

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25282144

研究課題名(和文) 遺伝子治療実用化を加速する効率的・持続的遺伝子発現システムの創製

研究課題名(英文) Efficient and durable transgene expression systems

研究代表者

紙谷 浩之(Kamiya, Hiroyuki)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・教授

研究者番号：10204629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：アクチベーターとして、配列依存的DNA結合蛋白質(酵母GAL4の配列依存的DNA結合ドメイン)とマウスのヒストンアセチル基転移酵素(HAT)の融合蛋白質の遺伝子を作製し、また、GAL4の配列依存的DNA結合ドメインが結合する配列をレポーター遺伝子(ルシフェラーゼ遺伝子)とGAL4-HAT遺伝子の上流と下流に導入した。Hepa1-6細胞にアクチベーター遺伝子と共導入した結果、レポーター遺伝子の発現が有意に上昇することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Histone acetylation is associated with activation of genes on chromosomes. Transgene expression from plasmid DNA might be increased when histone bound to plasmid DNA is acetylated. We employed the positive feedback system using a fusion protein of the sequence-specific DNA binding domain of yeast GAL4 and the histone acetyltransferase (HAT) domain of mouse CREB-binding protein (GAL4-HAT), in which GAL4-HAT promotes its own expression as well as that of a reporter gene product (luciferase), to examine the hypothesis. The activator plasmid DNA carrying the gene for GAL4-HAT was introduced into mouse Hepa1-6 cells together with the reporter plasmid DNA by lipofection. Significantly increased luciferase expression was observed by the co-introduction of the activator plasmid DNA. Moreover, acetylation of histone bound to the reporter plasmid DNA was enriched by the activator plasmid DNA. These results indicated that the GAL4-HAT is useful for enhanced transgene expression.

研究分野：遺伝子治療学

キーワード：遺伝子治療 プラスミドDNA

1. 研究開始当初の背景

ウイルスを用いない外来核酸導入(非ウイルスベクター)はその安全性から遺伝子治療やバイオテクノロジー分野において期待が寄せられているが、非ウイルスベクターによる外来遺伝子の発現は弱くかつ一過性である。弱い発現は当然の問題点であるのに加えて、一過性発現も、それを克服しない限り患者は頻繁に外来 DNA の投与を受けることになるため、遺伝子治療の実用化の大きな障害となっている。研究代表者や他の研究グループによる外来 DNA の細胞内動態・核内動態の追跡の結果、弱く一過的な発現の原因は DNA 量の問題以外に外来 DNA 1 分子当たりの発現効率が低く、かつ、経時的に著しく減少していくことであることが明らかにされた。また、外来遺伝子発現の鍵は外来 DNA と核内蛋白質との相互作用にあることが強く示唆された。

遺伝子治療としては、上記の外来遺伝子発現法の他に、ゲノム(染色体) DNA 上の変異配列を正常配列に戻す遺伝子修復法がある。この方法はゲノム編集技術に含まれる。現在のゲノム編集技術は、CRISPR-Cas9 等の人工ヌクレアーゼによる染色体 DNA の切断後に、非相同末端結合による誤った連結が終止コドンを生じさせて標的遺伝子がノックアウトされることに基づくが、人工ヌクレアーゼとともに供与体核酸を導入すると、切断部位に供与体核酸が挿入され、原理的には任意の配列に置換することができるとされる。研究代表者は数百塩基の一本鎖 DNA にオリゴ核酸をアニーリングさせた tailed duplex を考案し、人工ヌクレアーゼによる切断なしで *in vivo* で遺伝子修復が可能であることを示しているが、実用化のためにはその効率の上昇が必要である。

2. 研究の目的

以上のことから、核内蛋白質との相互作用を制御することにより、外来遺伝子の核内動態を制御して効率的かつ持続的な外来遺伝子発現を達成すると発想を得、様々な検討を行うこととした。導入したプラスミド DNA にはヒストン蛋白質が結合する。染色体 DNA の場合、ヒストンの高アセチル化領域は高発現領域と重複していることが知られている。そこで、プラスミド DNA に結合するヒストンを特異的にアセチル化するシステムを検討した。また、アセチル化ヒストンとの共導入を検討した。さらに、ヒストンとの結合は発現を抑制することから、ヒストンとの結合を防ぐ(ヌクレオソーム形成を抑制する)配列をプロモーター領域に導入した。さらに、発現持続型プラスミドである CpG-free プラスミドの持続化において CpG-free 骨格自体が持続化因子である可能性(研究代表者が報告した)を念頭に、様々なプロモーターを有するプラスミドを作製し検討した。

また、遺伝子修復効率の上昇を指向して、基礎的データを得るために tailed duplex 上

の第二のミスマッチの影響を調べた。また、tailed duplex による遺伝子修復の中間体の安定化を試みた。さらに、標的 DNA の切断が tailed duplex による遺伝子修復に与える影響を調べた。

3. 研究の方法

(1) アセチル基転移酵素を利用したヒストン修飾制御

Activator として、酵母 GAL4 の配列依存的 DNA 結合ドメインとマウスのヒストンアセチル基転移酵素(HAT)の融合蛋白質(GAL4-HAT)の遺伝子を含むプラスミド DNA を作製した。このプラスミド DNA の GAL4-HAT 発現カセットの上流と下流には、GAL4 の配列依存的 DNA 結合ドメインが結合する配列(G5)を導入した。この GAL4-HAT プラスミドをルシフェラーゼ遺伝子と発現カセットの上流と下流に G5 配列とを含むプラスミドとともに、マウス Hepa1-6 細胞にリポフェクション法により導入した。また、GAL4-HAT とルシフェラーゼの両発現カセットを含むプラスミド DNA を構築し、同様に Hepa1-6 細胞に導入した。48 時間後に蛋白質を抽出し、ルシフェラーゼ活性を測定した。また、抗アセチル化ヒストン H3 抗体を用いるクロマチン免疫沈降(ChIP)により、プラスミド DNA に結合するヒストン H3 のアセチル化程度を調べた。

(2) アセチル化ヒストンとの共導入

トリコスタチン A 処理したマウス Hepa1-6 細胞よりヒストンを抽出し、アセチル化修飾ヒストンを得た。プラスミド DNA とアセチル化修飾ヒストンを NAP-1 や ACF complex を用いる酵素反応により複合体(ヌクレオソーム)とし、ハイドロダイナミクス法を用いてマウスに導入した。48 時間後に蛋白質を抽出し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(3) ヒストン低親和性配列によるヌクレオソーム形成阻害

T₂₂ 配列をプロモーターと転写開始点との間に導入したプラスミド DNA を構築した。また、プロモーター上流に T₂₂ 配列を導入した。マウス Hepa1-6 細胞にリポフェクション法により導入し、48 時間後に蛋白質を抽出し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

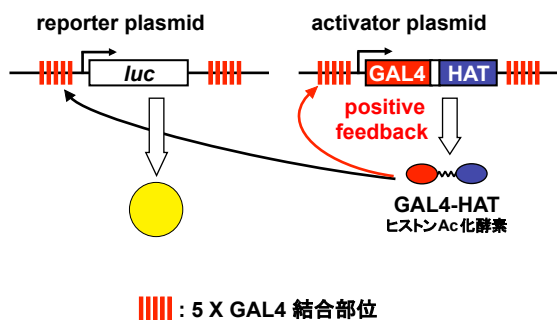
(4) CpG-free 骨格プラスミドによる発現持続

CpG-free 骨格を有するプラスミド(EF1 α プロモーターを有する)をベースとして、CMV プロモーターやアルブミンプロモーターを有するプラスミド DNA を構築した。外来遺伝子としては SEAP 遺伝子を用いた。ハイドロダイナミクス法を用いてマウスに導入し、経時的に血清中のアルカリ性ホスファターゼ活性を測定した。

(5) 遺伝子修復(配列変換)システムの開発

標的部位から離れた位置に第二のミスマッチを有する様々なプラスミド DNA を構築し、標的 DNA とした。標的 DNA と tailed duplex をヒト HeLa 細胞にリポフェクション法により共導入した。48 時間後に DNA を回収し、遺

伝子修復効率を測定した。



4. 研究成果

(1) アセチル基転移酵素を利用したヒストン修飾制御

Activator として、配列依存的 DNA 結合蛋白質 (酵母 GAL4 の配列依存的 DNA 結合ドメイン) とマウスのヒストンアセチル基転移酵素 (ヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT)) の融合蛋白質の遺伝子を作製し、また、GAL4 の配列依存的 DNA 結合ドメインが結合する配列を reporter 遺伝子と GAL4-HAT 遺伝子の上流と下流に導入した (上図)。その結果、activator (GAL4-HAT) と共導入した場合に、reporter 遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) の発現が有意に上昇することを見出した。また、この効果はヒストン脱アセチル化酵素阻害薬 (ヒストンのアセチル化を genome-wide に促進する) トリコスタチン A によりマスクされることを観察した。さらに、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 法により、ルシフェラーゼ遺伝子周辺に結合しているヒストン蛋白質のアセチル化状態を調べたところ、GAL4-HAT 遺伝子と共導入した場合に、ヒストン蛋白質のアセチル化が亢進していることを確認した。従って、共導入による発現上昇の分子機構は、予想と同じくプラスミド DNA に結合するヒストンの特異的アセチル化である可能性が支持された。一方、activator 遺伝子と reporter 遺伝子の両者を搭載したプラスミド DNA を作製し、さらなる活性化を図ったが、予想に反して発現上昇効果が薄いことが明らかとなった。この原因は、GAL4-HAT 遺伝子の発現が弱いためと推測された。

(2) アセチル化ヒストンとの共導入

トリコスタチン A 処理したマウス Hepa1-6 細胞よりヒストンを抽出して得たアセチル化修飾ヒストンと NAP-1 や ACF complex を用いる酵素反応によりプラスミド DNA をアセチル化修飾ヌクレオソームとした。マウスに導入したところ、reporter 遺伝子 (ルシフェラーゼ遺伝子) の発現が上昇した。これは、活性化ヒストンとの共導入が有用な手段となることを示す。

(3) ヒストン低親和性配列によるヌクレオソーム形成阻害

ヒストンとの結合を防ぐ (ヌクレオソーム形成を抑制する) T₂₂ 配列をプロモーター下流

(プロモーターと転写開始点との間) に導入した。その結果、予想とは異なり、外来遺伝子発現が低下した。また、プロモーター上流に T₂₂ 配列を導入したが、発現に影響は無かった。

(4) CpG-free 骨格プラスミドによる発現持続
発現持続型プラスミドである CpG-free プラスミドの持続化において、CpG-free 骨格自体が持続化因子である可能性を念頭に、同骨格を有する様々なプラスミドを構築した。この仮説によるとプロモーター非依存的に持続性が得られるはずであったが、必ずしもこの仮説を支持する結果が得られなかった。

(5) 遺伝子修復 (配列変換) システムの開発
研究代表者が開発した遺伝子修復素子 (tailed duplex) による遺伝子修復 (配列変換) 法においては、標的部位にミスマッチが存在する。この方法は、細胞内の相同組換え機構に依存して遺伝子修復が生じると考えられるため、標的部位以外の第二のミスマッチが存在すると遺伝子修復効率が低下すると予想された。そこで、標的部位以外のミスマッチの影響を調べた結果、予想に反して第二のミスマッチは遺伝子修復効率に対し正に作用することを見出した。様々な組合せを用いて調べた結果、tailed duplex に 1 塩基挿入がある場合が、他の場合 (1 塩基欠失や 1 塩基置換がある場合) よりも遺伝子修復効率を上昇させることを明らかにした。しかし、第二のミスマッチの位置に関しては、有力な情報は得られなかった。

また、tailed duplex による遺伝子修復の過程には、D-loop 構造が含まれていると推定されるため、D-loop 構造を安定化するオリゴヌクレオチドと tailed duplex を共導入したところ、遺伝子修復効率を上昇する傾向が観察された。

さらに、標的 DNA の切断が tailed duplex による遺伝子修復に与える影響を調べたところ、標的 DNA を切断すると遺伝子修復効率が約 1 桁向上することを明らかにした。

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 4 件)

- (1) H. Kamiya, N. Nishigaki, A. Ikeda, S. Yukawa, Y. Morita, Y. Nakatsu, T. Tsuzuki and H. Harashima: Insertion and deletion mismatches distant from the target position improve gene correction with a tailed duplex. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, in press 査読有
- (2) H. Maruyama, K. Furukawa, H. Kamiya, N. Minakawa and A. Matsuda: Transcription of 4'-thiodNA

templates to natural RNA in vitro and in mammalian cells. Chem. Commun. 51 (#37), 7887-7890 (2015年5月) doi: 10.1039/C4CC08862J 査読有

- (3) G. N. Kanda, S. Miyamoto, M. Kobayashi, I. Matsuoka, H. Harashima and H. Kamiya: Anatomy of plasmid DNAs with anti-silencing elements. Int. J. Pharm. 464 (#1-2), 27-33 (2014年4月) doi: 10.1016/j.ijpharm.2014.01.025 査読有
- (4) R. Togashi, H. Harashima and H. Kamiya: Correlation between transgene expression and plasmid DNA loss in mouse liver. J. Gene Med. 15 (#6-7), 242-248 (2013年6-7月) doi: 10.1002/jgm.2716 査読有

[学会発表] (計 12 件)

- (1) 西原実香, 鈴木哲矢, 紙谷浩之: 特異的ヒストンアセチル化による導入プラスミド DNA の発現上昇. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (2015年12月3日、神戸)
- (2) 西垣奈津希, 鈴木哲矢, 中津可道, 續輝久, 紙谷浩之: 非標的部位に導入した塩基-塩基ミスマッチが tailed duplex による配列変換へ与える影響. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (2015年12月3日、神戸)
- (3) 今田貴士, 西垣奈津希, 鈴木哲矢, 紙谷浩之: 標的配列近傍での切断は 5' -tailed duplex による配列変換効率を向上させる. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会 (2015年12月1日、神戸)
- (4) 紙谷浩之 (招待講演): 核酸を用いる発癌・制癌研究: DNA 損傷による変異機構の解明と遺伝子治療用核酸の設計. 日本分析化学会中国四国支部 広島地区分析技術研究会 (2015年3月18日、東広島)
- (5) 西原実香, 神田元紀, 山門振一郎, 原島秀吉, 紙谷浩之: 特異的ヒストン修飾による導入プラスミド DNA の発現上昇. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014年11月27日、横浜)
- (6) 西垣奈津希, 池田彰弘, 湯川誠也, 守田由子, 中津可道, 續輝久, 原島秀吉, 紙谷浩之: 非標的部位におけるミスマッチの配列変換 (遺伝子修復) への影響. 第 37 回日本分子生物学会年会 (2014年11月26日、横浜)
- (7) 紙谷浩之 (招待講演): DNA 損傷が誘発する発癌機構の解明と遺伝子治療用核酸の設計. 日本分析化学会第 63 年会 (2014年9月18日、東広島)
- (8) 西原実香, 神田元紀, 山門振一郎, 原島

秀吉, 紙谷浩之: プラスミド DNA 特異的ヒストン修飾による導入遺伝子発現上昇. 第 30 回日本 DDS 学会学術集会 (2014年7月30日、東京)

- (9) 西原実香, 神田元紀, 山門振一郎, 原島秀吉, 紙谷浩之: 導入プラスミド DNA の特異的ヒストン修飾による発現上昇. 第 55 回日本生化学会中国・四国支部例会 (2014年6月7日、松山)
- (10) 西垣奈津希, 池田彰弘, 湯川誠也, 守田由子, 中津可道, 續輝久, 原島秀吉, 紙谷浩之: フェージ DNA を用いた tailed duplex の作製と標的遺伝子の配列変換. 第 55 回日本生化学会中国・四国支部例会 (2014年6月7日、松山)
- (11) 神田元紀, 小林三和子, 松岡一郎, 原島秀吉, 紙谷浩之: *In vivo* における外来遺伝子発現の持続を達成する DNA 配列の同定. 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013年12月3日、神戸)
- (12) R. Togashi, H. Akita, H. Kamiya, H. Harashima: The effect of plasmid DNA sequence on gene expression and polycation complex formation. 40th Annual Meeting & Exposition of the Controlled Release Society (2013年7月22日、Honolulu, Hawaii, USA)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

紙谷 浩之 (KAMIYA, Hiroyuki)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
教授

研究者番号: 10204629