

ヒト人工染色体を利用した機能性成分評価細胞の樹立

Development of Recombinant Cells for a Food Evaluation System Using Human Artificial Chromosome Vector..

高橋祐介・有福一郎・梅林志浩・野口 誠

Yusuke Takahashi, Ichiro Arifuku, Yukihiro Umebayashi, and Makoto Noguchi

外部からの刺激により蛍光強度を増減させ、食品の評価に応用できる遺伝子組換え細胞を、ヒト人工染色体ベクターを利用して作製した。この細胞はビタミン D₃ に対して応答性を持つチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO 細胞と、同じくビタミン D₃ に応答して遺伝子の発現が増強することが知られているオステオカルシン遺伝子を用いた。オステオカルシン遺伝子のプロモーター部位を EGFP 遺伝子の上流に連結したレポーター遺伝子を作製し、レポーター遺伝子を人工染色体に挿入することにより組換え細胞を樹立した。作製した細胞はビタミン D₃ に応答して蛍光強度を増加させること、導入したレポーター遺伝子のコピー数増加により、より感度良く EGFP の増加が検出できることを示した。

Using the human artificial chromosome vector, we developed recombinant cells that have responsibility to food components and alter EGFP fluorescence. These cells were delivered from a Chinese hamster ovary CHO cell, and the human osteocalcin gene promoter region, both the CHO cell and osteocalcin gene can be induced by vitaminD3. The osteocalcin promoter region was placed upstream of the EGFP gene, and the osteocalcin-EGFP reporter gene integrated a human artificial chromosome vector using the Cre-loxP system. Established cells showed strong response to vitaminD3 and we confirmed that these recombinant cells have responsibility to vitaminD3 and that the EGFP fluorescence paralleled the copy number of the integrated reporter gene.

1. はじめに

機能性食品の開発のために食品成分の持つ生理活性について簡便に評価ができるシステムが求められている。培養細胞を用いた機能性評価手法として、レポーター遺伝子を培養細胞に導入して安定した形質転換体を得る方法があるが、この方法は宿主細胞のもつ遺伝子との相互作用が問題となり、正確な測定ができない可能性がある。しかし、ヒト染色体ベクターを用いた形質転換体¹⁾では宿主染色体とは独立して存在する染色体ベクターにレポーター遺伝子を導入するために宿主細胞との相互作用がなく、正確な情報を得ることができる。このため、安定した

バックグラウンドと正確な応答性を兼ねた新しい機能性評価用細胞を作製することが可能である。

この研究ではヒト人工染色体 (Human Artificial Chromosome: HAC) を利用して機能性食品素材を簡便に評価できる細胞を作製し、食品成分の機能性、安全性についての知見を得ることを目的とする。得られた知見を基に新しい機能性素材、機能性食品の開発を行う。本事業を基にして機能性の評価、機能性メカニズムの解明、安全性の確認を行うことで製品化を視野に入れた食品素材の開発、選別を行うことができる。

骨組織は人体の支持、カルシウム貯蔵といった役

割をもつ重要な組織であり、Ⅰ型コラーゲンを主とする骨基質蛋白質（有機骨基質）にミネラル（無機骨基質）が結合した構造を持つ。骨組織は骨基質蛋白質を産生し、骨の成長を促進する「骨芽細胞」と骨基質を分解、吸収する「破骨細胞」の働きにより吸収と再生を繰り返している²⁻⁷⁾。骨粗鬆症は加齢、ホルモンバランスの変化等により骨吸収作用が亢進するために引き起こされる骨基質（骨密度）減少を特徴とする疾患である。

これまでに我々は、骨粗鬆症の予防に効果的な成分の探索を行うための機能性評価細胞を作製することを目的として、骨由来細胞の骨マーカー蛋白質の発現状況を調べた。その結果、MG63 細胞（骨肉腫細胞由来）で骨分化の後期マーカーであるオステオカルシン（OC）遺伝子が発現し、ビタミン D₃ による OC 遺伝子の誘導刺激に応答して発現が増加することが分かった。OC 遺伝子を骨芽細胞活性化の指標とすることとし、オステオカルシン遺伝子制御領域（OCp）約 550 bp と緑色蛍光タンパク質（EGFP）遺伝子または発光（ルシフェラーゼ）遺伝子を融合したレポーター遺伝子（OCp-EGFP または OCp-Luci）を作製した。MG63 細胞内でレポーター遺伝子の発現と、ビタミン D₃ への応答性を確認し、OCp-EGFP

を MG63 細胞内で HAC に導入したが、作製した遺伝子組換え細胞内の EGFP 発現レベルは低く、遺伝子発現誘導に対する応答も確認できなかったために感度増加が課題となった。

この報告では OCp-EGFP レポーター遺伝子導入細胞の感度向上と OC 遺伝子発現誘導による EGFP 蛍光強度の増加を検出することを目的として多コピー OCpEGFP 遺伝子を導入した細胞を作製し、骨誘導作用が知られている活性化ビタミン D₃ による EGFP 蛍光強度の変化について検討を行ったので、これを報告する。

2. 方法と材料

2.1 材料、試薬、及び機器

実験には以下の材料、試薬、及び機器を使用した。牛胎児血清(JRH Biosciences), ダルベッコ変法イーグル培地（ニッスイ）, FuGene6 (Roche), ジェネティシン(Gibco), PCR Master (Roche), 1,25(OH)₂ ビタミン D₃ (Calbiochem), DMSO（和光純薬）, DNA シーケンサー:CEQ2000XL(Beckmancoulter), フローサイトメーター: CyAn（Dako Japan）。

2.2 OC レポーター遺伝子およびプラスミド

2.2.1 OC レポーター遺伝子

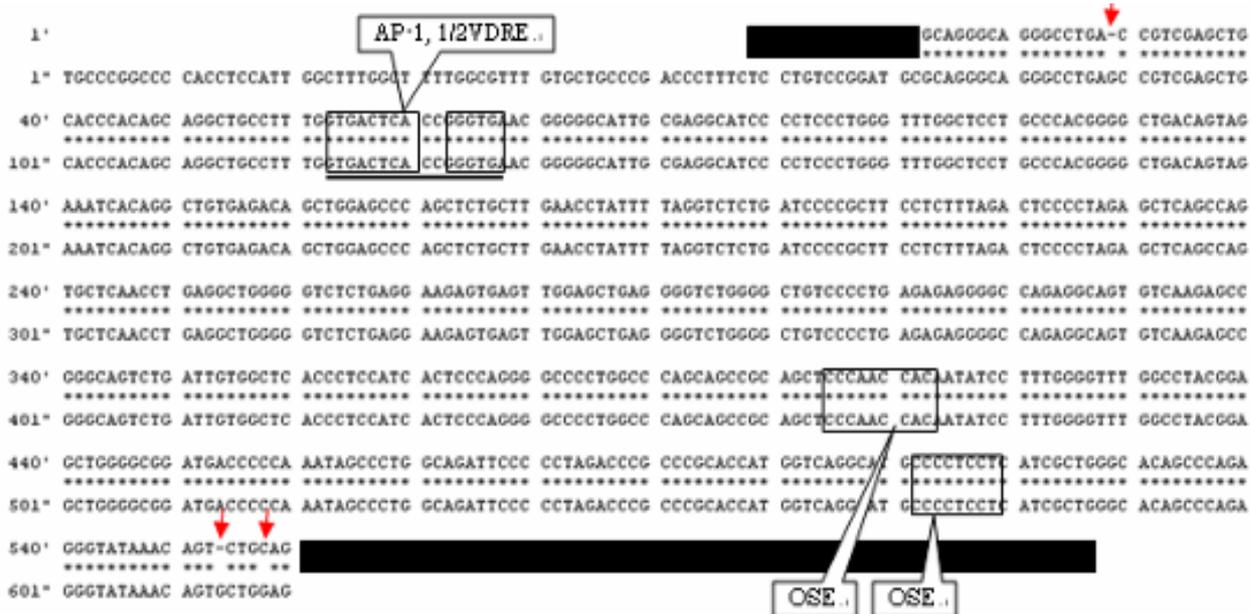


図1 OCプロモーター領域
PCRによりクローニングした領域を示す。上段はPCR産物の塩基配列、下段はOC遺伝子制御領域を示す。矢印部分は塩基の欠失または変異のあった場所を示す。四角は転写因子の結合領域（AP-1、1/2VDRE、OSE）。

OCp550 bp はヒトゲノム DNA を鋳型とし、特異的なプライマーおよび PCR Master を用いた PCR により増幅した。得られた PCR 産物を EGFP 遺伝子上流に挿入し、OCpEGFP レポーター遺伝子とした。増幅した範囲の塩基配列は DNA シーケンサーにより確認した。

2.2.2 プラスミド

pHAC プラスミドは鳥取大学医学部生命科学科、細胞工学研究室より供与されたものを使用した。このプラスミドはサイトメガロウイルスプロモーター (CMVp) により強制発現されるジネティシン耐性遺伝子 (Neo) の 5' 部分 (CMV-5' Neo) と 5' Neo 配列内に loxP 配列、およびレポーター遺伝子挿入部位の上流、下流にニワトリオプアルブミン遺伝子由来インスレーター配列を有する。

作製した OCpEGFP レポーター遺伝子を pHAC プラスミドに挿入し、pHACOCpEGFP を作製した。また、レポーター遺伝子を 1 ~ 3 個連結したプラスミドである pHACOCpEGFP-x1, -x2, -x3 を作製した。

loxP 部位特異的な遺伝子組換えを行うバクテリオファージ由来遺伝子組換え酵素 Cre Recombinase を発現する Cre 発現プラスミドは鳥取大学医学部生命科学科、分子生物学研究室より供与されたものを使用した。

2.3 細胞

ヒト 21 番染色体に由来し、セントロメア、テロメア部分を除く部位を欠失させた 21⁰ΔpqHAC (HAC) を保持するチャイニーズハムスター卵巣由来 CHO 細胞 (CHO-HAC) は鳥取大学医学部生命科学科、細胞工学研究室より供与されたものを使用した。HAC 内にはブラストジシン耐性遺伝子 (Bsd) および Neo 遺伝子の 3' 部分 (3' Neo) と、3' Neo 配列内に loxP 配列を有する。

CHO-HAC および組換え細胞は 10% の牛胎児血清を添加したダルベッコ変法イーグル培地を用いて培養を行った。

2.4 遺伝子導入および組換え細胞の選別

遺伝子導入は FuGene6 を用いて行った。6 well プレート上に培養した細胞に対し、1 μg のレポータープラスミドと 0.1 μg の Cre 発現プラスミドを共導入した。遺伝子導入より 24 時間後に 750 mg/ml のジネティシンを含む培地を用いて選択培養を 1 週間行い、組換え細胞を選別した。薬剤による選別期間中は 3 日おきに薬剤入り培地を交換した。

2.5 遺伝子解析

各クローンより抽出したゲノム DNA 50 ng を鋳型として pHAC プラスミド上の CMVp と、HAC 上の 3' Neo 上に位置し、loxP 組換え部位を挟んだプライマー (Neo-CMV primer) 導入したプラスミド DNA に特異的なプライマー (OC-GFP primer) および PCR Master を用いて PCR を行った。PCR 後にポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、PCR 産物を確認した。

2.6 顕微鏡観察

1 ~ 3 コピーのレポーター遺伝子をもつ CHO 細胞について、ビタミン D₃ 添加時の EGFP 蛍光の変化を蛍光顕微鏡により確認した。50nM ビタミン D₃ 添加培地により 24 時間培養を行ったものをビタミン D₃ 処理群、溶媒として DMSO のみを添加したものを Vehicle 群として蛍光顕微鏡を用いて細胞の画像を取得し、両者の比較を行った。

2.7 フローサイトメトリー (FCM)

各クローンについて 6 well plate にて培養を行い、コンフルエントとなった時点で 10 nM ビタミン D₃

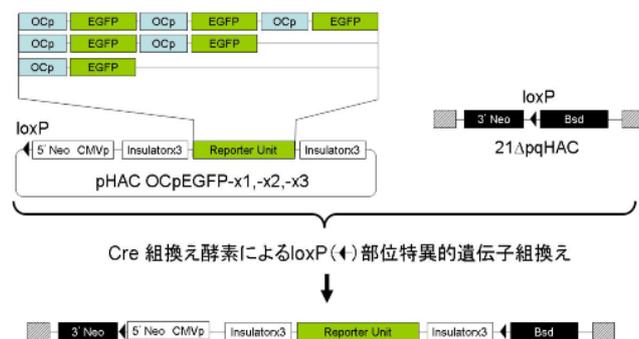


図2 HAC遺伝子組換え

OCpEGFPプラスミド、人工染色体 (21⁰ΔpqHAC) を上段に示す。下段にはCre遺伝子組換え酵素により部位特異的な遺伝子組換えが起こった組換えHACを示す。

OCp: オステオカルシン遺伝子制御領域、EGFP: 緑色蛍光タンパク遺伝子、3' Neo, 5' Neo: 分断されたNeo耐性遺伝子、Bsd: Bsd耐性遺伝子、CMVp: CMVプロモーター、Insulatorx3: インスレーター、loxP: 部位特異的な遺伝子組換え標的配列

または DMSO を添加し、レポーター遺伝子の発現誘導を行った。

処理開始から 24 時間後に細胞をトリプシン処理により単離し、4%パラホルムアルデヒド固定を行った。固定後の細胞をフローサイトメーターにより解析を行った。

10nM ビタミン D₃ 添加培地により 24 時間培養を行ったものをビタミン D₃ 処理群、DMSO のみを添加したものを Vehicle 群として各細胞群の EGFP 蛍光強度を測定し、Vehicle 群に対するビタミン D₃ 処理群の EGFP 蛍光誘導率を算出した。

3. 結果および考察

3.1 レポーター遺伝子、プラスミドの作製

OC 遺伝子の変動を検出するために、OCp 約 550 bp (図 1) を EGFP 遺伝子に挿入したプラスミドを作製した。この領域には AP-1 結合配列 (AP-1)、ビタミン D₃ 応答配列 (1/2VDRE)、OSF 結合配列 (OSE) を持ち³⁻⁵⁾、外部からの刺激による遺伝子発現誘導が可能であると考えられる。また、検出感度向上の

ためにレポーター部分を 2 または 3 つ連結したものを作製した (図 2)。

図 2 上段に示すとおり、レポーター遺伝子部分はインスレーター配列に挟まれており、上流、下流の遺伝子発現制御配列から独立した転写活性を示す。また、Cre 組換え酵素により組み換えられた人工染色体は pHAC レポータープラスミドの CMV-5'Neo 部位とベクター部分の 3'Neo 部位の融合が起こり、機能的な Neo 遺伝子が発現し、ジェネティシン耐性を獲得する (図 2 下段)。これにより適当な濃度のジェネティシンを培地に添加することで目的の遺伝子組換え体を選別することが可能となる。

3.2 遺伝子導入と組換え体の選別

作製した EGFP レポータープラスミド、pHACOCpEGFP-x1, -x2, -x3 を HAC ベクターに挿入するために Cre 発現プラスミドと共に CHO-HAC 細胞に遺伝子導入を行った。遺伝子導入は 6 well プレート上に培養した細胞に対し、1 μg のレポータープラスミドと 0.1 μg の Cre 発現プラスミドを共導入した。遺伝子導入より 24 時間後に 750 mg/ml のジェネティシンを含む培地を用いて選択培養を開始した。

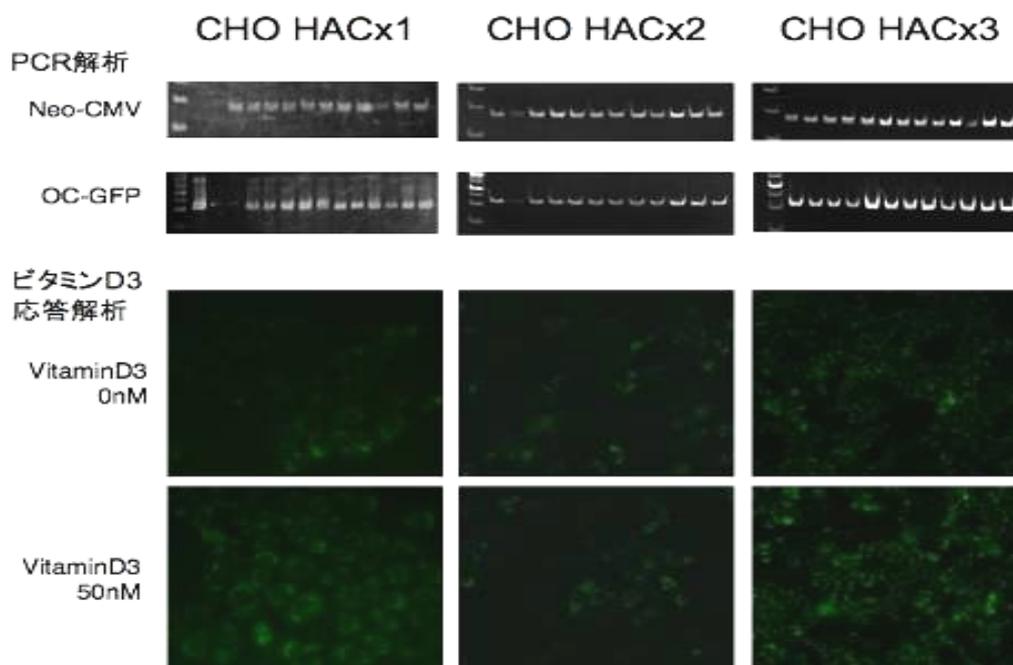


図3 CHO-HAC由来遺伝子組換え細胞

上段 PCR解析 各クローンより抽出したゲノムDNAを鋳型としてloxP組換え部位検出プライマー (Neo-CMV)、レポーター遺伝子検出プライマー (OC-GFP) を用いてPCRを行った。

下段 ビタミンD₃応答解析 遺伝子組換えCHO細胞のビタミンD₃への応答を顕微鏡にて確認した。Vehicle (0nM) と50nMビタミンD₃添加培地により24時間培養後、蛍光顕微鏡を用いて細胞の画像を取得した。

選択培養開始から1週間後に各プラスミドを導入した細胞から12クローンのジェネティシン耐性細胞を得た。

3.3 薬剤耐性細胞の遺伝子解析

Cre 発現プラスミドとの遺伝子導入後に12クローンのジェネティシン耐性細胞を得た。これらの細胞についてPCRによる遺伝子の組換え確認を行ったところ、Neo-CMVプライマーでの増幅(300bp)、OC-GFPプライマーでの増幅(650bp)が見られ、HAC上での遺伝子組み換えがあったことが示された(図3上段)。

また、これらの細胞についてビタミンD₃への応答性を確認したところ、50 nM ビタミン D₃ 存在下でEGFP 蛍光の増加を顕微鏡による観察で確認できた

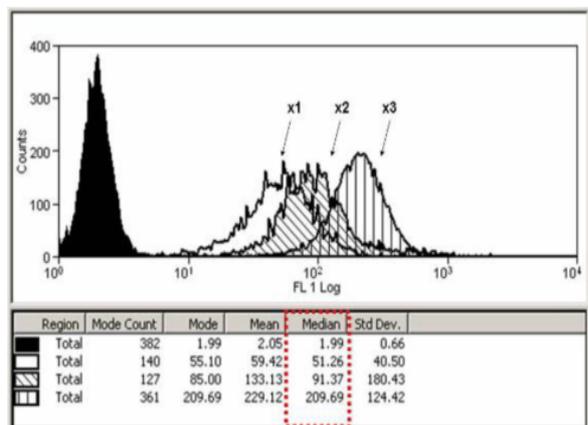


図4 レポーター遺伝子の重複効果
OCpEGFPレポーター遺伝子を1~3コピー搭載した遺伝子組換えCHO-HAC細胞に対しトリプシン処理を行い、ホルムアルデヒド固定後に蛍光強度を測定した。EGFP蛍光強度はフローサイトメーターを用いて測定した。蛍光強度の中央値を点線で示す。

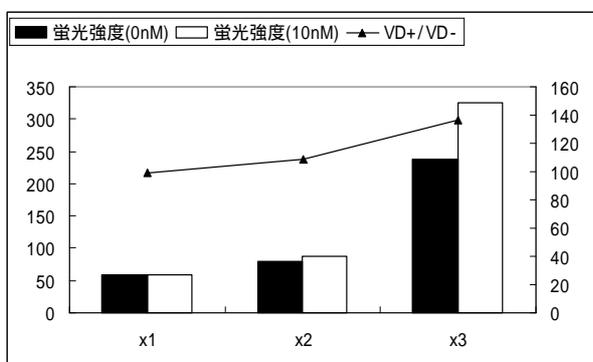


図5 レポーター遺伝子応答の平均値とレポーター誘導率
測定したクローン間の蛍光強度の平均値と、ビタミンD₃による誘導率を求めた。棒グラフはフローサイトメーターによる蛍光強度(左軸)を表し、折れ線グラフは10 nM ビタミンD₃による蛍光強度の誘導率(%)を表す(右軸)。

(図3下段)。

この結果により、HAC上での遺伝子組換えが正常に行われ、ジェネティシン耐性を獲得すると共に、レポーターであるEGFP遺伝子を正常に発現することができる細胞株が分離できたと考えられる。

3.4 遺伝子組換え細胞の緑色蛍光確認

各クローンについて6well plateにて培養を行い、コンフルエントとなった時点でビタミンD₃を添加した。DMSOのみを添加したものをVehicle群として両者の比較を行った。ビタミンD₃またはDMSO添加より24時間後に細胞をトリプシン処理により単離し、4%パラホルムアルデヒド固定を行った。固定後の細胞についてフローサイトメーター解析を行い、各細胞群のEGFP蛍光強度を測定した。

フローサイトメーター解析を行ったところ、CHO細胞にレポーター遺伝子を導入したクローンでEGFP蛍光の検出が可能であること、複数のレポーター遺伝子を搭載した細胞ではレポーター遺伝子のコピー数に応じて蛍光強度が増加する事が確認できた(図4)。蛍光強度の測定値は、1コピー導入細胞に対して2コピー導入細胞が約1.8倍、3コピー導入細胞は約4.1倍であり、導入したレポーター遺伝子のコピー数に応じてEGFP蛍光強度が上昇することが分かった(図4)。

CHO細胞、OC遺伝子は共にビタミンD₃に応答することが知られているが、CHO細胞にOC遺伝子を導入したものであってもビタミンD₃に対し良く応答する(図5)ため、食品中のビタミンD₃、および類似化学物質のもつ生理活性の検出にこの細胞が利用できるものと思われる。

4. おわりに

作製した遺伝子組換え細胞を評価用細胞として利用するために、外部刺激からの応答を示すレポーター細胞を作製する点を検討した。EGFP蛍光強度を感度良く検出するためにレポーター部分を複数搭載したところ、組み換え細胞はレポーターであるEGFP

の蛍光応答の増加を示した。各 12 クローンの細胞を分離し、PCR による遺伝子確認を行ったところ、全てのクローンで遺伝子の組み換えが確認できた。また、蛍光顕微鏡下で EGFP の蛍光強度増加が認められたため、フローサイトメーターによる蛍光強度の確認を行った。その結果、コピー数に応じてビタミン D₃ への刺激が増加する事を確認した。この応答はクローン間で上下はあるものの、ほぼ一定の割合を示した。レポーター遺伝子が完成したため、この組換え人工染色体をもつ骨肉腫細胞の樹立が今後の目標となる。

謝 辞

本研究を行うにあたり、プラスミドの提供、並びに研究をご指導いただきました鳥取大学医学部生命科学科教授佐藤建三氏に感謝いたします。また、HAC 保持細胞並びに HAC 組み換え用プラスミドを提供いただきました鳥取大学大学院遺伝子機能工学分野教授押村光雄氏に感謝いたします。

本研究は平成 18 年度～20 年度、文部科学省都市エリア産学官連携促進事業により実施しました。

文 献

- 1) Katoh, M., et al. Construction of a novel human artificial chromosome vector for gene delivery. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 321, p.280-290(2004).
- 2) Schüle, R., et al. Jun-Fos and receptors for vitamins A and D recognise a common response element in the human osteocalcin gene. *Cell*, 61, p.497-504(1990).
- 3) Carpio, L., et al. Induction of osteoblast differentiation indexes by PTHrP in MG-63 cells involves multiple signaling pathways. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 281, p.489-499(2001).
- 4) Valta, M.P., et al. Reevaluation of osteoblast differentiation: a novel function for fibroblast growth factor 8. *Endocrinology*, 147, p.2171-2182(2006).
- 5) Yu, X.P., and Chandrasekhar, S., Parathyroid hormone

(PTH 1-34) regulation of rat osteocalcin gene transcription, *Endocrinology*, 138, p.3085-3092(1997).

6) Bodine, P.V.N., et al., Estrogen receptor- α is developmentally regulated during osteoblast differentiation and contributes to selective responsiveness. *Endocrinology*, 139, p.2048-2057(1998).

7) Mizuno, M., et al., Type 1 collagen-induced osteoblastic differentiation of bone-marrow cells mediated by collagen- α 2b1 integrin interaction. *J. Cell. Physiol.*, 184, p.207-213(2000).