

## テクニカルノート

## 分子遺伝学的手法を用いた細胞機能の解析

井上幸江, 中井 彰

山口大学医学部応用医工学系・生化学第二講座 宇部市南小串1丁目1-1 (〒755-8505)

Key words : 分子遺伝学, 遺伝子ターゲッティング, 熱ショック応答

## 1. はじめに

2003年4月14日, ヒトゲノム解読に取り組んでいる国際共同研究チームは, 解読作業の完了を宣言した。ヒトゲノムを構成する30億塩基対のうち99%の部分を99.99%の精度で解読したというものである。ゲノム塩基配列の解読はゴールではなく新たな出発点であり, 今後はこのデータを医学や生命科学研究に生かすために, ゲノムの機能解析を進める必要がある。その機能解析の方法としては, ゲノムがコードする蛋白質側から解析を進める方法と, ゲノムそのものに変異を入れることで細胞あるいは個体の機能を調べる分子遺伝学的手法とに大きく分けられる。

筆者らは, これまでに熱ショック応答を制御する熱ショック転写因子群の分子遺伝学的な機能解析を行ってきた<sup>1)</sup>。熱ショック転写因子 (HSF) は遺伝子ファミリーを形成しており, 哺乳類ではHSF1, HSF2, HSF4の3種類, ニワトリではHSF1, HSF2, HSF3の3種類が知られているが, それぞれのHSFの細胞や個体における生理機能についてはまだよく分かっていない。ここでは, 筆者らがどのような細胞を用いてどのような結果を導き出したのか, 最近の研究成果を紹介する<sup>2)</sup>。

## 2. ニワトリBリンパ球DT40細胞

DT40細胞 (図1) は, 高頻度でターゲッティングを起す細胞株である<sup>3)</sup>。ゲノムが安定で細胞の維持が簡単であるために, 比較的容易に目的とする遺伝子の破壊を行ってloss-of-function

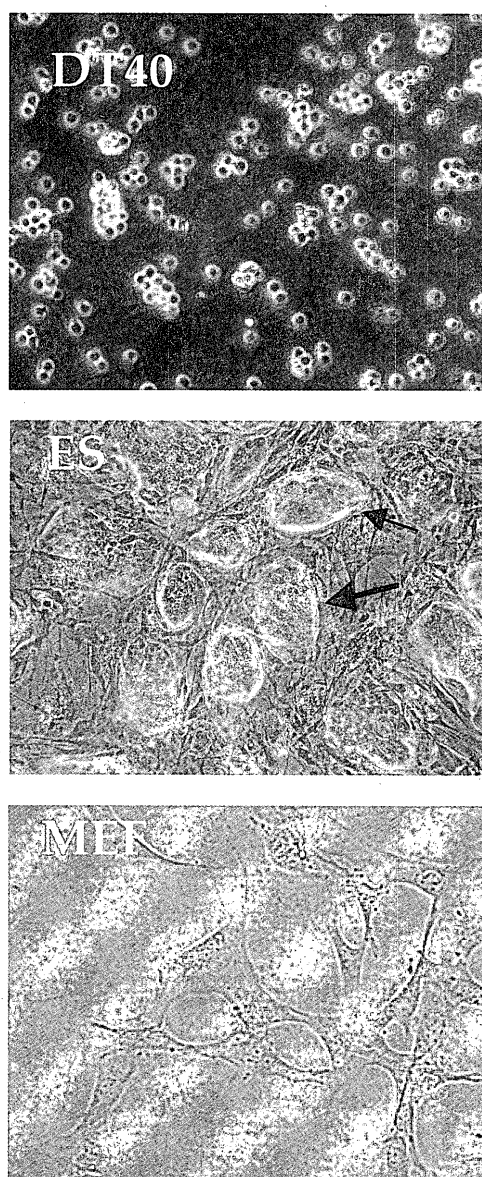


図1. 各細胞の位相差顕微鏡写真  
ES細胞はフィーダー繊維芽細胞の上にコロニー (矢印) を形成している。倍率はすべて同じ。

の表現型を解析できる。筆者らは、DT40細胞を用い、ニワトリcHSF1とcHSF3遺伝子をそれぞれ破壊し、熱ショック遺伝子の誘導(熱ショック応答)と細胞死への影響を調べた<sup>2)</sup>。その結果、cHSF3が熱ショック応答に必須であるが、cHSF1はその応答にほとんど関与していないことを明らかにした。哺乳類ではHSF1が主要な熱ショック応答を制御しており、ニワトリcHSF1はヒトhHSF1とアミノ酸配列で79%もの相同性があるにも関わらずその機能が無いという結果は予想外であった。ニワトリcHSF1は何らかの機能を持つために進化の過程の選択圧のなかでその核酸配列を維持してきたはずである。そこで、cHSF1欠損細胞を温熱、放射線、UVなどのさまざまなストレスに曝したところ、著しく細胞死に至りやすいことがわかった。つまり、cHSF1には、熱ショック遺伝子の誘導とは無関係に細胞死を抑制する機能があることが示唆された。以降はこの仮説を証明するための実験である。

DT40細胞は遺伝子導入による安定発現株の作成も容易である。そこで、哺乳動物のHSF1も同様の機能を持つかどうかを知るためにcHSF1欠損DT40細胞にヒトhHSF1遺伝子を導入し、hHSF1を高発現した安定発現細胞を作成した。この細胞では、cHSF1欠損によるストレス感受性の増加が回復していた。さらに、DNA結合部位の変異hHSF1を高発現した場合には、ストレス感受性は高いままであった。以上の結果から、ストレスによる細胞死を抑制する機能は鳥類とは乳類のHSF1で保存されていることが明らかになった。この機能は、DT40細胞特異的に発現されるものなのか、あるいは哺乳類細胞すべてで発揮されるものなのかが次の問題となる。

### 3. マウス胚性幹細胞 (ES細胞)

ES細胞(図1)は、全能性を持ち、高頻度でターゲットインテグレーションを起こすために遺伝子改変マウス作成に用いられる<sup>3)</sup>。しかし、未分化状態の維持が難しく、ゲノムが不安定であるために細胞レベルの実験にはあまり向かない。それでも、熱ショック応答など細胞の基本的な現象の解析は可能である。筆者らも、両方のHSF1アレルを破壊したHSF1欠損ES細胞を作成して(この細胞では熱シ

ック応答がおこらなくなっている)、その細胞にヒトhHSF1あるいはニワトリcHSF1を高発現した細胞株を作成した<sup>2)</sup>。その結果、ヒトhHSF1を導入した細胞株では熱ショック遺伝子の誘導が回復したが、ニワトリcHSF1導入細胞株では回復できなかった。このことから、ニワトリcHSF1には熱ショック遺伝子を活性化する転写活性化能がないのはニワトリ細胞に限らないことを示すことができた。

### 4. マウス胎児繊維芽細胞 (MEF)

HSF1+/-ES細胞を8細胞期の卵に注入してキメラマウスを作成し、さらにそのES細胞が生殖細胞へ分化したマウス系統を用いてHSF1欠損マウスを作成した。それらの胎生15日目のマウス胎児から繊維芽細胞の初代培養を行った<sup>4)</sup>。HSF1欠損MEF細胞は41~42度のわずかに高い温度に維持すると数時間の後に培養シャーレから離脱することがわかった<sup>2)</sup>。この細胞に、ニワトリcHSF1を発現するアデノウイルスを感染させたところ、熱ショック応答の回復は全くないにも関わらず、細胞の離脱は抑えられ、野生型MEF細胞と同じ程度に41~42度の温度に抵抗できるようになった。このことから、マウスMEF細胞においてもニワトリcHSF1はストレスによる細胞死を抑制する機能があることが証明できた。しかもこの新しいHSF1の機能は、熱ショック蛋白質の誘導とは全く関係ない。哺乳類のHSF1にも、ストレスによる細胞死の抑制機能があるが、これまでその機能は熱ショック遺伝子の活性化によるものと考えられていた。以上の結果は、この細胞死抑制機能を担うHSF1の新しいターゲット遺伝子を同定するという今後の研究の方向性を与えてくれた。

### 5. まとめ

これまでに、ヒトゲノムをはじめ様々な生物のゲノムが解析され、生物の発生や進化についての新しい知見が報告されている。しかし、それぞれの遺伝子の生理機能については、まだまだ未知のことが多い。図2は、熱ショック転写因子ファミリーの系統樹である<sup>2)</sup>。この図をながめると、それぞれの生物種が、さまざまな環境変化に適応して進化してきた様子的一端が見えてくる。

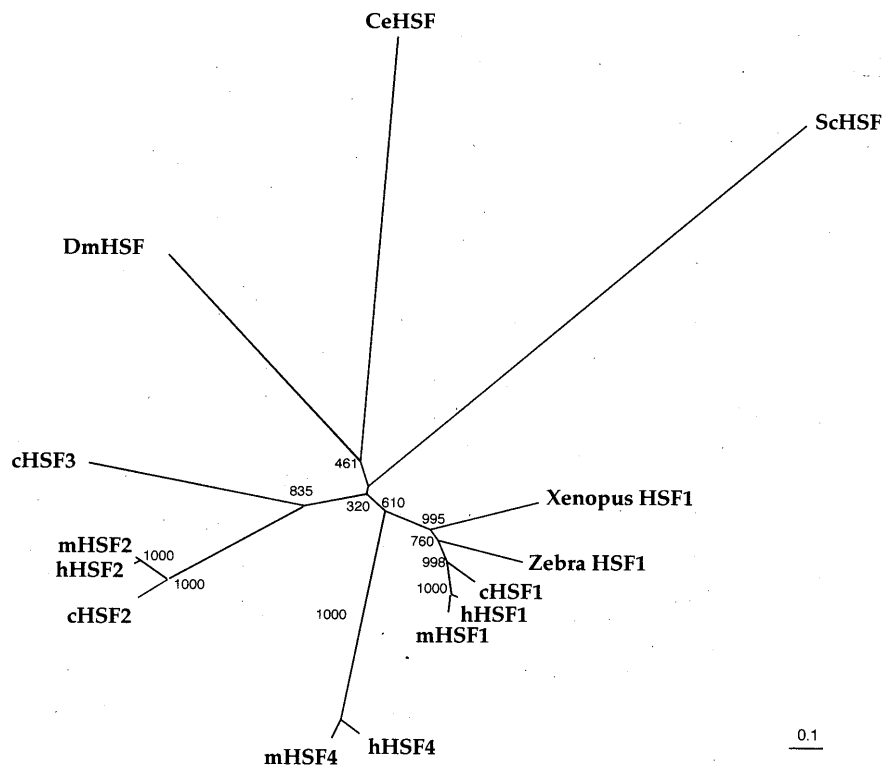


図2. 熱ショック転写因子 (HSF) ファミリーの系統樹<sup>2)</sup>

ニワトリcHSF1はヒトhHSF1とアミノ酸配列がよく似ているが、熱ショック蛋白質の誘導には関与しない。ニワトリではcHSF3が熱ショック応答を制御している。

以上、筆者らは、ニワトリとヒトの熱ショック転写因子群を比較しながらそれらの細胞での機能解析を行ってきた。それぞれの種での研究手法のメリットを最大限に利用することで新たな発見につながっている。今後も、マウス個体の解析も含め、分子遺伝学的手法を用いた解析を基盤として研究を行っていきたいと考えている。

## 文 献

- 1) 中井 彰. 熱ショックと遺伝子発現制御, 遺伝子の構造と機能, バイオサイエンスの新世紀. 日本生化学会編集, 共立出版, 東京, 2001, 149-160.
- 2) Inouye S, Katsuki K, Izu H, Fujimoto M, Sugahara K, Yamada S, Shinkai Y, Oka Y, Katoh Y, Nakai A. Activation of heat shock genes is not necessary for protection by heat shock transcription factor 1 against cell death due to a single exposure to high temperatures. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 5882-5895.
- 3) 武田俊一. 高頻度でターゲットインテグレーションを起こすニワトリBリンパ細胞株DT40の解析. *生化学* 1998; **70**: 119-122.
- 4) 相沢慎一. ジーンターゲットイング, ES細胞を用いた変異マウスの作成, バイオニュアルシリーズ8, 羊土社, 1995.