

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82406

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25830069

研究課題名(和文) 光、磁場を利用したIn vivo遺伝子発現操作系の開発

研究課題名(英文) Establishment of novel strategy for light and magnetic field-inducible gene expression system.

研究代表者

伊達木 穰(Dateki, Minori)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究・医学教育部医学科専門課程・助教)

研究者番号：00415879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：(1)生体内で磁気センシングを担う転写因子CryptochromeとGAL4BD、VP16ADとを融合することで、光、磁場依存的に活性が変化するキメラ転写因子の作出を試みたが、目的にかなう応答性を持ったものは得られなかった。(2)光を利用し組織や培養細胞への遺伝子導入の効率を増強する手法は多く開発されているものの、不要な領域への導入を積極的に抑制する手法は開発の例が少ない。市販のトランスフェクション試薬を材料に、光による導入効率の抑制が見られるものを選出し、この性質を利用することでシャーレ内の狙った領域に存在する細胞のみに遺伝子を導入する新規手法を開発した。

研究成果の概要(英文)：1.To establish a novel gene expression system controlled by light and magnetic field in vivo, we generated and examined chimeric transcription factors composed of truncated form of cryptochrome, a blue light and magnetic field-responsible transcription factor, GAL4BD and VP16AD. No reactivity to blue light and magnetic field was observed for the chimeric transcription factors. 2.Main approaches of light-selective gene delivery rely on the light-dependent enhancement of transfection efficiency. Studies focused on light-stimulated inhibitory regulation of transfection have rarely been reported. Our experiments revealed that jetPRIME-mediated transfection was strongly inhibited by blue light. Partial exposure of a culture vessel to blue light resulted in selective gene delivery into cells grown on the unexposed area of the vessel. By using this approach, different types of plasmid DNA were delivered into different areas in the culture vessel.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子発現 光

1. 研究開始当初の背景

実験動物に対する遺伝子発現操作は解析を目的として盛んにおこなわれており、その手法は多様である。マウスの場合、単純なトランスジェニック、ノックアウトもしくはノックイン技術に加え、それらを組み合わせる種々の発現操作が行われる。Tet-On, Tet-Off を用いたドキシサイクリンによる誘導系は汎用される薬剤誘導系であるが、*In vivo* では遺伝子操作の対象組織を限定しづらいほか、対象組織への薬剤送達効率の良し悪しも誘導の成否を左右する。また、時期、組織特異的なプロモーター、エンハンサーを用いることで、時期、組織を限定して対象遺伝子の発現を誘導する系が汎用されている。この系は Cre-loxP システムとの組み合わせで時期、組織特異的ノックアウトや過剰発現に用いられるものの、任意の時期、組織において遺伝子発現を操作するにはいまだ十分なプロモーター、エンハンサーが揃っていない。

2. 研究の目的

既存の手法のデメリットを解消する選択肢を提案すべく、光や磁場を利用した遺伝子発現操作手法の開発に取り組む。

3. 研究の方法

(1) 転写因子 Cryptochrome (Cry) は磁気センシングを担う分子として知られている(1)。この性質を利用し、Cry と GAL4BD、VP16AD とを融合することで光、磁場依存的に活性が変化するキメラ転写因子の作出を試みる(図1)。

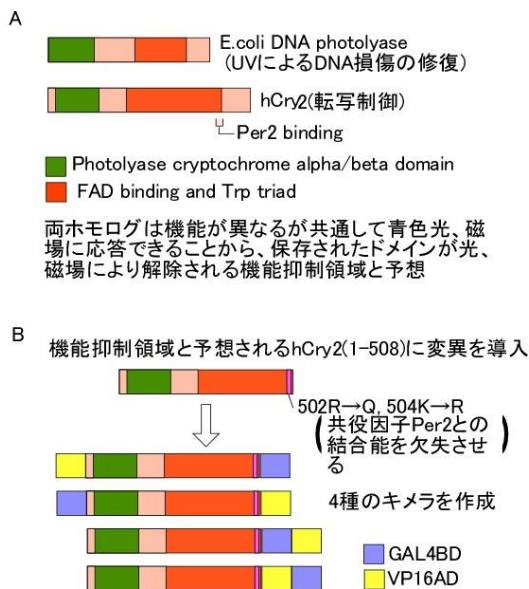


図1 (A) キメラ転写因子のコンセプト、(B) コンストラクションのストラテジー

(2) 光を利用し組織や培養細胞への遺伝子導入の効率を増強する手法は多く開発され

ているものの、不要な領域への導入を積極的に抑制する手法は開発の例が少ない。市販のトランスフェクション試薬を材料に、光による導入効率の抑制が見られるものを選出し、この性質を利用することでシャーレ内の狙った領域に存在する細胞のみに遺伝子を導入する手法を開発する。

4. 研究成果

(1) 本来の共役因子との結合を阻害すべく変異を加えた hCry2 の断片と GAL4BD、VP16AD とを融合したキメラ転写因子を4種類作成した(図1)。これらの発現ベクターと GAL4BD の結合配列である UAS の下流にレポーター遺伝子 mcherry を配したプラスミド DNA とを co-transfection し、光、磁場への応答性を検証したものの、目的にかなう応答性を持ったものは得られなかった。

(2) 複数種類の市販のトランスフェクション試薬を材料として青色光に曝露された際の導入効率に変化が生じるか検証した結果、Invitrogen 社製の LipofectamineLTX に関しては顕著な増強が、また、Polyplus 社製の JetPRIME に関しては顕著な抑制が生じることが明らかになった(図2)。

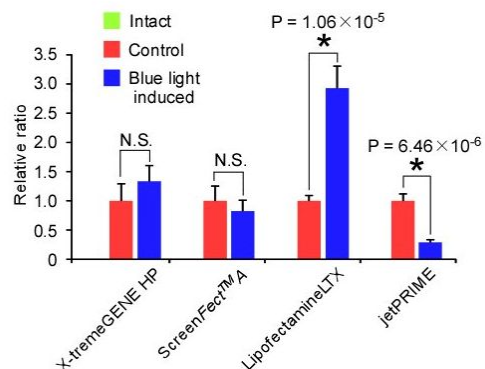


図2 市販トランスフェクション試薬による遺伝子導入効率への青色光の作用

青色光の LipofectamineLTX に対する増強効果が細胞種に依存するのに対し、JetPRIME に対する抑制効果は複数の細胞種において共通して観察され、実用に耐える可能性の高い現象であることが示された。細胞の growth や viability に影響の出ない範囲の青色光の照射で十分な抑制効果が得られ、10cm シャーレを部分的に遮光することで、青色光が当たる領域限定的に遺伝子導入を抑制出来ることが明らかとなった(図3)。また、抑制効果は青色光の強度依存的であり、この性質を利用することで、10cm シャーレ内で異なる遺伝子を異なる領域にそれぞれ導入することに成功した(図4)。光による組織や培養細胞への遺伝子導入の増強は基礎研究のみならず遺伝子治療を目的として盛んに取り組まれており、近年種々の新たな手法が開発、報告されている。標的

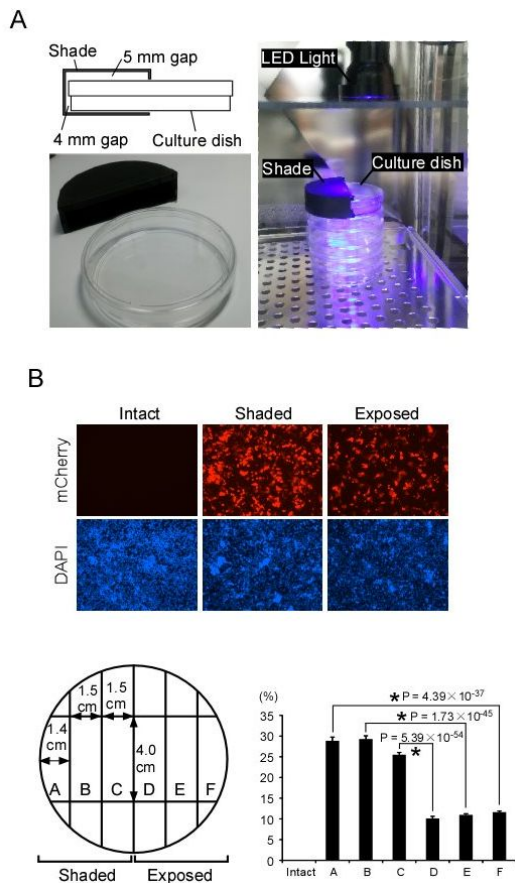


図3 青色光の抑制作用を利用したシャーレ内での選択的遺伝子導入 (A) 曝露系の概要、(B) 選択的遺伝子導入の結果

とした領域以外へのリーキーな遺伝子の導入はいずれの手法においても問題であり、これを抑える取り組みもまた近年の課題の一つである。本件において開発、報告した新規抑制手法は安価な実験材料の組み合わせのみで実施可能であり、特殊な手技も必要としない実用性の高いものである。また、青色光の波長に特異的な効果であることから、赤色光などの他波長を用いた遺伝子導入の増強手法(2)と組み合わせることで、将来的により広い応用が可能になると考えられる。

<引用文献>

- (1) Gegeer RJ, Casselman A, Waddell S, Reppert SM. Cryptochrome mediates light-dependent magnetosensitivity in *Drosophila*. *Nature*. Vol.454 2008 1014-1018
- (2) Prasmickaite, L., Högset, A., Olsen, V.M., Kaalhus, O., Mikalsen, S.-O., Berg, K., Photochemically enhanced gene transfection increases the cytotoxicity of the herpes simplex virus thymidine kinase gene combined with ganciclovir. *Cancer Gene Ther*. Vol.11, 2004, 514-523.

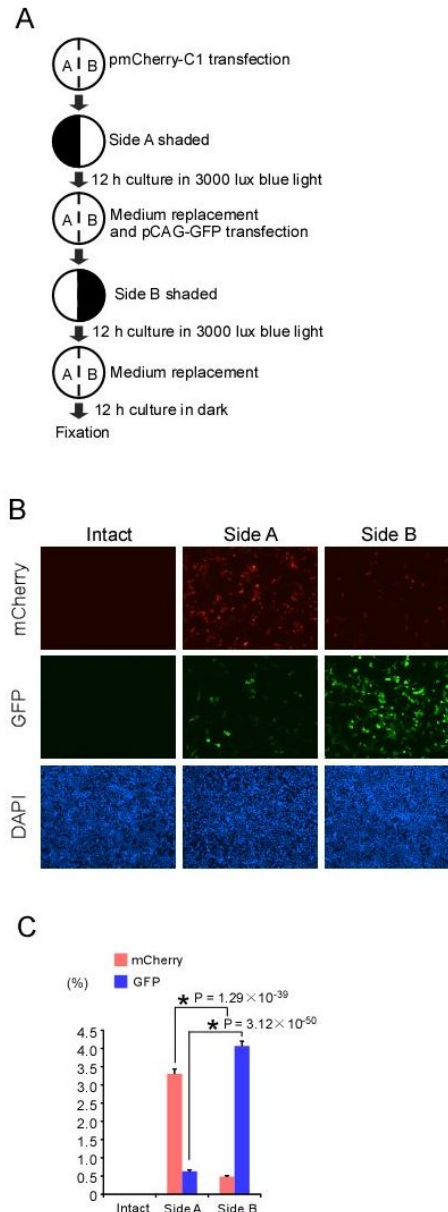


図4 mCherry発現ベクターおよびGFP発現ベクターをそれぞれシャーレ内の異なる半面 (SideA, B) に導入した例 (A) 導入手順、(B) 蛍光像、(C) 定量結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

A novel strategy for selective gene delivery by using the inhibitory effect of blue light on jetPRIME-mediated transfection. Minori Dateki, Osamu Imamura, Masaaki Arai, Hidehisa Shimizu, Kunio Takishima. *Biotechnology and Bioengineering*. 査読有 2016 Jul;113(7):1560-7, Epub 2015 Dec 30. doi: 10.1002/bit.25906.

〔学会発表〕(計 2件)

光制御可能な遺伝子発現機構の開発 伊

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

達木 穰、今村 宰、新井 仁明、瀧嶋 邦夫 2014年11月26日 第37回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜

A novel strategy of selective gene delivery in cultured cells by using inhibitory effect of blue light on transfection 伊達木 穰、今村 宰、新井 仁明、瀧嶋 邦夫 2015年12月3日 第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会 神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊達木 穰 (DATEKI Minori)

防衛医科大学校・その他部局等・助教

研究者番号：00415879