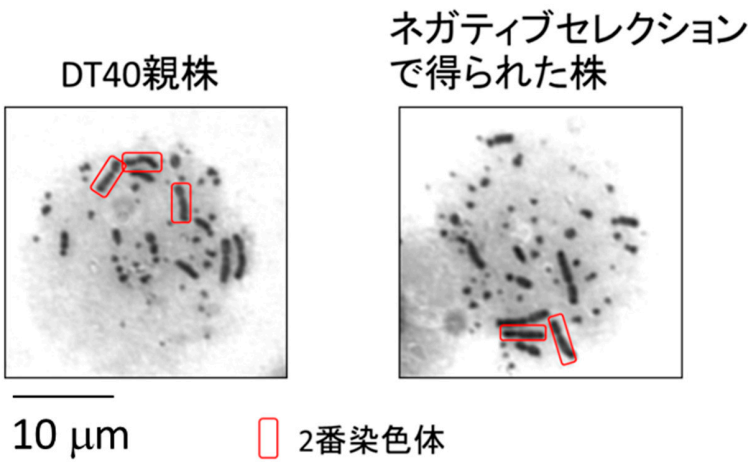
112　染色体の異数化を測定する実験系の確立とその応用	阿部　拓也

【目的】通常ヒトの二倍体細胞は、22 対の常染色体と 1 対の性染色体、計 46 本の染色体を持っており、染色体数が増減しないように制御されている。この恒常性の破綻、つまり染色体の異数化はダウン症（21 番染色体トリソミー）やエドワーズ症候群（18 番染色体トリソミー）で見られるようにヒトの遺伝病の原因となる他、多くの癌細胞で染色体の異数化が観察される。このため細胞がどのように染色体数の恒常性を保っているのかを明らかにすることは、ヒトの病気の原因解明や新たな治療法の開発につながる可能性がある。現在、染色体の異数化を定量的に評価する良い実験系が存在しないことから、本研究では染色体の異数化を検出する新たな系の構築とその応用を目指した。

【方法】ニワトリ B リンパ球、DT40 細胞は核型が比較的安定な細胞株であるが、2 番染色体がトリソミーになっている。本研究ではこの 2 番染色体のうちの一つに HSV-TK 遺伝子や Ecogpt 遺伝子などのネガティブセレクションマーカーをノックインした細胞を作製した。これらの細胞において薬剤セレクションを行い、得られたクローンの染色体を解析した。またダイソミーである 22 番染色体に Ecogpt をノックイン後、薬剤セレクションを行い、モノソミーとなった細胞が得られるかどうか検討した。

【結果】薬剤セレクションの結果得られたクローンでは HSV-TK と Ecogpt どちらを用いた場合でも 90%以上の確率で 2 番染色体を失っていた。これはネガティブセレクションマーカーに機能不全となる変異が入るよりも遥かに高い確率で 2 番染色体を失ったことを意味している。この結果から、本実験系を用いることで染色体の異数化を引き起こす薬剤や遺伝子変異のスクリーニングなどが可能であると考えられる。また同様の実験を通常のダイソミーである 22 番染色体で行ったところ、22 番染色体がモノソミーとなった細胞を得た。このため、本実験系は染色体の異数化を測定するだけでなく、人工的に染色体の数を変化させるための手法として広く活用できると考えられる。

ネガティブセレクションの前後における染色体数の変化



112. 染色体の異数化を測定する実験系の確立とその応用

阿部　拓也

首都大学東京 大学院理工学研究科 分子物質化学専攻 生物化学教室

Key words：染色体の異数化，DT40 細胞，ネガティブセレクション，薬物スクリーニング

緒　言

通常ヒトの 2 倍体細胞は、22 対の常染色体と 1 対の性染色体、計 46 本の染色体を持っており、染色体数が増減しないように制御されている。この恒常性の破綻、つまり染色体の異数化はダウン症（21 番染色体トリソミー）やエドワーズ症候群（18 番染色体トリソミー）で見られるようにヒトの遺伝病の原因となる他、多くの癌細胞で染色体の異数化が観察される。このため細胞がどのように染色体数の恒常性を保っているのかを明らかにすることは、ヒトの病気の原因解明や新たな治療法の開発につながる可能性がある。

しかしながら、現在細胞内でどのような因子が細胞の異数化を抑制しているのかということは、あまり明らかになっていない。その原因として、細胞の異数化を定量的に測定する方法が限られていることが挙げられる。一般的に分裂直後の小核形成は異数化の結果として起こる現象なので、異数化の指標としてよく用いられるが、小核形成は染色体構造異常の結果としても起こり得るため、小核形成＝異数化とは言えない。現在、直接異数化を検出する方法としては、染色体を観察し染色体の数をカウントするか、マイクロアレイ・定量的 PCR を用いる方法などがある。しかしこれら既存の方法では異数化が起きたことは確認できても、異数化という非常にまれなイベントがどの程度の割合で起きるのかを検出することは困難である。例えば野生型の細胞で細胞分裂 1 回につき、1,000 分の 1 の確率で異数化が起きるとする。ある遺伝子をノックアウトしてその確率が 2 倍、つまり 500 分の 1 になったとしてもその差を検出するためには途方もない数の細胞の染色体を直接観察しなければならない。

このように異数化を検出するための良い実験系が存在しない現状において、本研究ではヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ（HSV-TK）や Ecogpt などのネガティブセレクションマーカーを用いて非常に低い頻度で起こる異数化を定量的に評価できる系の構築を目指した。

方法および結果

1. HSV-TK を用いたネガティブセレクションによる 2 番染色体トリソミーの矯正

遺伝子操作の容易な細胞として広く用いられているニワトリ B リンパ球、DT40 細胞は核型が比較的安定な細胞株であるが、2 番染色体がトリソミーになっている［1］。本研究ではこの 2 番染色体のうちの一つに HSV-TK 遺伝子をノックインした細胞を作製した。HSV-TK はガンシクロビルなどの抗ウイルス剤をリン酸化し、細胞毒性を有する最終産物を生成するため、HSV-TK を持つ細胞はガンシクロビルの投与により死滅する。HSV-TK を発現した DT40 細胞を 1×10^7 個播種し、ガンシクロビル処理をしたところ、ほとんどの細胞が死滅したもののガンシクロビル耐性のコロニーが 300～500 個現れた。ランダムに 48 個のコロニーを選択し、これらの染色体を解析したところ、全てのクローンにおいて 2 番染色体が 3 本から 2 本に減っていた（図 1、2）。この結果から HSV-TK とガンシクロビルを用いた選択により、非常に低い頻度（1 万分の 1 以下）でしか起こらない、2 番染色体を 1 本失った細胞を選別することが出来たと考えられた。

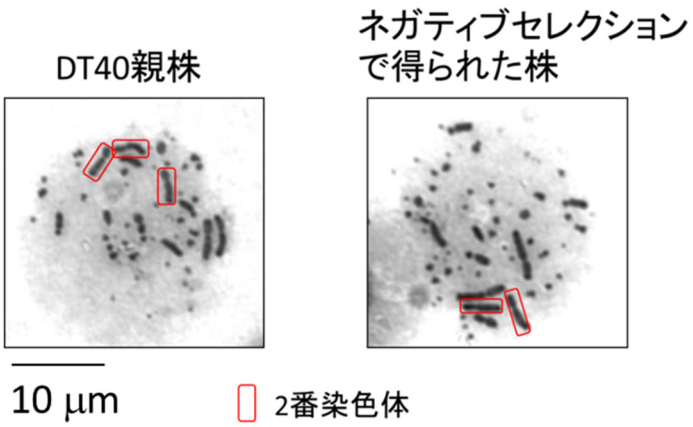


図 1. ギムザ染色像

DT40 の親株（左）と 2 番染色体に HSV-TK をノックインした後に薬剤セレクションをおこなった後に得られた細胞株（右）のギムザ染色像。ニワトリ 2 番染色体（四角で囲まれた染色体）は大きさと形状から簡単に他の染色体と見分けることができる。

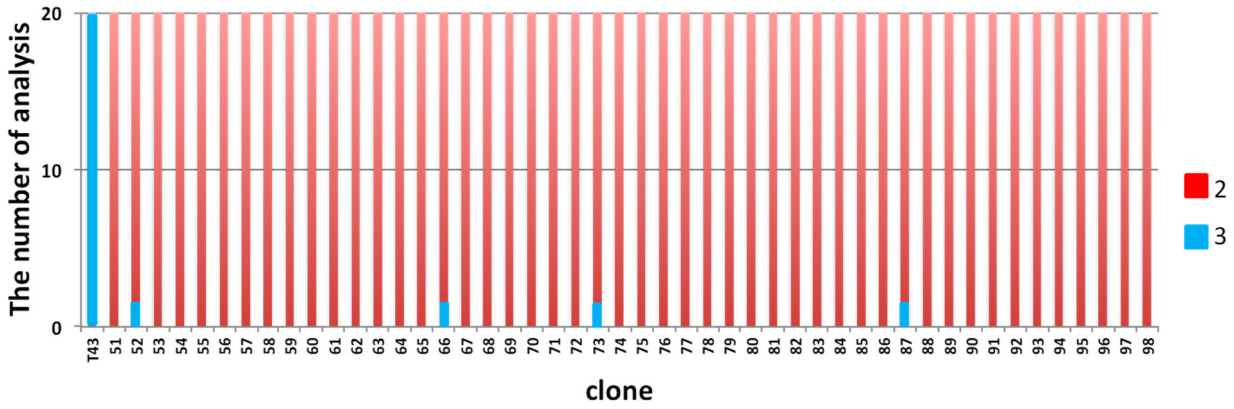


図 2. HSV-TK とガンシクロビルを用いたセレクションによる 2 番染色体の増減

HSV-TK を 2 番染色体の OVA 領域にノックインした細胞（T43）をガンシクロビルで 5 日間処理し、得られたコロニーを 48 個（51～98）ピックアップし、ギムザ染色することで、その 2 番染色体の数を計測した。

2. Ecogpt を用いたネガティブセレクションによる 2 番染色体トリソミーの矯正

HSV-TK とガンシクロビルを用いたセレクションは内因性の TK（チミジンキナーゼ）の影響も受けてしまうことから、薬剤の使用可能な濃度域が非常に狭い。そこで、もう一つのネガティブセレクションのマーカーとして Ecogpt の使用を検討した。Ecogpt はマイコフェノール酸を用いるとポジティブセレクションが、6 チオキサンチン（6-TX）を用いるとネガティブセレクションが可能な優れたマーカーとして知られている。Ecogpt を持つ細胞では 6-TX を培地中に添加すると、細胞内で 6-TX が 6 チオ GMP へと変換され、これが DNA 合成を停止させて細胞が死滅する ［2］。実際に Ecogpt/6-TX を用いたセレクションでは HSV-TK/ガンシクロビルを用いたセレクションよりも高効率に耐性コロニーが得られた。この場合においても耐性コロニーの 90%以上が 2 番染色体を失っていた。以上の結果より、HSV-TK、Ecogpt の 2 番染色体への挿入とそれに続く薬剤セレクションにより 2 番染色体を失った細胞を得ることに成功した。

3. 異数化の定量的な測定

次に本実験系が染色体の異数化の定量に応用できるかどうかを検討した。そのためにコヒーシンに作用し、染色体の恒常性維持に働いている *WAPL* という遺伝子を条件的に on/off できる細胞株（*WAPL*$^{-/AID}$）を用いた［3］。この細胞株にオーキシンという植物ホルモンを加えると WAPL タンパク質が分解される。*WAPL*$^{-/AID}$細胞を 1 週間、オーキシンを含んだ培地と含まない培地でそれぞれ培養し、その後 6-TX でセレクションすることで、WAPL の非存在下で染色体の異数化が亢進するかどうかを確かめた。その結果、オーキシン有・無で薬剤セレクション後に得られるコロニーの数に違いは見られなかった。このことから WAPL の非存在下で 20 回程度細胞分裂が起きてもその間に異数化は顕著に増加しないと考えられた。そのため本実験系の有効性を示すためには微小管重合阻害剤など、より染色体の異数化を強く誘導するような条件が必要であると考えられた。本実験系の有効性が確認されたならば、次に様々な薬剤を用いて、染色体の異数化を促進する薬剤のスクリーニングを行う予定である。

4. 染色体のモノソミー化

次に本実験系の応用として、特定の染色体をモノソミーにする実験を考案した。これまでヒト細胞でもダウン症患者由来の iPS 細胞でトリソミーを矯正してダイソミーにする実験は報告されているが［4］、ダイソミーの染色体をモノソミーにした例は報告がない。この原因としては同一染色体にある遺伝子産物の量が全て半分になってしまうことや、対立遺伝子の片方に機能不全となる変異が入っているとモノソミーにすることで細胞が致死となってしまい作製が困難であることが挙げられる。そこで遺伝子の数の少ない、小さな染色体であればモノソミーとなっても細胞が生存可能ではないかと考えた。ニワトリでは 22 番染色体には遺伝子が 150 個程度しか存在せず、その染色体数の減少が与える影響は少ないと考え、22 番染色体上に Ecogpt 遺伝子を導入した細胞株を作製した。さらに 22 番染色体は非常に小さく 2 番染色体のようにギムザ染色でその本数を判別することが困難であるため、22 番染色体を一本失った細胞を検出するために次のような方法を考案した。22 番染色体上にある ADAM9 の遺伝子座の両方に GFP または mCherry をそれぞれ発現するベクターをノックインする（図 3 上段）。この細胞株で 6-TX を用いた薬剤セレクションを行い、22 番染色体を一本失うと GFP または mCherry も同時に失うため、そのような細胞はフローサイトメーターを用いて容易に分離が出来ると考えた。実際に培地に 6-TX を加え 10 日程度培養し、細胞集団が 6-TX に耐性となったのを確認し、フローサイトメーターで GFP 及び mCherry の発現を確認したところ、細胞集団の 40%弱で GFP を失っていた（図 3 下段）。このことより 22 番染色体がモノソミー化した細胞が得られたと考えられる。この実験はプレリミナリーな結果であり、今後全ゲノムのコピー数を解析し、その検証を行っていく予定である。

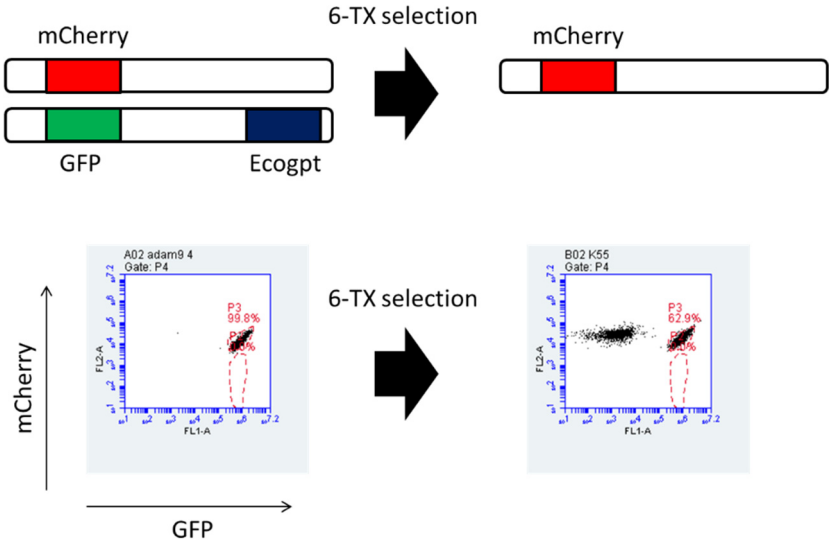


図 3. 染色体部分ハプロイド細胞を作製するための方法とその検出

22番染色体のPCNA遺伝子座にEcogptを挿入した後、22番染色体ADAM9遺伝子座の片方にGFP発現ユニットを、もう片方にmCherry発現ユニットをノックインした細胞株を作製した（上段）。6-TXで選択することで22番染色体のうちの片方を失いGFPの発現がなくなった細胞集団が得られた（下段）。

考　察

本実験系を用いることで染色体の異数化を引き起こす薬剤や遺伝子変異のスクリーニングなどが可能であると考えられる。また本実験系は染色体の異数化を測定するだけでなく、人工的に染色体の数を変化させるための手法として広く活用できると考えられる。

共同研究者・謝辞

本研究の遂行には首都大学東京大学院理工学研究科生物化学教室の廣田耕志教授に多大なご協力を頂いた。ここに感謝の意を表します。

文　献

1） Sonoda E., Sasaki MS., Buerstedde JM., Bezzubova O., Shinohara A., Ogawa H., Takata M., Yamaguchi-Iwai Y. & Takeda S.：Rad51-deficient vertebrate cells accumulate chromosomal breaks prior to cell death. EMBO J., 17:598-608, 1998. DOI:10.1093/emboj/17.2.598.

2） Besnard, C., Monthioux E. & Jami J.：Selection against expression of the Escherichia coli gene gpt in hprt+ mouse teratocarcinoma and hybrid cells. Mol Cell Biol., 7: 4139-4141, 1987. PMID:3323888.

3） Kawasumi R., Abe T., Arakawa H., Garre M., Hirota K. & Branzei D.：ESCO1/2's roles in chromosome structure and interphase chromatin organization. Genes Dev., 31:2136-2150, 2017. DOI: 10.1101/gad.306084.117.

4） Li LB., Chang KH., Wang PR., Hirata RK., Papayannopoulou T. & Russell DW.：Trisomy correction in Down syndrome induced pluripotent stem cells. Cell Stem Cell., 11:615-619, 2012. DOI: 10.1016/j.stem.2012.08.004.