

学位論文題名

Study on cellular incorporation of exogenous DNA and protein expression by using fluorescence correlation spectroscopy

(蛍光相関分光法を用いた外来 DNA の細胞内導入と遺伝子発現に関する研究)

学位論文内容の要旨

現在、外来 DNA を生体に導入する遺伝子治療はがんやアルツハイマーなどの難治性疾患の治療の 1 つとして研究が進められている。また、遺伝子導入技術は近年注目を集めている iPS 細胞作製の根幹を成す技術でもある。現在考えられている生体 (細胞) 内への遺伝子導入法は、ウイルス、人工ベクターの二つに分類される。ウイルスベクターは遺伝子導入効率が高いものの、免疫原性や副作用の存在が懸念されている。一方で人工ベクターは安全性の面では優れるものの、導入した遺伝子の発現効率が低いという問題を抱えている。したがって、遺伝子の発現効率に優れる人工ベクターの開発が望まれている。ベクターによる遺伝子導入において、細胞膜 (一般的にはエンドソーム) を突破した外来 DNA は細胞質から核に移行する必要がある。効果的な発現を実現する新規ベクター創製のためには細胞内、特に細胞質内での DNA の動態を解明する事が必要であるが、現在のところ未知な部分が多い。その原因の一つは生きた細胞内に導入された DNA を直接観察できる手法がなかったためであると考えられる。そこで、本研究では、近年細胞内での分子間相互作用などへの利用が進んでいる蛍光相関分光法 (FCS) および蛍光相互相関分光法 (FCCS) を利用することで、細胞内に導入された外来 DNA の拡散、あるいは分解を直接観察することを目的として解析を行った。さらに、細胞内に導入された外来 DNA の量と、発現するタンパク質の量を単一細胞レベルで定量することが可能なシステムを構築した。

第二章においては、細胞質内での外来 DNA の動態に注目した。生細胞に蛍光標識 DNA を直接導入し、細胞質内での外来 DNA の拡散の様子を観察することを試みた。導入直後に細胞質内で FCCS 測定を行うと高い相互相関の振幅が観察され、導入直後では導入した DNA がインタクトであることが示された。しかし、導入 45 分後に同一の細胞を FCCS 測定すると、相互相関の振幅はほとんど観察されなかった。それらの結果から、導入された DNA は 45 分程度の短い時間で切断を受けていることが明らかになった。また、導入した DNA および分解産物の拡散の速さを細胞内で検出し、得られた拡散時間

の分布を解析することで分解のメカニズムについて研究した。水溶液中における分解モデルと細胞内で観察された分解を併せて考察した結果、細胞質内での外来 DNA 分解は主に 5'-3'エキソヌクレアーゼによるものであると結論付けた。それと同時に、生細胞内で外来 DNA を直接観察することで分解の時空間的な情報を得ることに成功した。さらに、見出された分解作用が、導入された外来 DNA による遺伝子発現の効率に影響を及ぼすかどうか評価した。導入する外来 DNA の末端を処理し、エキソヌクレアーゼ耐性にした場合の発現効率を未処理の場合と比較すると、試験した 4 種の細胞 (HeLa, COS7, MEF, HEK293) のうち 3 種では有意に発現が上昇した。特に、MEF においては顕著な差が見られた。一方で、HEK293 細胞では末端処理の効果が見られなかった。これらの結果から、培養細胞における遺伝子発現の際にエキソヌクレアーゼによる分解がバリアーになっており、さらに細胞種によってエキソヌクレアーゼ活性は異なるということが明らかになった。

第三章においては、遺伝子導入量と発現量を 1 細胞レベルで解析する系を開発した。通常の生化学的手法では、多数の細胞を破砕することで細胞内のタンパク質などを抽出し、解析を行うため、個々の細胞間の差が平均化されてしまう。そこで、単一細胞からタンパク質を抽出して定量することが可能なシステムの構築を試みた。単一細胞のタンパク質を定量するための手法として、マイクロ流体デバイス技術に注目した。この技術を用いて、113 ピコリットル体積をもつマイクロウェルを PDMS (polydimethylsiloxane) のチップ上に形成するよう設計し、その中に細胞を生やすことで単一細胞の単離を行い、発現していた蛍光タンパク質を溶出することに成功した。さらに、このシステムの検出系として FCS を組み合わせることで、マイクロウェル内において単一細胞由来の蛍光分子を定量することが可能となった。解析の結果、トランスフェクション操作で培養細胞に導入される DNA 分子の数はどの細胞でもほぼ一定であり、観察される遺伝子発現の強度分布はそれぞれの細胞における生理的な条件 (細胞周期や代謝の活性など) によってもたらされているということが示唆された。

本研究において、遺伝子導入の効率は細胞内に入った外来 DNA の量よりも細胞内での生理現象によって左右されることが示された。遺伝子導入に対する細胞内のバリアーの理解や新規のベクター開発のために重要な新しい知見をもたらすものであると同時に、遺伝子デリバリーや 1 細胞計測の分野における蛍光相関分光法の有用性を示した点についても意義あるものであると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 金 城 政 孝
副 査 教 授 出 村 誠
副 査 教 授 小 布 施 力 史

学 位 論 文 題 名

Study on cellular incorporation of exogenous DNA and protein expression by using fluorescence correlation spectroscopy

(蛍光相関分光法を用いた外来 DNA の細胞内導入と
遺伝子発現に関する研究)

近年、外来 DNA を生体に導入する遺伝子治療はがんやアルツハイマーなどの難治性疾患の治療の 1 つとして研究が進められている。また、遺伝子導入技術は近年注目を集めている iPS 細胞作製の根幹を成す技術でもある。現在考えられている生体（細胞）内への遺伝子導入法は、ウイルス、人工ベクターの二つに分類される。ウイルスベクターは遺伝子導入効率が高いものの、免疫原性や副作用の存在が懸念されている。一方で人工ベクターは安全性の面では優れるものの、導入した遺伝子の発現効率が低いという問題を抱えている。したがって、遺伝子の発現効率に優れる人工ベクターの開発が望まれている。ベクターによる遺伝子導入において、細胞膜（一般的にはエンドソーム）を突破した外来 DNA は細胞質から核に移行する必要がある。効果的な発現を実現する新規ベクター創製のためには細胞内、特に細胞質内での DNA の動態を解明する事が必要であるが、現在のところ未知な部分が多い。その原因の一つは生きた細胞内に導入された DNA を直接観察できる手法がなかったためであると考えられる。そこで、本研究では、近年細胞内での分子間相互作用などへの利用が進んでいる蛍光相関分光法（FCS）および蛍光相互相関分光法（FCCS）を利用することで、細胞内に導入された外来 DNA の拡散、あるいは分解を直接観察することを目的として解析を行った。さらに、細胞内に導入された外来 DNA の量と、発現するタンパク質の量を単一細胞レベルで定量することが可能なシステムを構築した。

第二章においては、細胞質内での外来 DNA の動態に注目した。生細胞に蛍光標識 DNA を直接導入し、細胞質内での外来 DNA の拡散の様子を観察することを試みた。導入直後に細胞質内で FCCS 測定を行うと高い相互相関の振幅が観察され、導入直後では導入した DNA がインタクトであることが示された。しかし、導入 45 分後に同一の細胞を FCCS 測

定すると、相互相関の振幅はほとんど観察されなかった。それらの結果から、導入された DNA は 45 分程度の短い時間で切断を受けていることが明らかになった。また、導入した DNA および分解産物の拡散の速さを細胞内で検出し、得られた拡散時間の分布を解析することで分解のメカニズムについて研究した。水溶液中における分解モデルと細胞内で観察された分解を併せて考察した結果、細胞質内での外来 DNA 分解は主に 5' -3' エキソヌクレアーゼによるものであると結論付けた。それと同時に、生細胞内で外来 DNA を直接観察することで分解の時空間的な情報を得ることに成功した。さらに、見出された分解作用が、導入された外来 DNA による遺伝子発現の効率に影響を及ぼすかどうか評価した。導入する外来 DNA の末端を処理し、エキソヌクレアーゼ耐性にした場合の発現効率を未処理の場合と比較すると、試験した 4 種の細胞 (HeLa, COS7, MEF, HEK293) のうち 3 種では有意に発現が上昇した。特に、MEF においては顕著な差が見られた。一方で、HEK293 細胞では末端処理の効果が見られなかった。これらの結果から、培養細胞における遺伝子発現の際にエキソヌクレアーゼによる分解がバリアーになっており、さらに細胞種によってエキソヌクレアーゼ活性は異なるということが明らかになった。

第三章においては、遺伝子導入量と発現量を 1 細胞レベルで解析する系を開発した。通常の生化学的手法では、多数の細胞を破碎することで細胞内のタンパク質などを抽出し、解析を行うため、個々の細胞間の差が平均化されてしまう。そこで、単一細胞からタンパク質を抽出して定量することが可能なシステムの構築を試みた。単一細胞のタンパク質を定量するための手法として、マイクロ流体デバイス技術に注目した。この技術を用いて、113 ピコリットル体積をもつマイクロウェルを PDMS (polydimethylsiloxane) のチップ上に形成するよう設計し、その中に細胞を生やすことで単一細胞の単離を行い、発現していた蛍光タンパク質を溶出することに成功した。さらに、このシステムの検出系として FCS を組み合わせることで、マイクロウェル内において単一細胞由来の蛍光分子を定量することが可能となった。解析の結果、トランスフェクション操作で培養細胞に導入される DNA 分子の数はどの細胞でもほぼ一定であり、観察される遺伝子発現の強度分布はそれぞれの細胞における生理的な条件 (細胞周期や代謝の活性など) によってもたらされているということが示唆された。

本研究において、遺伝子導入の効率は細胞内に入った外来 DNA の量よりも細胞内での生理現象によって左右されることが示された。遺伝子導入に対する細胞内のバリアーの理解や新規のベクター開発のために重要な新しい知見をもたらすものであると同時に、遺伝子デリバリーや 1 細胞計測の分野における蛍光相関分光法の有用性を示した点についても意義あるものであると考えられる。

よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。