

総合生命解析システム(2007年導入)による研究成果

久富 寿^{*1}

(Received September 21, 2010)

はじめに

2007年度に配備された総合生命システムでは、生体内における化学物質の相互連携解析を目的として配備された。本システムはハイレゾリューションフローサイトメーター Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter)およびABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)から構成され、これら2つのユニットによりDNA, mRNA, Proteinを解析することで、相乗的なデータが得られ、Omixベースの研究が可能となる。このシステムが研究の必須ツールとなるのは配備以前より想像していた。現実に配備以降の当システムにより、多くの研究成果を論文発表するに至った。それらのうちからいくつかを簡単に紹介したい。

1. 真性赤血球増加症における遺伝子変異の同定

1つめに紹介するのは、Janus kinase 2 (Jak2)遺伝子における一塩基変異(SNP)を網羅的に解析し、真性赤血球増加症(PV)患者における特異的な遺伝子変異を同定したことである¹⁾。研究では、33症例のPV患者の血液からDNAを抽出し、9p23上のJak2遺伝子のexon 12領域に4種類の新たな変異を同定した。これら変異はPV患者にのみ確認された。変異は3種類のSNPおよび1種類の欠失であり、いずれもHot spot上に確認された。PV患者においては、exon 11領域のバリンがフェニルアラニンに変異するV617F変異が最も頻度が高い。しかし、V617F変異がないPV患者も少数ながら存在しており、それら患者において、発見した変異は遺伝子診断として応用可能であろう。また、V617F変異以外に2種類(rs10974944, rs12343867)のSNPがPV患者に特異的であるとの報告があるが、日本人において更に特異性の高いSNPを発見している(未発表データ)。さらに、現在、本態性血小板血症(ET)においても同様の解析を行っている。

2. 薬剤輸送システムとしての可能性

次に、高分子化合物 Poloxamer の Drug Delivery System (DDS) への利用の可能性を論じた^{2,3)}。Poloxamerのうち、Pluronic F68とPluronic F127と呼ばれる2種類のPoloxamerが薬剤投与の際に薬物キャリアーとして利用可能であるかを、*in vitro*の実験系で確認した。実験では、Pluronic F68は慢性骨髄性白血病細胞株K562のみに、Pluronic F127はB細胞白血病細胞株NALM-6のみに、アポトーシスを誘導することが明らかとなった。薬物の投与ではなく、薬物キャリアーのみでアポトーシスが誘導されるため、これら細胞株では薬剤の効果が相乗的に上昇すると予想された。これらPoloxamerが一部の白血病細胞株にのみアポトーシスを誘導する機序は不明であるが、Pluronic F68によるp53依存のアポトーシスは確認している。Poloxamerの薬物キャリアーとしての評価はまだ不十分であるものの、DDS研究において、単体で薬効を持つ薬物キャリアーとして期待される。

3. 酸化ストレス関連遺伝子の変異体の発見

1種類の遺伝子DNAからは、平均で3種類のmRNAが発現されると計算される。我々はこの理論に基づき、酸化ストレスに関連するglutathione synthetase (GSH)およびglutathione reductase (GSR)のalternative splicing variants (ASVs)を発見した^{4,5)}。GSHのASVはexon 4を、GSRのASVはexon 8あるいはexon 9を欠失するものであった。我々は、GSHやGSRのASVの他にもgamma-glutamylcysteine synthetase (GCLC)のASVも発見しており、酸化ストレス関連遺伝子におけるASVの発見が相次いでいる。これらASVsは、皮膚、肝臓、胃などに普遍的に存在し、その発現量は完全長のmRNA量に依存しているように見える。このため、当初はdominant negative inhibitorを翻訳していると考えていたが、それを否定する実験データも出てきている。

^{*1}: 物質生命理工学科 教授 (hisatomi@st.seikei.ac.jp)

これら ASVs が単なる splicing error なのか, dominant negative inhibitor として翻訳されるのか, あるいは機能的なタンパク質を翻訳しているのかは解析中である。

まとめ

本システムで得られた研究データは, 今回紹介したもの以外にもいくつか挙げられる。導入時に新発売の機器であったことから, 機器の不具合に悩まされた時期もあったが, 導入後約 2 年経過した今では問題なく稼働している。導入により, DNA, mRNA, Protein がより一層深く解析可能となっただけでなく, 解析に至るまでの前処理を丁寧に操作することなどで, 研究室の実験手技レベルも向上したことを付け加えておく。

本稿で紹介した研究成果

1. Ohyashiki JH, Hisatomi H, Shimizu S, Sugaya M, Ohyashiki K: Detection of low allele burden of JAK2 exon 12 mutations using TA-cloning in patients with erythrocytosis. Japanese Journal of Clinical Oncology 39, 509-513, 2010.
2. Aoki N, Tamura M, Ohyashiki JH, Sugaya M, Hisatomi H: Poloxamer 188 enhances apoptosis in a human leukemia cell line. Molecular Medicine Reports 3, 669-672, 2010.
3. 田村 倫子, 菅谷 麻希, 久富 寿: Poloxamer 407 のアポトーシス誘導能と DDS としての有用性. 成蹊大学 理工学研究報告 47, 27-31, 2010.
4. Uchida M, Sugaya M, Kanamaru T, Hisatomi H: Alternative RNA splicing in expression of the glutathione synthetase gene in human cells. Molecular Biology Reports 37, 2105-2109, 2010.
5. Satoh N, Watanabe N, Kanda A, Sugaya-Fukasawa M, Hisatomi H: Expression of glutathione reductase splice variants in human tissues. Biochemical Genetics, 48, 816-821, 2010.