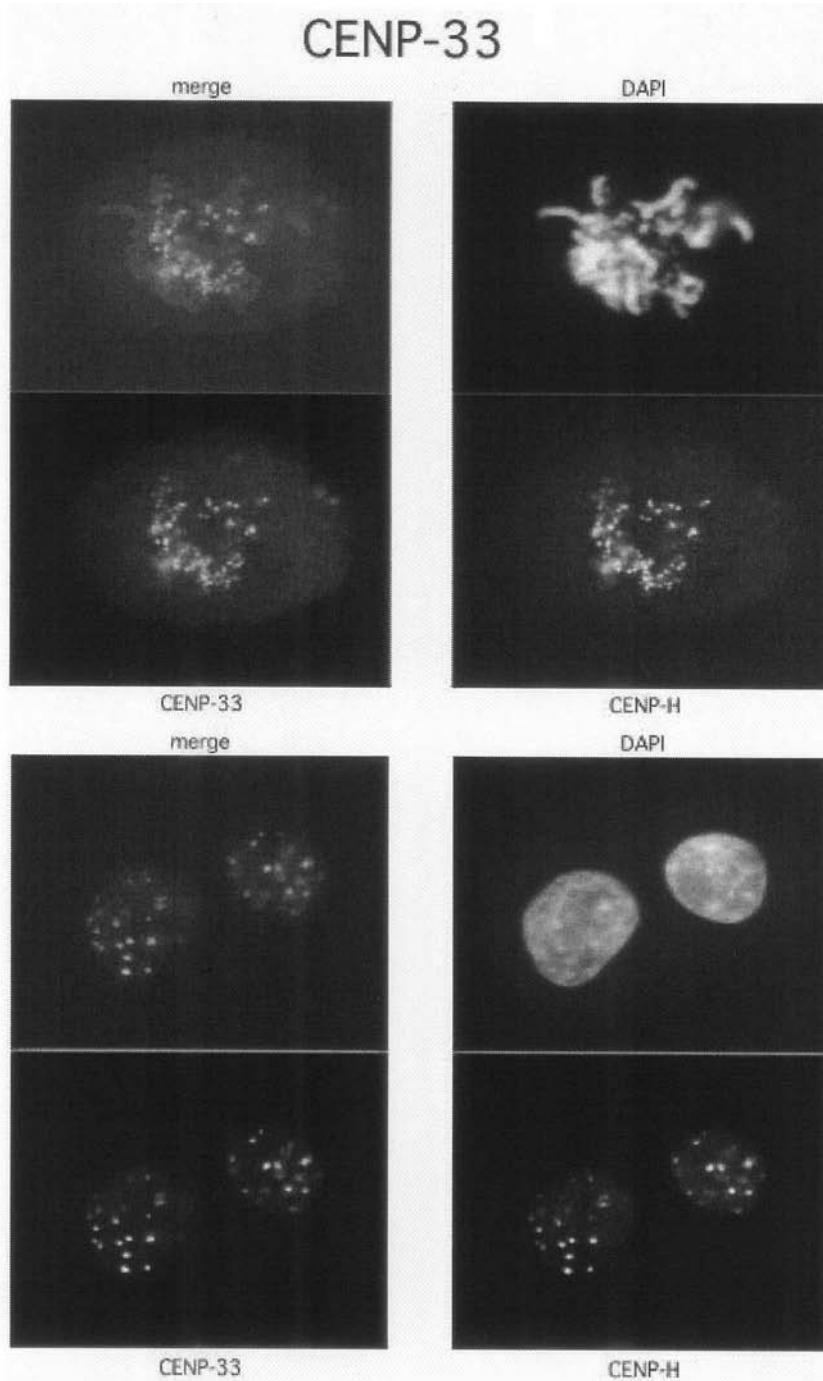
【 図 2 】



【 図 3 】



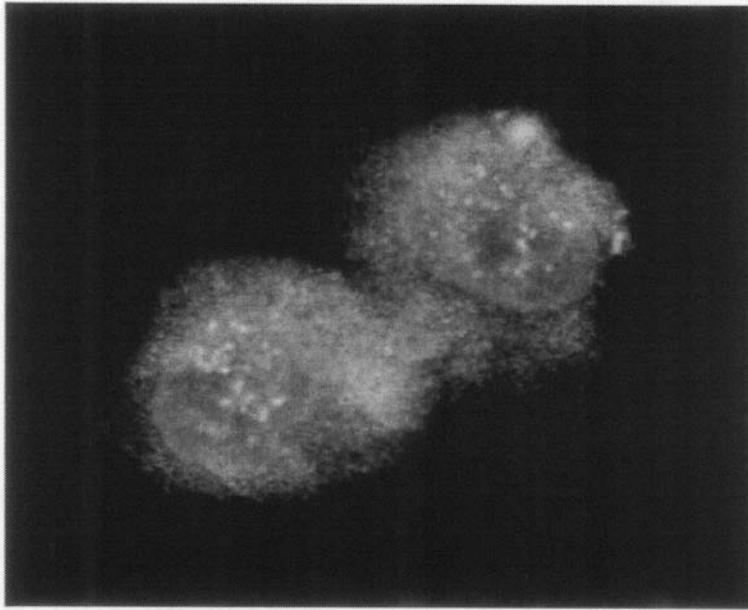
【 図 4 】



CENP-33(赤)、CENP-H(緑)、DAPI(青)。

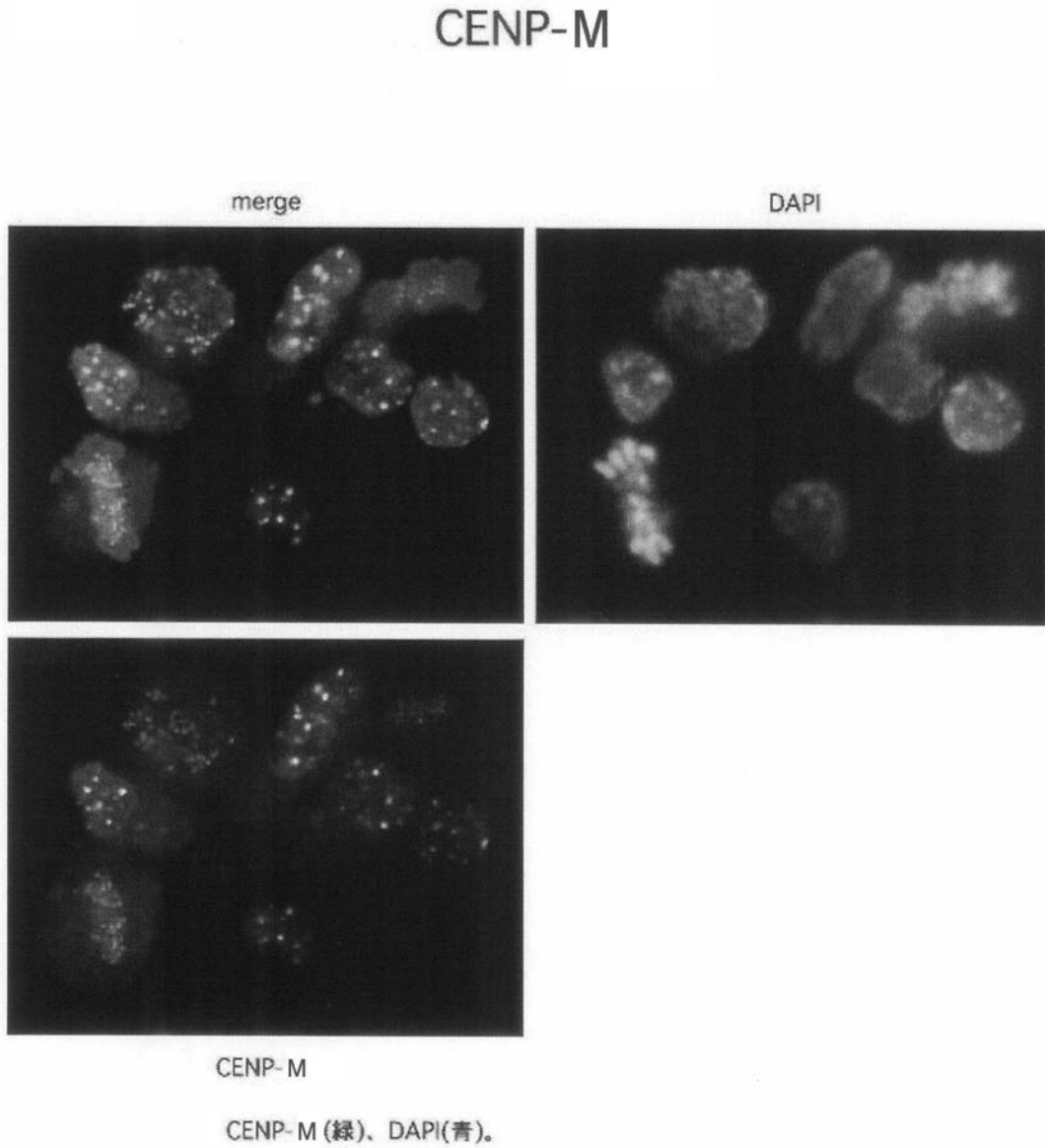
【 図 5 】

CENP-K

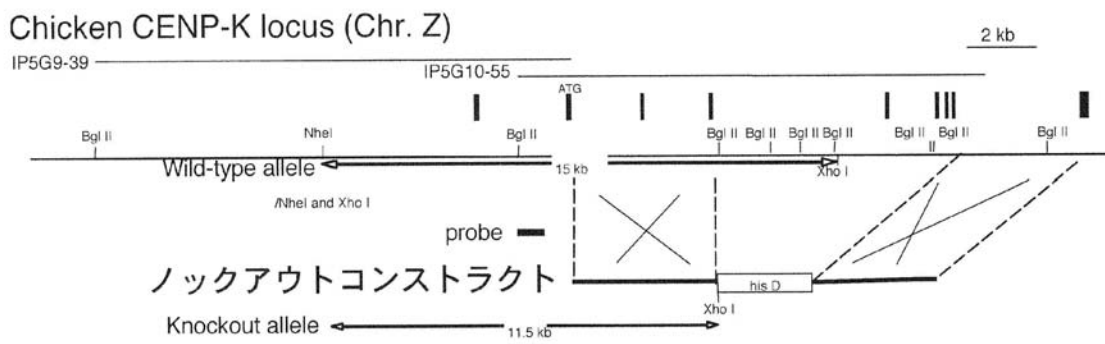


CENP-K (緑)、DAPI(青)。

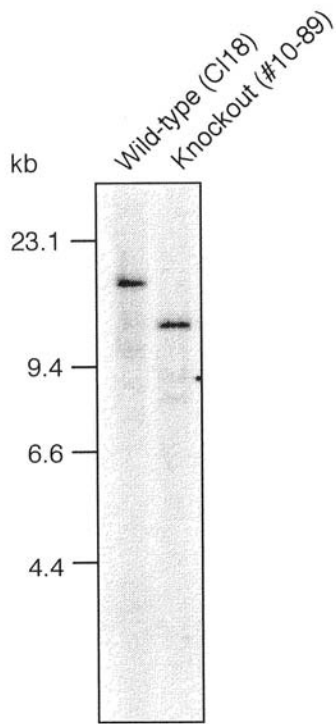
【 図 6 】



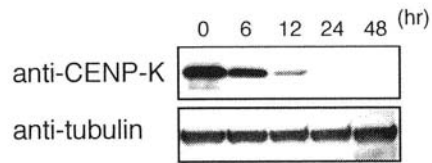
【 図 7 】



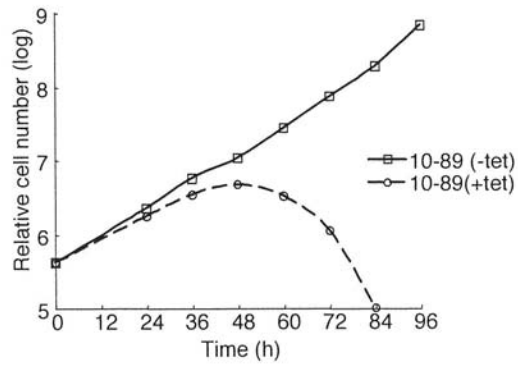
【 8 】



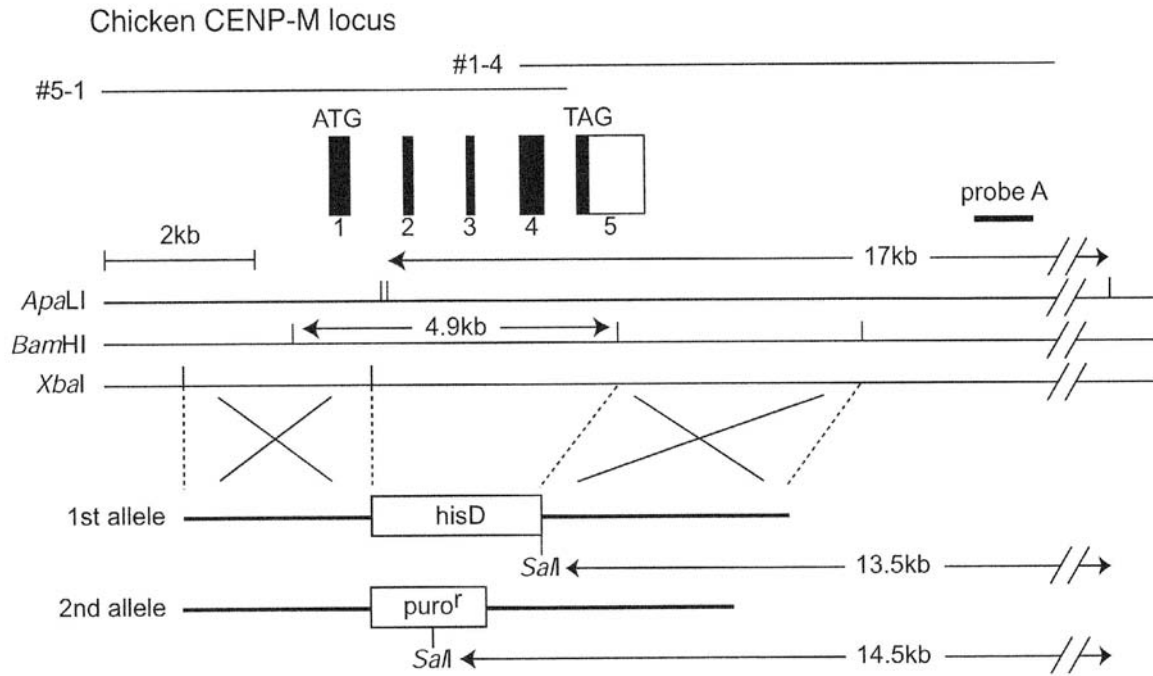
【 9 】



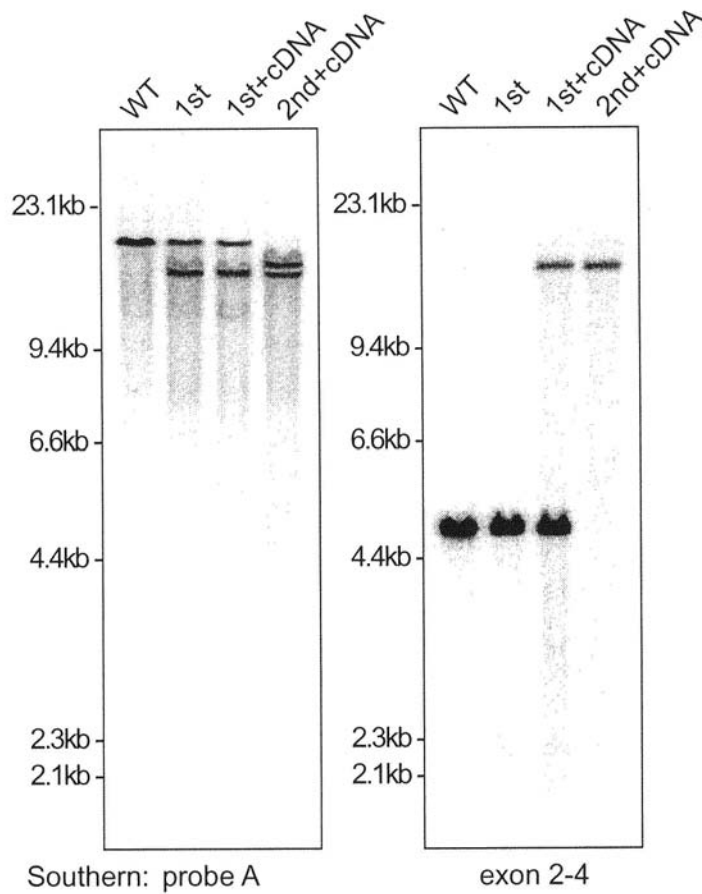
【 10 】



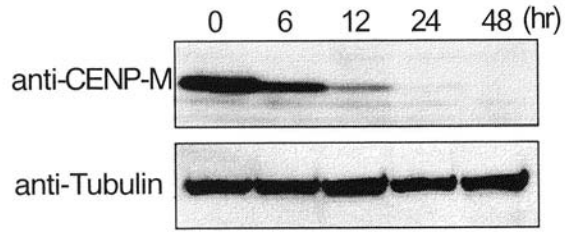
【 図 1 1 】



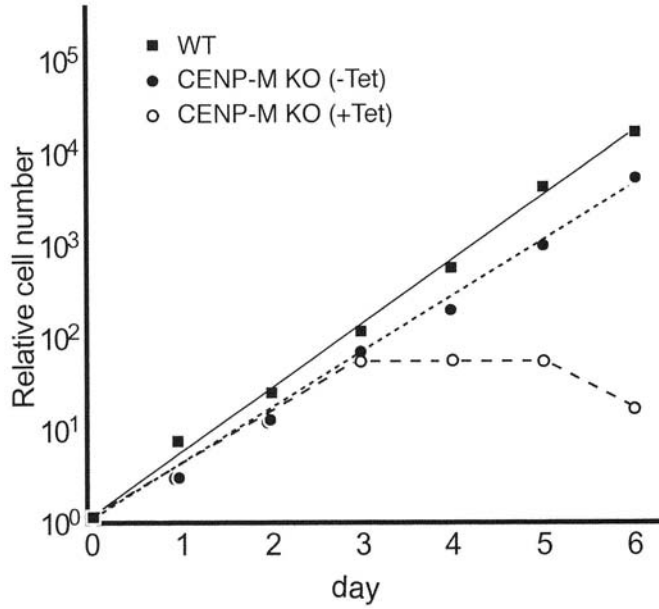
【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 配列表 】

[0004787960000001.app](#)

フロントページの続き

- (74)代理人 100111028
弁理士 山本 博人
- (74)代理人 100101317
弁理士 的場 ひろみ
- (74)代理人 100121153
弁理士 守屋 嘉高
- (74)代理人 100134935
弁理士 大野 詩木
- (74)代理人 100130683
弁理士 松田 政広
- (74)代理人 100140497
弁理士 野中 信宏
- (72)発明者 深川 竜郎
静岡県三島市加茂14-11
- (72)発明者 堀 哲也
静岡県三島市谷田380-9 サニーハイツC-101
- (72)発明者 岡田 聖裕
静岡県三島市谷田150 遺伝研城の内宿舎6

審査官 太田 雄三

- (56)参考文献 第28回日本分子生物学会年会講演要旨集, 2005年11月25日, p. 99, 236, 240
Nature Cell Biology, 2006年 5月, Vol. 8, No. 5, pp. 446-457

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 5/10
C12N 15/09
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq
PubMed
Cinii