

外来遺伝子の silencing 機構の解析と 持続発現型 DNA 開発への展開

学位論文内容の要旨

[研究目的]

大腸菌由来のプラスミド DNA (pDNA) を用いた非ウイルスベクターは、染色体 DNA への組み込みによる内因性遺伝子への影響が小さく、優れた安全性を有する遺伝子治療用ベクターと考えられている。しかし一方で、発現が一過的であることが問題となっている。

本研究では、pDNA の発現持続性の向上を目的とし、発現量の低下に伴う pDNA の核内動態の詳細な解析と、解析結果に基づいた新規遺伝子治療用 DNA の開発を行った。

[結果と考察]

1. 外来遺伝子の発現量低下要因の解析

遺伝子導入後の pDNA の核内動態を解析するため、CMV プロモーター制御下でルシフェラーゼを発現する pDNA (pCMV-luc) 20 μ g を、hydrodynamics 法と呼ばれる注射圧を利用した遺伝子導入法を用いて、BALB/c マウスの尾静脈より投与し、肝臓におけるルシフェラーゼ活性、および核内ルシフェラーゼ遺伝子量を測定した。その結果、導入後 28 日後までにルシフェラーゼ活性は $1/10^4$ に低下したのに対し、肝細胞単離核中に含まれるルシフェラーゼ遺伝子量の減少割合は $1/26$ であった。このことから、発現量低下の主要因が pDNA 1 分子あたりの発現量の低下 (silencing) であることが示された。

染色体 DNA の場合、シトシン-グアニンジヌクレオチド (CpG motif) のシトシン 5 位のメチル化や、DNA と結合するヒストン蛋白質の修飾状態が silencing に関与していることが知られている。そこで、これらの機構が pDNA の silencing に関与している可能性について検討した。しかし、メチル化感受性の制限酵素処理に対する抵抗性を指標としたメチル化解析の結果、pDNA のいずれの領域 (プロモーター領域、ルシフェラーゼ遺伝子領域、バックボーン領域) においても、メチル化は僅かしか観察されなかった。また、クロマチン免疫沈降法による解析から、pDNA と結合するヒストン蛋白質の修飾状態も大きく変化しないことが示された。

この結果を受けて、pDNA が遺伝子導入初期に一過的な活性化状態にある可能性を考え、pCMV-luc 投与後、silencing が観察された時点 (4 日または 14 日後) で、生理食塩水のための hydrodynamics 法による投与を行った。その結果、silencing を受けた pDNA の活性が再び上昇し、その後、初回の遺伝子導入後と同様の傾向で減少することが明らかとなった。このことから、pDNA の silencing の一因が一過的な活性化状態からの回帰であることが明らかとなった。

2. 持続発現型 DNA の開発

外来 DNA の核内動態解析の結果、silencing が可逆的であり、細胞核内において pDNA の転写抑制状態と転写活性化状態が相互に変換可能である可能性が示唆された。そこで、以下に示す 2 つの観点から発現持続性の向上を試みた。

まず、積極的に転写活性化状態を維持するための自己活性化 DNA の開発を行った。この目的で、酵母 GAL4 蛋白質の DNA 結合ドメインと単純ヘルペスウイルス VP16 の転写活性化ドメインを融合した人工転写因子 GAL4-VP16 を利用した。この転写因子の結合配列を 5 つ直列に並べたもの (G5) を reporter 遺伝子の TATA box 上流に付加すると同時に、GAL4-VP16 を発現する pDNA (activator) の TATA box 上流にも付加し、positive feed-back loop によって発現が持続化するように設計した。この activator / reporter を HeLa 細胞に導入した結果、持続的な発現が観察されたが、この活性は、polyA シグナルの下流への G5 の組み込みによって増強された。さらに、CMV プロモーター制御下にある activator / reporter の発現カセットの両端へ G5 を組み込むことにより、CMV プロモーター制御下の発現を持続化させることに成功した。また、同様のシステムを用いて、マウスの肝臓においてマウスアルブミン (ALB) プロモーター制御下の発現の消失半減期を、18 時間から 34 時間に延長させることに成功した。

一方、これとは異なる観点から、silencing を回避する DNA の開発を試みた。染色体 DNA 上で silencing を回避する能力があるとされるインスレーター (ニワトリ β -グロビン遺伝子上流に存在する 4 番目の DNaseI 高感受性部位; cHS4) を利用し、これを 2 個直列に連結して、発現カセットの両端に組み込んだ reporter を作成した。Hydrodynamics 法を用いて、肝臓における発現持続性を評価した結果、CMV プロモーター制御下の消失半減期を 17 時間から、27 時間に延長させることに成功した。

最後に、上記の 2 つのシステムを組み合わせ、発現カセットの両端に cHS4 を 2 個直列に連結した reporter / activator を構築し、その発現持続性を評価した。その結果、マウス肝臓において ALB プロモーター制御下の発現を最も高いレベルで維持することに成功した。

[結論]

以上、本研究では、外来 DNA の発現量低下要因の解明を試み、pDNA の発現量低下の主要因が silencing であることを明らかとした。また、この silencing が可逆的であることを見出し、細胞核内における①転写活性化状態の維持と②転写抑制状態の回避と言う 2 つの観点から持続発現型 DNA の開発を行った。そして、マウスの肝臓において ALB プロモーター制御下の発現を持続化できる可能性を示唆した。

これらの成果は、pDNA の改変によって、発現効率および発現持続性の改善が可能であることを示すものであり、非ウイルスベクター開発における核内動態制御の重要性を示すものである。

学位論文審査の要旨

主 査	准教授	紙 谷 浩 之
副 査	教 授	原 島 秀 吉
副 査	教 授	有 賀 寛 芳
副 査	教 授	木 原 章 雄

学 位 論 文 題 名

外来遺伝子の silencing 機構の解析と 持続発現型 DNA 開発への展開

非ウィルスベクターを用いる遺伝子治療の実用化に期待が寄せられている。しかし、非ウィルスベクターの問題点として、プラスミド DNA からの外来遺伝子発現が一過性であることが挙げられる。落合君はこの問題の解決のために、プラスミド DNA からの発現の一過性の原因の解明と新たな発現システムの開発を行った。

最初に落合浩史君は、外来遺伝子の発現量低下要因を解析した。落合君は、導入後のプラスミド DNA の核内動態を解析するため、CMV プロモーター制御下でルシフェラーゼを発現するプラスミド DNA を、hydrodynamics 法（高容量急速静脈注射法）を用いて、BALB/c マウスの尾静脈より投与し、肝臓におけるルシフェラーゼ活性（蛋白質量）及び核内ルシフェラーゼ DNA 量を測定した。その結果、導入後 28 日後までにルシフェラーゼ活性は 1/10,000 に低下したのに対し、核中のルシフェラーゼ DNA 量の減少割合は 1/26 であった。ルシフェラーゼ活性をルシフェラーゼ DNA 量で除した値は、プラスミド DNA 1 分子当たりの発現効率に相当するが、この値が急激に減少していた。また、落合君は、ルシフェラーゼ mRNA も同様に急激に低下する事を見出した。このことから、落合君は、発現量低下の主要因がプラスミド DNA 1 分子あたりの転写量の低下であることを見出し、silencing と命名した。

次に落合君は、プラスミド DNA の silencing の原因を探索した。染色体 DNA 上の遺伝子の場合には、主として2つの機構（DNA の CpG 配列中の C のメチル化と染色体 DNA に結合するヒストン蛋白質の修飾やその他の結合蛋白質の変化）が発現低下に関わっているとされている。そこで、落合君は、プラスミド DNA の C のメチル化とプラスミド DNA に結合しているヒストン蛋白質の修飾を経時的に調べた。しかし、落合君の予想とは異なり、両者ともに silencing を説明するほどの変化がなく、この両者の関与はほとんどないものと結論づけた。

落合君は、silencing の原因の特定には至らなかったものの、その研究過程で積極的に転写を活性化することにより silencing を回避できる可能性を着想した。そこで、次に落合君は、人工転写因子 GAL4-VP16 を用い、「自己活性化」しつづけることで発現を維持するシステムの構築を行った。GAL4-VP16 とは、酵母 GAL4 蛋白質の配列特異的 DNA 結合ドメインと単純ヘルペスウイルス VP16 の転写活性化ドメインを融合した蛋白質であり、目的遺伝子上流に GAL4 認識配列を付加する事で特異的に転写を上昇させる事が知られていた。落合君は、GAL4 認識配列を直列に 5 つ並べたもの（G5）をルシフェラーゼ遺伝子上流に付

加するとともに、GAL4-VP16 遺伝子の上流にも付加し、positive feed-back loop によって発現が持続化するように設計した。さらに、ルシフェラーゼ遺伝子・GAL4-VP16 遺伝子の下流 (polyA シグナルの下流) にも G5 を付加する事により、活性化のさらなる増強を見出した。落合君は、このシステムを最適化した結果、HeLa 細胞において発現が少なくとも 4 日間は持続する事を見出した。

さらに、*in vivo* における silencing を回避することを確認するために、マウスアルブミン (ALB) プロモーターを用いて同様のシステムを構築し、hydrodynamics 法によりマウスに投与した。その結果、通常プラスミドからのルシフェラーゼ発現の場合と比較して、肝臓における発現持続性が向上している事を見出した (消失半減期が 18 時間から 34 時間に延長)。

最後に落合君は、染色体 DNA 上で silencing を回避する能力があるとされるインスレーターをこのシステムに導入し、マウス肝臓において ALB プロモーター制御下の発現を最も高いレベルで維持することに成功した。

以上、落合浩史君は、プラスミド DNA からの外来遺伝子発現に関して種々の興味深い事実を明らかにするとともに、発現持続化のための新しいシステムを構築した。落合君の研究を基盤として、さらなる研究の展開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。

よって落合浩史君は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格のあるものと認める。