

E319

IN 欠損レトロウイルスベクターを用いた Cre-loxP によるゲノムへの遺伝子導入

(九大院工・化工) ○ (正) 河邊佳典、(九大院・シス生命) 黄碩豪、(九大院工・化工) (学) 亀山雄二郎、(正) 井藤彰、(九大院工・化工、シス生命)(正) 上平正道*

1. 緒言

レトロウイルスベクターは宿主ゲノムへの高効率な遺伝子導入法として繁用されている。ゲノムへの組込みはウイルス由来のインテグラーゼ (IN) による酵素反応であるが、導入部位はランダムであり、不制御性が問題となっている。本研究では、IN の機能を欠損したレトロウイルスベクター (IDRV) を用いて、レトロウイルス cDNA を細胞へ導入し、Cre-loxP システムによりゲノム上におけるターゲットサイト特異的に遺伝子導入する方法を開発した。

2. 実験方法

IN の触媒コア領域に存在する DDE 領域に対して変異 (D184A) を加えた IN 発現ベクター (pGP-M) を作製した。ウイルスベクター生産用プラスミド (pQMSCV) には、両端を野生型および変異 loxP に挟まれたレポーター遺伝子 (Neo^r(ΔATG)-IRES-EGFP) を組込んだ。このプラスミドと pGP-M および pVSV-G を用いて、293FT 細胞に一過性導入することで IDRV を調製した。宿主ゲノム内に、対応する loxP およびレポーター遺伝子があらかじめ導入された CHO 細胞を作製し、Cre 発現ベクターの一過性発現 24h 後、IDRV を感染させた。薬剤選抜後、ゲノム DNA を抽出し、PCR 法およびサザンブロット法で解析した。

3. 実験結果および考察

CHO 細胞に、レトロウイルスベクターを用いて loxP およびレポーター遺伝子 (Hyg^r-IRES-DsRed) を導入した。レポーター遺伝子の両端を loxP および変異 loxP (loxA) で挟み、かつ Hyg^r 上流に開始コドン (ATG) と loxP をインフレームとなるよう設計した (図 1a)。対応する薬剤および赤色蛍光で選抜後、サザンブロット法で解析したところ、シングルコピーで導入された細胞株 (CHO/F17) を樹立することができた。

IDRV 由来レトロウイルス cDNA は、宿主ゲノムへ組込まれず、LTR 間で環状構造を形成した状態で細胞内にとどまっている (図 1c)。そこで、変異型 IN 発現ベクターを用いて IDRV を調製した。IDRV には、両端を loxP および変異 loxP (loxB) で挟まれ、かつ Neo^r の開始コドンを欠損させるように設計したレポーター遺伝子 (Neo^r-IRES-EGFP) を組込んだ (図 1b)。CHO/F17 細胞に Cre 発現ベ

クターを一過性で導入後、IDRV を感染させた。G418 で選抜したところ、赤色蛍光から緑色蛍光へとシフトした細胞が観察された。得られたクローンからゲノム DNA を抽出し、目的の組込み反応が起こったときにのみ検出されるプライマーを用いて、PCR 解析を行ったところ、配列特異的にゲノム内に導入されていることがわかった。さらに、サザンブロット法で解析した結果、導入遺伝子は、目的の配列部位のみに組込まれていることがわかった (図 2)。これらの結果から、本法は、細胞ゲノムにおいてターゲットサイト特異的な遺伝子導入法として利用できることが明らかとなった。

*FAX: 092-802-2793, phone: 092-802-2743
e-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

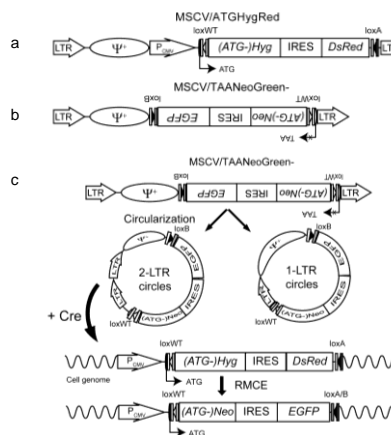


図 1. IDRV を用いた Cre-loxP による遺伝子導入

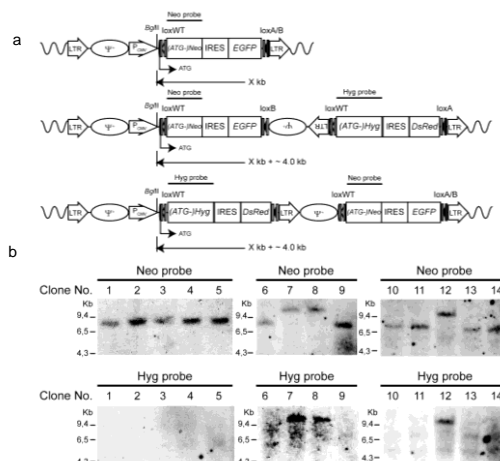


図 2. サザンブロット法による部位特異的遺伝子導入の解析