

遺伝子修復効率の上昇を目的とした新規 DNA 断片の開発

学位論文内容の要旨

遺伝子疾患の原因となる変異型塩基配列を、直接正常型の塩基配列へと変換する遺伝子修復法は、疾患の「完全治癒」が期待できる理想的な遺伝子治療の一つである。遺伝子修復法の一つである Small-Fragment Homologous Replacement (SFHR) 法では、正常型塩基配列を持つ二本鎖PCR断片 (400-800 bp) を熱変性後、変異遺伝子を持つ細胞へ導入することによって、いくつかの疾患遺伝子を正常型へと遺伝子修復することがこれまで示されてきた。しかしながらその修復効率は1%前後と非常に低く、また塩基配列に誤りの多いPCR断片による新たな変異の導入といった危険性もあり、この方法を臨床的に用いるにはさらなる改良が必要である。そこで本研究では、修復効率の上昇及び安全性の向上を目的として、DNA断片の改良を行い、臨床的に用いることが可能な新しい遺伝子修復法の開発を試みた。

本研究ではコドン34 (TCA: Ser) に終止変異 (TGA: opal) を導入した変異型Ilyg-EGFP遺伝子を標的として、正常型のTCAへと変換する遺伝子修復を行った。この遺伝子修復に用いるDNA断片として、606塩基対の二本鎖PCR断片 (fPCR) 及び二本鎖制限断片 (fRes) に加え、606塩基のセンス及びアンチセンス配列を持つ一本鎖DNA断片 (fSense, fAntiS) を一本鎖環状ファージミドより調製した。fResは大腸菌内において複製されたプラスミドより調製されており、従来のPCR断片であるfPCRに対し、10⁶倍、正確な塩基配列を有しているものと考えられる。ファージもまた大腸菌内の複製系を利用しているため、fSenseやfAntiSの塩基配列においても、fResと同様、非常に高い正確性を有しているものと考えられる。このことは、SFHR法の臨床応用へ向けた安全性の確立のために、非常に重要なことであるといえる。

これまでの二本鎖PCR断片を用いたSFHR法において、細胞内への導入直前に行う二本鎖DNA断片の熱変性が、高い修復効率を得るために必要であることが示されてきた。このことは、熱変性によってできた一本鎖DNA断片がSFHR法において重要であることを示唆している。しかしながら数百塩基対の二本鎖DNAを効率よく完全に一本鎖にすることは非常に困難であり、そこで相補鎖を含まない完全な一本鎖DNA断片である、fSense又はfAntiSを用いることによって、修復効率の向上が期待できるのではないかと考えた。

これら4種類のDNA断片を用いて遺伝子修復を行った結果、fSenseはfRes及びfPCRに対し、それぞれ6倍及び12倍高い遺伝子修復効率を示した。このときfAntiSは、同じ一本鎖DNAでありながら、fSenseの1/9の値しか示さず、標的遺伝子の転写反応が影響しているのではないかと考えられた。しかしながらその後の検討によって、この配列選択性に転写反応は関与していないことを明らかとした。また興味深いことに、fResはfPCRに対し、2倍の有意な修復効率の上昇を示した。この現象にはfResに含まれる大腸菌特異的な塩基修飾が関与していることが示唆され、この効果がfSenseに対しても影響を及ぼしていることを明らかとした。

さらなる検討の結果、このfSenseを用いた遺伝子修復には、DNA断片の鎖長に最適値が存在すること、相補鎖との分子間高次構造、及び一本鎖DNA断片の分子内高次構造が抑制的に作用すること、その遺伝子修復メカニズムに、DNA断片が標的プラスミドへとインテグレートする、相同組換えと思われる反応が関与していること、遺伝子修復のタイムコースは36時間ですでに最大値となり飽和していること、などが明らかとなった。

最後に、これらの結果を基にfSenseに改良を加え、さらなる遺伝子修復効率の上昇について検討を行った。

まずこの遺伝子修復に相同組換えの関与が示唆されたことから、Partial-Duplex (PD) DNA断片を用いることとした。これまでの相同組換えの研究において、哺乳動物細胞内で相同組換え反応の中心的役割を担っているRad51は、このPD-DNA断片を基質としたとき効率よく *in vitro* 相同組換え反応を行うことがこれまで報告されてきた。その結果、PD-DNA断片を用いることによってfSenseに対し最大2倍まで修復効率が上昇し、fSenseの3'末端に部分的二本鎖を持つ3'-PD-DNA断片が最も高い修復効率を示した。さらにこのPD-DNA断片による遺伝子修復効率の上昇効果はDuplex部分の鎖長 (27塩基対以上) に依存した。またDuplexを形成するためのオリゴDNAに対し、DNAのみでは効果が観察できなかった短い鎖長 (20塩基対) であっても、二本鎖の安定性を向上し、さらにA型らせん構造を取りやすいことで知られている 2'-O,4'-C-Ethylene-bridged nucleic acid (ENA) を導入した Partial-Hetero-Duplex (PHD) DNA断片を用いることによって、fSenseに対し2倍以上、修復効率を上昇させることが明らかとなった。またこのとき他の核酸アナログ (2'-O-Me-RNA、BNA) を用いたPHD-DNA断片では効果は観察されなかった。

次に遺伝子修復のタイムコースから明らかとなった結果より、36時間までにfSenseのほとんどが細胞内において分解を受けているのではないかと予想した。そこで細胞内のエキソヌクレアーゼからDNA断片の末端を保護することを目的として、分子内ループ構造を取りfSenseの末端に相補的な配列を持つオリゴDNAをfSenseにアニーリングし、Looped-Duplex (LD) DNA断片を調製した。この結果、LD-DNA断片によっても修復効率は最大2倍まで上昇し、また興味深いことに、PD-DNA断片と同様、3'末端側に部分的二本鎖を持つことによって修復効率は最大の値を示すことが明らかとなった。

本研究では、修復メカニズムに基づいたDNA断片の改変という、より高い修復効率を持つDNA断片の開発方法を提案し、従来法と比較して10~20倍まで修復効率を改善させた点に意義があると考えている。今後、本研究で開発したPD-DNA断片、ENA導入PHD-DNA断片、そしてLD-DNA断片を組み合わせ、最適化していき、最も高い修復効率を有するDNA断片を開発していくことが必要である。さらに相同組換えに焦点を当てた研究を行うことによって、細胞内のどのような分子が関与しているかを明らかにしていくことは、大変重要な意義を伴っている。すなわち、そこで明らかにされた遺伝子修復に関与する分子に適した基質として、新たなDNA断片の検討を行っていくことによって、さらなる修復効率の向上が可能になるものと考えられる。

本研究は、DNA断片の改変によりSFHR法による遺伝子修復法を改善させた最初の報告であり、上記のような検討を通じ、遺伝子修復法を臨床的に応用していくための有用な情報をもたらすものである。

学位論文審査の要旨

| | | |
|----|-----|------|
| 主査 | 助教授 | 紙谷浩之 |
| 副査 | 教授 | 原島秀吉 |
| 副査 | 教授 | 松田彰 |
| 副査 | 助教授 | 南川典昭 |

学位論文題名

遺伝子修復効率の上昇を目的とした新規 DNA 断片の開発

土谷博之君は、遺伝子疾患の原因となる変異型塩基配列を、直接正常型の塩基配列へと変換する遺伝子修復法に関する研究を行った。この遺伝子治療法は、正常型塩基配列を持つ二本鎖 PCR 断片 (400-800 bp) や短鎖一本鎖オリゴヌクレオチドを変異遺伝子を持つ細胞へ導入することによって、変異遺伝子の正常型遺伝子への配列変換を誘導する方法である。前者の PCR 断片を用いる方法、Small-Fragment Homologous Replacement (SFHR) 法においては、400-800 bp の二本鎖 PCR 断片を加熱変性後、細胞に導入していた。土谷君は、DNA 断片の改良によって、修復効率の上昇及び安全性の向上を達成可能との作業仮説を立て、様々な研究を行った。

まず、土谷君は、遺伝子修復に用いる DNA 断片として、二本鎖 PCR 断片 (fPCR、従来の方法) の他に二本鎖制限断片 (fRes)、センス及びアンチセンス配列を有する一本鎖 DNA 断片 (fSense、fAntiS) を一本鎖環状ファージミドより調製した。これら 4 種類の DNA 断片を用いて遺伝子修復を行った結果、fSense は fRes 及び fPCR に対し、それぞれ 6 倍及び 12 倍高い遺伝子修復効率を示した。一方、fAntiS は、同じ一本鎖 DNA でありながら、fSense の 1/9 の値しか示さなかった (標的遺伝子の転写反応が影響しているのではないかと考えられたが、その後の検討によってこの配列選択性に転写反応は関与していないことを明らかとしている)。

土谷君は、さらに検討を加え、この fSense を用いた遺伝子修復には、DNA 断片の鎖長に最適値が存在すること、相補鎖との分子間高次構造、及び一本鎖 DNA 断片の

分子内高次構造が抑制的に作用すること、大腸菌特有の塩基修飾が遺伝子修復効率を促進する方向に作用すること、転写は遺伝子修復効率に影響しないこと、及び、その遺伝子修復メカニズムに、DNA断片が標的プラスミドへとインテグレートする、相同組換えと思われる反応が関与していることを明らかとした。

最後に土谷君は、これらの結果を基に fSense に改良を加え、さらなる遺伝子修復効率の上昇について検討を行った。まずこの遺伝子修復に相同組換えの関与が示唆されたことから、相同組換え反応の中心的役割を担っている Rad51 との親和性を考慮し、fSense の 3'-末端に部分的二本鎖を持つ 3'-PD-DNA 断片を設計し、これが fSense の約 2 倍の遺伝子修復効率能を有することを示した。さらにこの 3'-PD-DNA 断片による遺伝子修復効率の上昇効果は duplex 部分の鎖長に依存することを示した。また duplex を形成するための核酸として、2'-O,4'-C-Ethylene-bridged nucleic acid (ENA) を導入した場合に、修復効率が上昇することを明らかとした。また、細胞内のエキソヌクレアーゼから DNA 断片の末端を保護することを目的として、分子内ループ構造を取り fSense の 3'-末端に相補的な配列を持つオリゴ DNA を fSense にアニーリングし、3'-LD-DNA 断片を調製した。この 3'-LD-DNA 断片によっても修復効率は 2 倍上昇することを明らかとした。

土谷君が新たに設計した DNA 断片は、いずれも大腸菌内において複製された DNA より調製されており、従来の PCR 断片より 10^6 倍、正確な塩基配列を有しているものと考えられる。このことは、SFHR 法の臨床応用へ向けた安全性の確立のために、非常に重要なことであるといえる。

以上、土谷君は、DNA 断片の改変により SFHR 法による遺伝子修復法を改善させることが可能なことを世界で初めて明らかにした。さらにこのような検討を加えることにより、遺伝子修復法を臨床的に応用していくことが可能であると思われる。いずれの審査委員も、博士の学位の授与に十分な研究を行ったものと判断した。