

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790036

研究課題名(和文) 外来遺伝子防御の定量的可視化に基づく遺伝子導入メカニズムの解明と高効率化

研究課題名(英文) Evaluation of gene delivery mechanism based on quantitative visualization of cellular defense system against exogenous genes for high-efficiency gene therapy

研究代表者

佐々木 章 (Sasaki, Akira)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号：30580162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では生細胞内における外来遺伝子の拡散・分解などの運命を定量的に可視化することを目標に掲げ、その達成のためにラスタ画像相互相関分光法(ccRICS)の測定系を新たに構築した。次にこの測定系を用い、生細胞内における外来遺伝子の分解を可視化した。その結果、DNA分解酵素活性が細胞種によって異なることを直接観測し動画として表現することに成功した。これは、細胞が持つ外来遺伝子の侵入に対する防御機構とその強さを新たに定義付けする画期的な成果であり、遺伝子治療や核酸医薬の発展に寄与することが期待される。

研究成果の概要(英文)：The Purpose of this study is to visualize intracellular diffusion and degradation of exogenous genes quantitatively. We have newly developed raster image cross-correlation spectroscopy (ccRICS) setup. Degradation activity of DNA in living cells was successfully monitored as a movie through a direct measurement by the developed ccRICS system. Our result shows that the DNA degradation activity in living cells differs between cell lines. The achievement reveals a defense machinery against exogenous DNA invasion and determine its activity. The work will contribute a development of nucleic acid medicine and gene therapy.

研究分野：生物物理学

キーワード：遺伝子デリバリー 蛍光イメージング 1分子計測 画像相関 酵素活性

1. 研究開始当初の背景

外来遺伝子を体内に導入し、タンパク質を発現させたり目的遺伝子をノックダウンしたりする遺伝子治療はパーキンソン病など難治性疾患の治療法の1つとして期待されている。このような遺伝子治療を実現するには、細胞外から導入された外来遺伝子が効率的に核に至り、発現することが必要である。遺伝子治療の臨床における実用化において、遺伝子導入効率の向上は極めて重要な課題である。これまで遺伝子導入の効率化に対しては細胞膜を効率よく突破させる機構の開発が中心を占めてきた。これらの研究は導入効率や目的部位へのターゲティングに対し重要な貢献をしてきたが、現時点では実用化に耐える程の遺伝子発現効率は実現されていない。この原因の一つは、外来遺伝子の導入から発現に至る経路やメカニズムの解明が欠落し、ブラックボックスのままである点にある。本来、外来遺伝子の発現は厳重に防御されるべきであり、細胞が持つバリアー機構が重要な役割を果たしていることが考えられる。このような防御機構を含め、外来遺伝子発現システムの全体像を理解するには細胞内に導入された外来DNAの運命を定量化することが不可欠である。しかしながら、生きた細胞内で動的に変化する外来遺伝子の局在や分解を時空間的に解析し定量的に表現することは実現されていなかった。過去の研究において、我々は生細胞測定という観点に注目し蛍光相関分光法 (FCS; Fluorescence correlation spectroscopy)、蛍光相互相関分光法 (FCCS; Fluorescence cross-correlation spectroscopy) を利用して、細胞質に導入された外来DNAがヌクレアーゼによって分解される様子、つまりは外来遺伝子に対する細胞の防御機構が実際に働く様子を定量的にモニターすることに成功、これが発現効率低下の要因の一つであることを明らかにした (Sasaki A and Kinjo M. *J. Control. Release* 143(1):104-111 (2010))。しかし、課題として、従来の測定系は細胞内の任意の1点しか同時に測定できないという点があった。外来遺伝子の分解は分 (min) オーダーで進行していくため、1点ずつの測定においては各点における測定までの経過時間の差によって値が変化してしまった。つまり既存のシステムではいつ、どこで外来DNAが分解されるかという時空間的な情報を同時に得ることはできなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、生細胞内における外来遺伝子の拡散・分解などの運命を時空間的かつ定量的に可視化すると同時に単一細胞内の外来遺伝子発現のアウトプット (発現タンパク質の量) を定量的に測定し、防御に関与するヌクレアーゼの同定と制御によって外来遺伝子発現を高効率化することである。

3. 研究の方法

(1) 外来DNAの蛍光標識と細胞への導入

外来DNAの画像相互相関分光測定を行って分解をモニターするには、外来DNAを2色 (緑、赤) の蛍光色素で標識する必要がある。蛍光標識プローブの作成は、提案者が過去に蛍光相互相関分光法で分解モニターを行った際に構築した蛍光標識プライマーを用いたPCR法を改変して行った。作成した外来DNAを細胞内に定量的に導入する方法としてマイクロインジェクションを用いた。一般的な遺伝子導入技術ではエンドサイトーシス経路で外来DNAが取り込まれ、膜を突破したごく一部の外来DNAが細胞質から核に向かい、その他大部分はリソソーム系で分解されるが、マイクロインジェクションで細胞質に直接外来DNAを導入することで、膜突破後の外来DNAの環境を再現することが可能となる。この方法の利点は、短時間で、測定に必要な数百nM程度の濃度の外来遺伝子を定量的に導入できる点である。

(2) ラスター画像相互相関分光法 (ccRICS; Cross-correlation raster image correlation spectroscopy) による分解のマッピング

外来DNAが導入された生細胞内でccRICS解析を行い、単一細胞に導入された外来DNAの分解、局在さらには細胞内での拡散速度を時空間的に解析する手法を構築した。導入する蛍光標識DNAはインタクトな状態では2色の蛍光色素が連結されており相互相関が検出されるが、分解によって相互相関が消失するプローブである。そこで、レーザー共焦点蛍光顕微鏡 (LSM) 画像を格子状の領域に分割し、各領域で空間 (相互) 相関関数を計算しその相関値を元の蛍光画像上にマッピングした。相互相関値のマップの時間変化を観察することで、生細胞内において外来DNAがいつ、どこで分解されているかという運命を可視化し、さらには分解速度を定量することができる。相互相関値と併せてDNA分子の拡散速度の変化や濃度の変化も解析した。ccRICSは比較的新しく開発された方法であり、最適な測定条件が未だ固定されていない。そこでまず *in vitro* の測定も含め、過去の実験系の再現を通じて条件や解析法の最適化を行った。

(3) 単一細胞レベルのタンパク質発現量の定量化

生細胞内の分解活性の可視化と併せて、フローサイトメトリーを用い、導入した外来DNAからの遺伝子発現効率も単一細胞レベルで測定した。

4. 研究成果

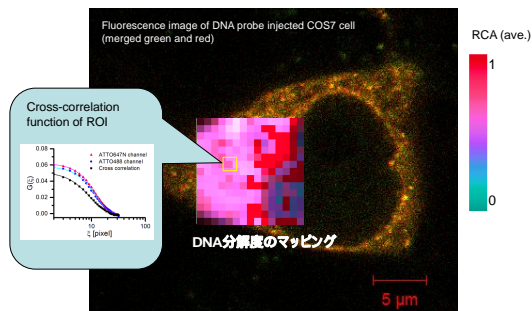
(1) 研究の主な成果

ラスター画像相互相関分光解析手法 (ccRICS) の確立

蛍光DNAを導入した細胞の画像取得条件を詳細に検討し、測定に最適な条件を見つけ出し

た。まず、作成した蛍光標識 DNA プローブを溶液中で測定した。ネガティブコントロールとして1色ずつの蛍光分子で標識されたオリゴヌクレオチドの混合物を ccRICS 測定した。これらの測定から、2色の蛍光色素が同時に拡散しているかどうか(すなわち繋がっているかどうか)を判別できることが示された。さらに、DNA プローブを制限酵素で分解したところ、分解過程を経時的に定量化できることが明らかになった。また、大量のタイムラプス画像を一度に処理可能な画像解析プログラムを開発し、顕微鏡画像(動画)から時空間的に ccRICS 解析を行う手法を確立した(図1)。

図1 ラスター画像相互相関分光解析



相関解析による外来 DNA 分解活性の時空間的可視化

完成した ccRICS の測定系を利用し、HEK293 細胞ならびに MEF 細胞における外来遺伝子の細胞内分解を時空間的に可視化した。その結果、DNA 分解酵素活性が細胞種によって異なることを直接観察し動画として表現することに成功した。具体的には、DNA プローブをマイクロインジェクションした細胞を ccRICS 解析したところ、MEF 細胞では導入後 10 分程度で分解が進行したのに対し、HEK293 細胞では 50 分経過しても顕著な分解は見られなかった(図2)。さらに、単一細胞内の遺伝子発現効率に関し、環状プラスミドと直鎖状 DNA をそれぞれ細胞導入した際の EGFP 遺伝子発現効率をフローサイトメトリーによって単一細胞レベルで検証した。細胞内での酵素活性データと比較検討した結果、酵素活性と発現効率の相関が示唆された。結論として、細胞株によって DNA 分解活性、すなわち外来遺伝子に対する防御機構の強度が大きく異なり、それは遺伝子デリバリー経路のバリアーとして機能していることが明らかになった。これは、生きた細胞の中で DNA の分解をリアルタイムに直接観察した世界初の成果である。同時に、DNA 分解活性と遺伝子発現は相関し、細胞株によって活性に差が見られたことから、例えば臓器によって核酸医薬の効果が異なる可能性を示唆する等、DNA 分解活性が遺伝子導入効率向上に重要な鍵であるという新しい考え方を提唱するに至った。

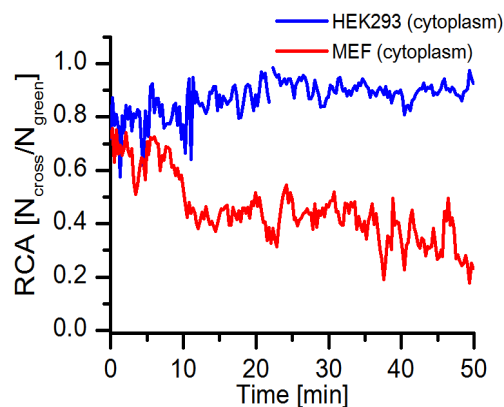


図2 細胞株による DNA 分解速度の違い

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

本研究の成果は、細胞が持つ外来遺伝子の侵入に対する防御機構とその強さを新たに定義付ける画期的な成果である。基礎研究分野では国内学会発表においても多数の聴衆の興味を引いたほか、世界的に見ても最先端の計測手法である。また応用としては、遺伝子デリバリー分野(すなわち核酸医薬、遺伝子治療)において理論的なバックボーンを与える基盤的な技術となりうる。

(3) 今後の展望

今後は本研究で発見した DNA 分解酵素活性を担う分子を「同定」することが求められる。蛍光イメージング技術は機能を追うのには強力な手法であるが、蛍光でターゲット分子を修飾することが必要なため「同定」は不得手である。この弱点を補うために次世代シーケンサーや質量分析といった技術を組み合わせる必要がある。最終的に分解酵素活性の同定・制御が達成されれば、核酸医薬や遺伝子治療の効率上昇に必須な基礎的知見を与えるであろう。さらなる展望として、本研究はそもそも細胞質になぜ DNA 分解酵素が存在するのか、どのような生理的な意味を持つのかという本質的な疑問の解決につながると思われる。特に、分解酵素の制御を通じて、ウイルス等に対する生体防御機構や DNA 代謝、さらには疾患との関連など、「生体内の DNA 分解の意義」に迫っていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計5件)

- (1) Sasaki A., Tsukasaki Y., Komatsuzaki A., Sakata T., Yasuda H., Jin T. : Recombinant protein (EGFP-Protein G)-coated PbS quantum dots for in vitro and in vivo dual fluorescence (visible and second-NIR) imaging of breast tumors. *Nanoscale*, 7(12): 5115-5119

- (2015) 査読有
doi: 10.1039/c4nr06480a.
- (2) Moritomo H., Yamada K., Kojima Y., Suzuki Y., Tani S., Kinoshita H., Sasaki A., Mikuni S., Kinjo M., Kawamata J. : A biphenyl type two-photon fluorescence probe for monitoring the mitochondrial membrane potential. *Cell Struct. Funct.*, 39(2):125-33 (2014) 査読有
doi: 10.1247/csf.14006
- (3) 佐々木章, 金城政孝 : テクニカルノート: 蛍光相互相関分光法を駆使した生細胞内の分子状態解析. *生化学*, 84(12): 1024-1027, (2012) 査読有
http://www.jbsoc.or.jp/back_no/84-12
- (4) Nakane Y., Sasaki A., Kinjo M. and Jin T. : Bovine serum albumin-coated quantum dots as a cytoplasmic viscosity probe in a single living cell. *Anal. Methods*, 4: 1903-1905 (2012) 査読有
doi: 10.1039/C2AY25318F
- (5) Tani S., Nakagawa K., Honda T., Saito H., Suzuki Y., Kawamata J., Uchida M., Sasaki A. and Kinjo M. : Fluorescence Imaging of Mitochondria in Living Cells Using a Novel Fluorene Derivative with a Large Two-Photon Absorption Cross-Section. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 13(14): 2649-2654 (2011) 査読有
<http://www.eurekaselect.com/105764/article>

〔学会発表〕(計 11 件)

- (1) 佐々木章, 山本条太郎, 神隆, 金城政孝 「ラスタ画像相互相関分光法による生細胞内外来 DNA 分解活性の時空間的可視化」第 67 回日本細胞生物学会大会、タワーホール船堀(東京都) 2015 年 7 月 2 日
- (2) Sasaki A. 「Fluorescence correlation methods for detecting enzymatic activities in living cells」IIT Delhi (India)-AIST (Japan) Joint Symposium、IIT Delhi、デリー(インド) 2015 年 2 月 23 日
- (3) 佐々木章 「蛍光相互相関分光法による分子間相互作用解析」第 24 回細胞生物学ワークショップ、北海道大学(北海道・札幌) 2015 年 1 月 15 日
- (4) Sasaki A. 「Fluorescence correlation methods for detecting enzymatic activities in living cells」2nd AIST international imaging workshop (産総研(茨城県・つくば), 2014 年 12 月 9 日
- (5) Sasaki A. 「Fluorescence correlation methods for detecting enzymatic

- activities in living cells」NIST-AIST imaging summit、NIST、ゲイサースバーグ(アメリカ), 2013 年 12 月 2 日
- (6) 佐々木章 「蛍光相互相関分光法による分子間相互作用解析」第 22 回細胞生物学ワークショップ、北海道大学(北海道・札幌) 2013 年 12 月 17 日
- (7) 佐々木章 「蛍光相互相関分光法の創薬スクリーニングへの応用」第 19 回未来創薬・医療イノベーションセミナー、北海道大学(北海道・札幌) 2013 年 1 月 16 日
- (8) 佐々木章 「蛍光相互相関解析による細胞内外来 DNA 動態の可視化」生化学会北海道支部、生物物理学会北海道支部、北海道分子生物学研究会共催 2012 年度合同シンポジウム『生命現象の分子レベルでの解明』北海道大学(北海道・札幌) 2012 年 11 月 16 日
- (9) Sasaki A. and Kinjo M. 「Mapping of intracellular degradation of exogenous DNAs by using cross-correlation raster image correlation spectroscopy (ccRICS)」The 10th International Symposium for Future Drug Discovery and Medical Care “Frontiers of interdisciplinary research in medicine”(The alumni hall “Frate” Hokkaido Univ. (北海道・札幌) 2012 年 10 月 3 日
- (10) 佐々木章、金城政孝 「Visualization of intracellular defense system against exogenous DNAs by using cross-correlation raster image correlation spectroscopy (ccRICS)」日本生物物理学会第 50 回年会、名古屋大学東山キャンパス(愛知県、名古屋) 2012 年 9 月 22 日
- (11) 佐々木章、北村朗 「画像相関分光解析実習 点と点の相関性から何がわかるのか?」第 4 回・光塾 技術講習会講師、北海道大学(北海道・札幌) 2012 年 8 月 25 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐々木 章 (SASAKI, Akira)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究員

研究者番号: 30580162