



A method for detecting the expression of a toxic gene in cultured cells

脇田, 和幸

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

1992-02-29

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲1054

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001054>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏名・(本籍)	わき 脇	た 田	かず 和	ゆき 幸	(広島県)
博士の専攻分野の名称	博士(医学)				
学位記番号	博い第777号				
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当				
学位授与の日付	平成4年2月29日				
学位論文題目	A Method for Detecting the Expression of a Toxic Gene in Cultured Cells (哺乳動物細胞内で毒素遺伝子の発現を迅速に検出する方法の開発)				
審査委員	主査 教授 斎藤 洋一 教授 徳久 剛史 教授 尾原 秀史				

論文内容の要旨

緒言

哺乳動物細胞に対する植物やバクテリアの毒素は多数発見されている。そのいくつかの遺伝子は既にクローニングされまた動物細胞内で発現させることも可能となっている。標的細胞のなかに導入された毒素遺伝子が発現されると、その細胞は死滅する。そこで組織特異性を持つプロモーターの支配下に組換えた毒素遺伝子をマウスの受精卵に導入し、トランスジェニックマウスを作製すれば、ある細胞集団の欠失したマウスを作ることが可能となり、発生学や細胞生物学の研究に大変有用である。我々は免疫担当細胞、特に B cell の機能を研究するためにこの方法により B 細胞の欠失したマウスを作ろうと試みた。用いた毒素遺伝子は ricin A鎖で、正常マウスでは B 細胞にしか発現のみられないイムノグロブリン遺伝子のプロモーターとエンハンサーの支配下に組み込んだ。ricinは豆科植物のレクチンで A鎖と B鎖から成っている。A鎖はリボゾーム RNA中のアデニン残基を除去する働きを持つ N-glycosidase であり、ricinの作用したリボゾーム RNAはエロンゲーションファクターが付着せず蛋白合成が中止する。しかし A鎖のみでは、細胞内にいり込むことができず、細胞外では殺傷能力を持たない。この A鎖が標的細胞内に取り込まれるためには B鎖を必要とする。そこで ricin A鎖のみを細胞内で発現させて標的細胞を死滅させる。その結果標的細胞から放出された ricin A鎖は他の細胞の生存には影響しない。そこで ricin A鎖を前述の B cell内のみで発現する遺伝子プロモーターに組み換えてトランスジェニックマウスを作ろうと試みた。通常トランスジェニックマウス法では、作製した遺伝子を受精卵に導入する以前にその遺伝子が細胞内で予定どおり発現しうるかどうかが培養細胞導入法(トランスフェクション法)により確認しておくことが望ましい。しかし組み換え

た遺伝子の働きをトランスフェクション法によって調べようとしても、遺伝子を取り込まれる細胞は全体の数%であり且つricin A鎖が発現された細胞は死滅してしまうため毒素発現の有無を確認できなかった。ここでは、組み換えたricin A鎖遺伝子をマーカー遺伝子と同時に細胞へトランスフェクションすることによって毒素遺伝子の発現を速やかに確認できるシステムを開発したので報告する。

材料と方法

プラスミドの作製

遺伝子組換えは Maniatis らの手技に基づいて行なった。0.7kbpのマウスのイムノグロブリンヘビー鎖のエンハンサー部分と0.3kbpのマウスイムノグロブリンのプロモーター部分をpUC19 プラスミドにサブクローニングした (pIg)。130bpのSV40ポリAシグナルをpUC19プラスミドにサブクローニングした (pPA)。pUC19プラスミドに、0.7kbpのマウスのイムノグロブリンヘビー鎖のエンハンサー部分と0.3kbpのマウスイムノグロブリンのプロモーター部分、1.0kbpのricin A鎖cDNA、0.1kbpあるいは1.6kbpのSV40ポリAシグナルを挿入してpIg/RA (S) およびpIg/RA (L) プラスミドを作製した、さらにヒトの β アクチンのintervening sequence を含む pHApr-3-neo プラスミドにイムノグロブリンヘビー鎖のエンハンサー、プロモーター、ricin A鎖cDNAあるいはバクテリアの β -galactosidase (lacZ), SV40ポリAシグナルを組み込んだpIg/ivs-RA, pIg/Zプラスミドを作製した。またコントロール用としてricin A鎖cDNAを含まないプラスミド (pIg,pIg/ivs) を作製した。

トランスフェクションとlacZの発現

マウス fibroblast cells (L cell) は10%胎児牛血清を含む Dulbecco's modified Eagle's medium で維持した。2x10⁴の L cell にセシウムクロライド法で精製したプラスミドをリン酸カスシウム法でトランスフェクションした。すなわち、1 μ g μ gのpIg/ivs-Zと1~10 μ gのricin A鎖を含むプラスミドを73 μ lの蒸留水に溶解させ1.7 μ lのリン酸緩衝液、83 μ lの1% Hepes 1.6%NaCl液、10 μ lの2 M CaCl₂液と混合し、前夜24穴のプレートにまいておいたL cell上に滴下して、トランスフェクションを行なった。

トランスフェクションの2日後にlacZのトランジェントな発現をBlugal法で調べた。細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗い、2% glutaraldehyde で固定した後、1 mg/ml 5-bromo-3-indolyl- β -D-galactosidase (Blugal), 5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl₂を含む組織化学反応液と37°Cで8時間反応させた。青く染まった細胞の数を顕微鏡下に計測した。

結果と考察

ricin A鎖をイムノグロブリンのプロモーター、エンハンサーの支配下に組換えた。ricin Aは極く僅か(おそらく1分子)細胞内に存在すればその細胞を殺すことができるので、培養細胞に遺伝子導入した場合、トランスフェクタント中のricin A鎖遺伝子の発現をmRNAレベルで検出することは不可能である。そのため我々は組み換え毒素遺伝子の効果を簡便且つ迅速に判定する方法を開発しよ

うとした。

NortonとCoffinは、 β -galactosidase (lacZ) 遺伝子を用い、真核生物内での遺伝子発現を β galとIPTGを用いて高感度に検出する方法を確立した。我々はそれをさらに応用し、毒素遺伝子と同じプロモーター支配下にくみかえたlacZ遺伝子 (pIg/ivs-Z) をレポーター遺伝子として、毒素遺伝子と共にマウスの fibroblast にトランスフェクションした。lacZ遺伝子の発現はトランスフェクションの2日後にblugalを用いて組織化学的に観察した。lacZが発現している細胞は、顕微鏡下に青染細胞として確認できる。lacZ遺伝子を取り込んだ細胞は同時にricin A鎖遺伝子も取り込んでいるはずであるから、毒素遺伝子が有効に作用すれば青染細胞の数はトランスフェクションした毒素遺伝子の量に逆比例して減少するはずである。1 μ gのpIg/ivs-Zと共に4 μ g以上のpIgRA (S) あるいはpIg/RA (L) をトランスフェクションした場合青染細胞数が著明に減少した。コントロールとして毒素を含まない遺伝子をpIg/ivs-Zと共にトランスフェクションした場合、8 μ gでも青染細胞の数は変化しなかった。この結果から組み換えられたricin A鎖遺伝子はマウスの細胞内で発現していることが明らかとなった。Maxwellらはジフテリア毒素A鎖の発現を確認するために、マーカーとして Chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 遺伝子を用いて同様の実験を行なっている。彼らはCAT活性を生物学的アッセイによって測定しているが、我々の方法の方がより簡便且つ速やかに毒素発現を確認できる利点がある。

真核生物の intervening sequence は転写効率を上げる働きがあることが知られている。そこでヒトの β -アクチンの intervening sequence を含んだ組み換え ricin A鎖遺伝子 (pIg/ivs-RA(S)) を作製し同様の実験を行なった。pIg/ivs-RA(S)をpIg/ivs-Zと共にトランスフェクションすると、2日後の青染細胞数はコントロールの約50%に減少した。毒素発現を観察する日を変えると、4日後では青染細胞数はコントロールの1%以下に激減した。このことから毒素遺伝子の発現に要する時間は各組み換え遺伝子によって違い、効果判定には適切な観察時間を決定することが重要であることが明らかとなった。

我々は今回上記方法で活性が明らかとなった組み換え ricin A鎖遺伝子を受精卵に導入してトランスジェニックマウスの作製を試みた。しかし遺伝子の導入には成功したもののマウスには何らB細胞欠如を伴う免疫異常を来さなかった。in vitro の実験において導入に用いた毒素遺伝子が有効であったことを考えると、おそらくマウス個体内でとくに発生の初期にはリンパ球系以外でも毒素発現をきたし、その個体は胎生期に死亡したのであろう。個体発生の過程で毒素遺伝子が不活性化した個体だけが生まれてきたものと考えられる。より厳密な組織特異性を持つプロモーターを使用すれば本法を用いてある細胞集団の除去されたモデル動物を作ることは十分可能と考える。

論文審査の結果の要旨

哺乳動物細胞に対する植物やバクテリアの毒素は多数発見されている。そのいくつかの遺伝子はす

でにクローニングされ、また動物細胞内で発現させることも可能となっている。標的細胞のなかに導入された毒素遺伝子が発現すると、その細胞は死滅する。そこで組織特異性をもつプロモーターの支配下に組み換えた毒素遺伝子をマウスの受精卵に導入し、トランスジェニックマウスを作製すれば、ある細胞集団の欠失したマウスを作ることが可能となり、発生学や細胞生物学の研究に大変有用である。我々は免疫担当細胞、特にB細胞の機能を研究するためにこの方法によりB細胞の欠失したマウスを作ろうと試みた。用いた毒素遺伝子はricin A鎖で、正常マウスではB細胞にしか発現の見られないイムノグロブリン遺伝子のプロモーターとエンハンサーの支配下に組み込んだ。ricinは豆科植物のレクチンでA鎖とB鎖から成っている。A鎖はリボソームRNA中のアデニン残基を除去する働きをもつ N-glycosidase であり、ricinの作用したリボソームRNAはエロンゲーションファクターが付着せず蛋白合成が中止する。しかしA鎖のみでは、細胞内に入り込むことができず、細胞外では殺傷能力を持たない。このA鎖が標的細胞内に取り込まれるためにはB鎖を必要とする。そこでricin A鎖のみを細胞内で発現させて標的細胞を死滅させる。その結果死滅した標的細胞から放出されたricin A鎖は他の細胞の生存には影響しない。そのため、このricin A鎖蛋白をトランスジェニックマウス内で特定の細胞集団にのみ発現させることが可能ならば、その細胞集団を欠失したマウスが作られることになる。

通常トランスジェニックマウス法では、作製した遺伝子を受精卵に導入する以前にその遺伝子が細胞内で予定どおり発現しうかどうかを培養細胞導入法（トランスフェクション法）により確認しておくことが望ましい。しかし組み換えたricin A鎖遺伝子の働きをトランスフェクション法によって調べようとしても、遺伝子を取り込まれる細胞は全体の数%でありかつricin A鎖が発現した細胞は死滅してしまうため毒素発現の有無を確認できなかった。そこでまず始めに組み換えたricin A遺伝子をマーカー遺伝子と同時に細胞へトランスフェクションすることによって毒素遺伝子の発現を速やかに確認できるシステムの開発を試みた。方法は0.7kbpのマウスのイムノグロブリンヘビー鎖のエンハンサー部分と0.3kbpのプロモーター部分の下流に1.0kbpのricin A鎖cDNAやバクテリアの β -galactosidase (Lac Z)を組み込んだプラスミドを作製した。これらのプラスミドをマウス fibroblast cells (L cell) にリン酸カルシウム法でトランスフェクションした。トランスフェクションの2日後にlac Z遺伝子のトランジェントな発現をBlugal法により組織化学的に観察した。lac Zが発現している細胞は、顕微鏡下に青染細胞として確認できる。トランスフェクションする時にricin A鎖遺伝子をlac Z遺伝子の10倍量以上用いることによりlac Z遺伝子を取り込んだ細胞は同時にricin A鎖遺伝子も取り込んでいるはずであるから、毒素遺伝子が有効に作用すれば青染した細胞の数はトランスフェクションした毒素遺伝子の量に逆比例して減少するはずである。その結果、1 μ gのpIg/ivs-Zとともに4 μ g以上のpIgRA (S) あるいはpIg/RA (L) をトランスフェクションした場合青染細胞数が著明に減少した。コントロールとして毒素を含まない遺伝子をpIg/ivs-Zとともにトランスフェクションした場合、8 μ gでも青染細胞の数は変化しなかった。この結果から組み換えられたricin A鎖遺伝子はマウスの細胞内で発現しうることが明らかとなった。Maxwellらはジフテリア毒素A鎖の発現を確認するために、マーカーとして chloramphenicol acetyl transferase (CAT) 遺伝子を用い

て同様の実験を行っている。彼らはCAT活性を生物学的アッセイによって測定しているが、我々の方法の方がより簡便かつ速やかに毒素発現を確認できる利点がある。

我々は今回上記方法で活性が明らかとなった組み換えricin A鎖遺伝子を受精卵に導入してトランスジェニックマウスの作製を試みた。しかし遺伝子の導入には成功したもののマウスには何らB細胞欠如をとまなう免疫異常を来たさなかった。In vitroの実験において導入に用いた毒素遺伝子が有効であったことを考えると、おそらくマウス個体内でとくに発生初期にはリンパ球系以外でも毒素発現をきたし、その個体は胎生期に死亡したのであろう。その結果、個体発生の過程で毒素遺伝子が不活性化した個体だけが生まれてきたものと考えられる。より厳密な組織特異性をもつプロモーターを使用すれば本法を用いてその組み換え遺伝子の有効性を簡便に確認したのち、トランスジェニックマウスを作製するようにすれば、ある細胞集団の除去されたモデル動物を作ることは十分可能と考えられる。

本研究は毒素遺伝子の発現をlac Z遺伝子をリポーター遺伝子として用いることにより簡単に検索できるシステムを開発したものであり、本法を用いていろいろな細胞集団の欠失したモデル動物を作るときにたいへん有用であり、価値ある集積であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。