

令和元年6月14日現在

機関番号：82636

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19505

研究課題名(和文)トランスフェクション効率化のための外来DNAの核移行メカニズムの解明

研究課題名(英文)Mechanisms of nuclear entry of transfected exogenous DNAs

研究代表者

原口 徳子(Haraguchi, Tokuko)

国立研究開発法人情報通信研究機構・未来ICT研究所フロンティア創造総合研究室・主任研究員

研究者番号：20359079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、非ウイルスベクターを用いたDNAトランスフェクションの効率を飛躍的に向上させることを目的に、細胞応答の観点から外来DNAの運命を明らかにし、外来DNAが核に入るメカニズムを解明しようとするものである。このため、外来DNAの細胞内での挙動を可視化するプローブと実験系を開発した。それを用いて外来DNAの細胞内での挙動を観察したところ、細胞分裂後にはのみ、外来DNAからの遺伝子発現が観察された。独自に開発した生細胞蛍光電顕相関イメージング(Live CLEM)を用いて解析したところ、DNAが細胞核に入るのは、細胞分裂期終期での核膜形成が重要であることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子導入は、特定の遺伝子あるいはタンパク質の働きを知る上で、生命科学分野の重要な手段のひとつである。効率良い遺伝子導入を実現するためには、目的のDNAを何らかの方法で細胞の核内に入れる必要がある。非ウイルスベクターは、安全性が高いものとして基礎医学や基礎生物学で非常によく使われているが、細胞によっては遺伝子導入効率が低いという問題がある。特に、胚性幹細胞(ES細胞)などの細胞では、遺伝子導入効率が非常に低いことが問題であり、実験上の制約となっていた。本研究結果により、遺伝子が細胞核に入るのは、細胞分裂終期の核膜形成時であることが分かった。今後の試薬開発に役立つ成果である。

研究成果の概要(英文)：This study aims to elucidate the mechanism by which foreign DNA enters the nucleus when DNA plasmids are introduced into cells using non-viral vectors. To this end, we developed an experimental system to visualize the intracellular behavior of foreign DNA that has invaded the cytosol. When the behavior of the foreign DNA in the cells was observed using this experimental system, gene expression from the foreign DNA was observed only in cells that had undergone cell division. Analysis using Live CLEM (Live correlative light-electron microscopy) imaging showed that the process of nuclear envelope reformation at the end of mitosis is important for DNA to enter the nucleus.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：外来DNA トランスフェクション ドラッグデリバリー 細胞核 遺伝子発現 核膜 蛍光イメージング

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

トランスフェクションされた外来 DNA が、どのような過程を経て核に運ばれ、遺伝子発現に至るのか、その過程は解明されていない。この問題は、遺伝子デリバリーシステム開発分野での解決すべき大きな課題のひとつとなっている。外来 DNA を細胞内に入れた場合におこる一連の過程を明らかにするために、DNA を結合した微小な人工ビーズ (直径 約 3  $\mu\text{m}$ ) を細胞内に入れ、そのビーズ周辺で起こる細胞応答を可視化できる実験系を確立した (Kobayashi et al., *Autophagy*, 2010)。DNA を結合していない人工ビーズでは、エンドソームから脱出後、約 10 分で、ほぼ 100% の確率でビーズ周辺にオートファジー膜が集合する。それに対して、DNA を結合したビーズでは、エンドソーム脱出後、秒のオーダーで DNA 結合タンパク質 BAF (barrier-to-autointegration factor) が DNA に結合し、約 10 分で核膜様の膜構造 (以降“核膜”と呼ぶ) が形成され、その結果、オートファジー膜形成が抑制されることを発見した (Kobayashi et al., *PNAS*, 2015)。オートファジー膜形成に重要なタンパク質である p62 を除去した細胞では、トランスフェクション効率が大幅に上がることから (Tsuchiya et al., *FEBS Letters*, 2016)、オートファジーはトランスフェクション効率を下げ、核膜形成は効率を上げると考えられるが、その詳細なメカニズムは不明のままである。本研究は、我々のこれまでの研究成果に基づき、独自に開発した手法で、これまでブラックボックスだった細胞内での外来 DNA の挙動を解明しようとするものである。

### 2. 研究の目的

遺伝子導入は、特定の遺伝子あるいはタンパク質の働きを知る上で、生命科学分野の重要な手法のひとつである。効率良い遺伝子導入を実現するためには、目的の DNA を何らかの方法で細胞内 (とりわけ核内) に入れる必要がある。その方法として、ウイルスベクターや非ウイルスベクターが開発されている。ウイルスベクターは、高効率である点が優れているが、使える細胞種が限られることや安全性に問題がある場合がある。一方、非ウイルスベクターは、安全性が高いものとして多くのトランスフェクション試薬が開発され、基礎医学や基礎生物学で非常によく使われているが、細胞によっては遺伝子導入効率が低いという問題がある。特に、胚性幹細胞 (ES 細胞) や iPS 細胞などの細胞では、遺伝子導入効率が非常に低いことが問題であり、実験を行う上での制約となっている。また、分裂性細胞 (細胞分裂期に核膜崩壊する細胞) でしか有効でないことが経験的に分かっているが、その理由は不明のままである。また、トランスフェクション過程での外来 DNA の挙動や、細胞応答についての知見はほとんどなく、試薬開発などの応用面での大きな問題となっている。本研究は、細胞応答の観点から、トランスフェクション過程での外来 DNA の挙動を明らかにし、細胞内に侵入した外来 DNA が核に入るメカニズムを解明しようとするものである。

### 3. 研究の方法

トランスフェクション試薬を使って導入された外来 DNA が、どのような運命を辿って核内に入るかを知るために、まず、導入直後の外来 DNA の挙動を可視化する。すでに、非リポソーム系脂質のトランスフェクション試薬を使った場合には、マクロピノサイトーシスというメカニズムで細胞内に入ることを明らかにしている (Kobayashi et al., 2010)。酸性エンドソームから細胞質内に入った瞬間を可視化する方法として pHrodo を用いる。pHrodo は、酸性条件では蛍光性の物質で、エンドソーム内では赤色の蛍光を発するが、エンドソームが破れ細胞質に出ると (中性になるため) 無蛍光となる。この性質を利用して、トランスフェクション試薬と混合した DNA に pHrodo を混在させることによって、エンドソームから細胞質への脱出を可視化する。さらに、それに加えて、LacI-GFP/*lacO* システムを利用して、外来 DNA の細胞内での運命を可視化する。このシステムは、LacI タンパク質が DNA の *lacO* 配列に結合する性質を利用したもので、LacI-GFP タンパク質が *lacO* 配列 (256 回リピートしたもの) を持つ目的 DNA (*lacO-RFP*) に結合することで、目的 DNA を可視化できる。LacI-GFP は、*lacO-RFP* が無い場合は、細胞全体に広がって分布するが、*lacO-RFP* が存在すると、*lacO* 配列に結合し、ひときわ明るい輝点として観察することができる。

### 4. 研究成果

主に、以下の 3 項目の研究を実施した。

(1) 導入直後の間期細胞での挙動の解析: トランスフェクション試薬を使って導入された外来 DNA が細胞質内に入った後、何が起こるかを可視化した。エンドソームに入った瞬間を可視化する方法として pHrodo (酸性で蛍光、中性で無蛍光) を利用した。オートファジー膜形成に重要なタンパク質である p62 を除去した細胞では、トランスフェクション効率が大幅に上がることから (Tsuchiya et al., *FEBS Letters*, 2016)、そのメカニズムを検討した。エンドソームが破裂し細胞質内に入った DNA を模倣するものとして人工ビーズを用いた。pHrodo を結合した人工ビーズが、細胞内に入った瞬間をモニターし、p62 がオートファジー膜形成に及ぼす影響を検討したところ、p62 は、破れたエンドソーム膜のユビキチン化を促進することでオートファジー膜形成を促進することを発見した (Tsuchiya et al., *FEBS Open Bio*, 2018)。その時、特定アミノ酸残基 (マウスでは 405 番目のセリン) がリン酸化された p62 が必要であることが分かった。この結果は、細胞内に入った直後に起こるオートファジーを抑制することが、トランス

フェクション効率を上げるのに重要であることを示している。次に、外来 DNA 自身を可視化するために GFP-LacI/lacO システムを利用した。GFP-LacI を恒常的に発現する細胞株を作製し、その細胞に lacO 配列 (256 リピート) を持つ外来 DNA (lacO-RFP) を導入した。lacO 配列に結合した GFP-LacI の蛍光を、蛍光顕微鏡を用いて観察することで、目的の外来 DNA の位置を生きた細胞で可視化することに成功した。

(2) 細胞分裂期での挙動の解析: 上述した GFP-LacI/lacO-RFP のシステムを用いて、細胞分裂期での外来 DNA の挙動を生きた細胞で可視化した。この DNA (lacO-RFP) は、核内に移行すると、赤色蛍光タンパク質 (RFP) が発現するように設計してある。従って、RFP の蛍光を観察することで、DNA の核移行の時期を推定することができる。トランスフェクション直後からタンパク質が発現するまでの経過を生きた細胞で観察したところ、タンパク質が発現してくるのは、必ず細胞分裂後であることが実験的に確かめられた (図 1)。また、早い細胞では、タンパク質発現は分裂後 1 時間程度で見られることから、外来 DNA が細胞核に入るのは、細胞分裂期終期 (telophase) であることが示唆された。

(3) 核移行メカニズムの解明: 外来 DNA を核内に入れる効率を上げるために、どのような条件で核移行が起こるかを調べた。GFP-LacI/lacO-RFP のシステムを用いて、外来 DNA の分裂期での挙動を、生きた細胞で蛍光観察したところ、細胞分裂期での、DNA の挙動が重要であることが分かった。この結果は、核膜が再形成されるときに DNA が核内に取り込まれることを示唆している。

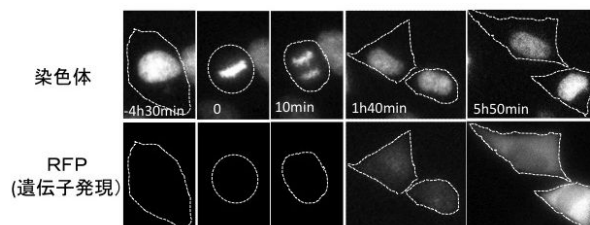


図 1 外来DNAからの遺伝子発現は細胞分裂後のみ起こる

細胞分裂期での、DNA の挙動が重要であることが分かった。この結果は、核膜が再形成されるときに DNA が核内に取り込まれることを示唆している。

## 5 . 主な発表論文等

### [雑誌論文](計4件)

Bilir Ş, Kojidani T, Mori C, Osakada H, Kobayashi S, Koujin T, Hiraoka Y, Haraguchi T. Roles of Nup133, Nup153, and membrane fenestrations in assembly of the nuclear pore complex at the end of mitosis. *Genes to Cells*, 査読有り、2019, doi: 10.1111/gtc.12677. doi: 10.1111/gtc.12677

Matsuda A, Schermelleh L, Hirano Y, Haraguchi T, Hiraoka Y. Accurate and fiducial-marker-free correction for three-dimensional chromatic shift in biological fluorescence microscopy. *Scientific Reports*, 査読有り、2018, 8(1):7583. doi: 10.1038/s41598-018-25922-7.

Itoh G, Ikeda M, Iemura K, Amin MA, Kuriyama S, Tanaka M, Mizuno N, Osakada H, Haraguchi T, Tanaka K. Lateral attachment of kinetochores to microtubules is enriched in prometaphase rosette and facilitates chromosome alignment and bi-orientation establishment. *Scientific Reports*, 2018, 査読有り、8(1):3888. doi:10.1038/s41598-018-22164-5.

Tsuchiya M, Ogawa H, Koujin T, Mori C, Osakada H, Kobayashi S, Hiraoka Y, Haraguchi T. (2018) p62/SQSTM1 promotes rapid ubiquitin conjugation to target proteins after endosome rupture during xenophagy. *FEBS Open Bio*, 査読有り、8(3):470-480. 2018, doi:10.1002/2211-5463.12385.

### [学会発表](計18件)

原口徳子、荒神尚子、小坂田裕子、森 知栄、小林昇平、有吉哲郎、岡田康志、平岡泰、トランスフェクションで導入された外来 DNA の細胞内動態、第 36 回染色体ワークショップ、第 17 回 核ダイナミクス研究会、2019.1.23-25

小林 昇平、荒神 尚子、糀谷 知子、小坂田 裕子、森 知栄、平岡 泰、原口徳子 生細胞内導入ピーズを用いた構成的アプローチによる核膜形成機構の解析、第 41 回日本分子生物学会年会、2018.11.28-30

Sukriye Bilir, Shouhei Kobayashi, Takako Koujin, Chie Mori, Hiroko Osakada, Tomoko Kojidani, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi. A role of Nup133 and Nup153 on the post-mitotic nuclear pore complex formation. 第 41 回日本分子生物学会年会 2018.11.28-30

土屋 恵、小川 英知、渡邊 賢人、荒神 尚子、小林 昇平、森 知栄、小坂田 裕子、平岡 泰、原口徳子 オートファジーレセプター p62/SQSTM1 を標的とした効果的な遺伝子導入法の確立、第 41 回日本分子生物学会年会 2018.11.28-30

小林昇平、荒神尚子、糀谷知子、小坂田裕子、森知栄、平岡泰、原口徳子、生細胞内導入ピーズを足場とする核膜再構成系の構築、「細胞を創る」研究会 2018.10.18-19

Hidesato Ogawa, Megumi Tsuchiya, Takako Koujin, Chie Mori, Hiroko Osakada, Shouhei Kobayashi, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi. Depletion of autophagy receptor p62/SQSTM1 enhances the efficiency of gene delivery in mammalian cells. Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70<sup>th</sup> (2018.6.7, 6.8)

Shouhei Kobayashi, Takako Koujin, Tomoko Kojidani, Hiroko Osakada, Chie Mori, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi. Assembly of nuclear envelope-like structures around artificial beads in living cells. Joint Annual Meeting of JSDB 51st and JSCB 70<sup>th</sup> (2018.6.6)

Shouhei Kobayashi, Takako Koujin, Hiroko Osakada, Tomoko Kojidani, Chie Mori, Yasushi Hiraoka, Tokuko Haraguchi. Bead-induced nuclear envelope assembly in the living cell. EMBO | EMBL Symposia 2018(2018.9.6)

小林昇平、荒神尚子、糀谷知子、小坂田裕子、森知栄、佐橋律子、土屋恵、小川英知、平岡泰、原口徳子、生細胞内導入ビーズをプローブとした外来 DNA の細胞内運命の可視化 第 26 回 バイオイメージング学会学術集会、東京薬科大学

Tokuko Haraguchi, Takako Koujin, Hiroko Osakada, Tomoko Kojidani, Shouhei Kobayashi, Hiroshi Masumoto, Yasushi Hiraoka. Roles of the nuclear envelope on formation and maintenance of the micronucleus in cancer cells. 第 76 回日本癌学会学術総会 (2017.9.28-30)

原口徳子、小林昇平、Sukriye Bilir、荒神尚子、小坂田裕子、糀谷知子、森知栄、佐橋律子、平岡泰. 人工ビーズを使ったヒト細胞内での人工核の構築、第 40 回日本分子生物学会年会 (2017.12.8)、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市) 開催期間 2017.12.6-9

小林昇平、荒神尚子、糀谷知子、小坂田裕子、森知栄、佐橋律子、平岡泰、原口徳子 生細胞内に導入した人工ビーズの周辺で起こる核膜形成過程の解析、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017.12.6-9.

小川英知、土屋恵、荒神尚子、森知栄、小坂田裕子、小林昇平、平岡泰、原口徳子 オートファジーレセプター p62/SQSTM1 の調節による効果的な遺伝子導入法の確立とその分子機構の解明、第 40 回日本分子生物学会年会、2017 年度 生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017.12.6-9

小林昇平、荒神尚子、糀谷知子、小坂田裕子、森知栄、佐橋律子、土屋恵、小川英知、平岡泰、原口徳子 DNA ビーズを可視化プローブとした外来 DNA の細胞内動態の解明、第 66 回 高分子討論会、愛媛大学 城北キャンパス (愛媛県松山市) 2017.9.20-22

小林昇平、荒神尚子、糀谷知子、小坂田裕子、森知栄、佐橋律子、平岡泰、原口徳子 生細胞内導入ビーズをプローブとした外来物質の細胞内運命解析、第九回光塾、山口大学 吉田キャンパス 2017.9.5-6

小川英知、土屋恵、荒神尚子、小林昇平、森知栄、平岡泰、原口徳子 オートファジーレセプター-p62/SQSTM1 の細胞内タンパク質量の調節による効果的な遺伝子導入法の確立とその分子機構、第 69 回日本細胞生物学会大、2017.06.13-06.15

小林昇平、荒神尚子、糀谷知子、小坂田裕子、森知栄、平岡泰、原口徳子、生細胞内導入ビーズを用いた外来 DNA センシング機構の解析、第 17 回遺伝子・デリバリー 研究会シンポジウム

原口徳子、小林昇平、荒神尚子、糀谷知子、小坂田裕子、森知栄、平岡泰 オートファジーレセプター-p62 の除去は遺伝子導入効率を上げる、第 17 回遺伝子・デリバリー 研究会シンポジウム

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 1 件)

名称：色収差補正方法

発明者：松田厚志、原口徳子

権利者：独立行政法人 情報通信研究機構

種類：特許

番号：第 6396072 号

取得年：平成 30 年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等：<http://www2.nict.go.jp/frontier/seibutsu/CellMagic/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者：なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：荒神 尚子  
ローマ字氏名：(KOUJIN, Takako)

研究協力者氏名：森 知栄  
ローマ字氏名：(MORI, Chie)

研究協力者氏名：小坂田 裕子  
ローマ字氏名：(OSAKADA, Hiroko)