

動物細胞で作動する温熱応答型遺伝子発現システムの開発

上平 正道*・井藤 彰

動物細胞における外来遺伝子の発現ユニットは、単純には、転写プロモーター、目的遺伝子およびポリA付加シグナルの各配列を直列につなぐことで構成される。外来遺伝子の発現調節を行いたいときには、今でも生物由来の既存のプロモーターの選択によって行われる場合が多い。これまでに、塩基配列解析や遺伝子の機能解析による塩基配列やタンパク質において機能的な最小単位（機能モジュール）の同定がされており、膨大な知見の蓄積ができています。こういった機能モジュールに関する知見の蓄積によって、機能モジュールの組合せによる再構成的なアプローチ、すなわち、人工的にデザインしたものを細胞内で機能させることが可能となっている。今では、生物における再構成的なアプローチが合成生物学の学問分野として認知されるようになった。合成生物学は、生物機能の設計、改変、創出に関するすべての科学・工学分野を包含しており、合成生物学の究極的な目標は、“モノ”から“生きもの”を創出することであると考えられる¹⁾。遺伝子工学分野での合成生物学的アプローチは、発現ユニットの設計から、それらを組み合わせた遺伝子回路・代謝経路の設計、ゲノム設計および遺伝子をベースとした細胞機能のデザインということになる。遺伝子に関する各材料・部品から統合したもので合成生物学的アプローチが可能である。外来遺伝子の発現調節を伴う遺伝子発現ユニットの設計でも、機能モジュールの再構成による手法を用いることができる(図1)。機能モジュールとして、システムのスイッチや発現量制御のためのプロモーター/エンハンサー、リプレッサー/トランスアクチベーター、インスレーター、内部リボソーム

結合領域 (IRES) などのポリシストロニックな発現のための配列因子、人工イントロン、mRNA安定化/不安定化配列などが利用できる。転写レベルでの調節だけでなく、翻訳後のプロセッシング、たとえば、プロテアーゼによる分解やユビキチン化などの修飾による分解制御を利用することによって生産調節することも可能である。また、外来遺伝子発現ユニットを細胞に導入して発現調節を行わせる際に、細胞がもともと有している転写調節機構を利用するだけでなく、転写を活性化するための人工トランスアクチベーターシステムも開発されている。これは特異的なDNA配列を認識するタンパク質を利用して転写活性化タンパク質との融合タンパク質とすることで目的遺伝子発現を内在の発現調節と独立して働かせるもので、代表的なものに大腸菌のTetタンパク質とその認識配列*tetO*や、酵母のGal4タンパク質とその認識配列*UAS*を利用するものがあり、動物細胞でも利用されている。動物細胞においても、複数の遺伝子発現ユニットを相互作用させることで遺伝子回路として設計し、電気回路の論理回路に相当する遺伝子発現調節系を作る試みもなされている。複数の遺伝子発現ユニットが相互作用する場合には、それぞれの遺伝子発現ユニットからの発現量の調節が必要となる。また、ゲノムに組み込んで機能させる必要がある場合は、導入ゲノム部位の周囲環境や発現ユニットの配置方法も考慮すべき問題となる。これらにより、電気回路と異なり、設計段階において細胞内で正しく機能することを保証するのは困難であり、試行錯誤によるチューニングが必須となる。

本稿では、再構成的なアプローチによる人工的な外来遺伝子発現システムの構築例として、我々が開発した温熱応答型遺伝子発現システムを中心に述べる。

薬剤誘導型遺伝子発現システム

動物細胞における人工的な外来遺伝子発現システムとして、先駆的かつ有用な薬剤誘導型の遺伝子発現システムにTetシステム（タカラバイオ）がある。このシステムは、大腸菌のテトラサイクリン耐性遺伝子のオペロン由来のTetリプレッサータンパク質とその結合塩基配列(*tetO*)を基にしており、Tetリプレッサーと転写活性化ドメイン (VP16) のキメラタンパク質を転写活性化因

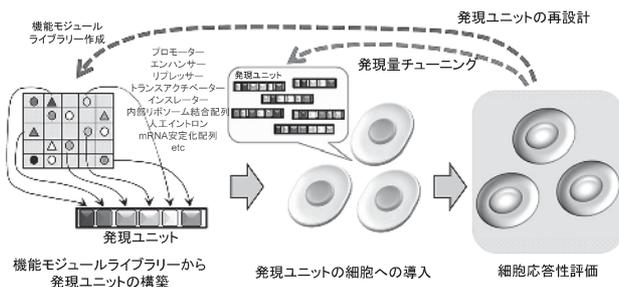


図1. 機能モジュールの再構成による遺伝子発現ユニットの構築

*著者紹介 九州大学大学院工学研究院 (教授) E-mail: kamihira@chem-eng.kyushu-u.ac.jp

子として用いる人工トランスアクチベーターシステムである。Tetリプレッサータンパク質はテトラサイクリン系抗生物質（通常はドキシサイクリン [Dox] が用いられる）と結合すると構造変化によって応答塩基配列 (TRE) との結合性が変化するため、TREのすぐ下流に最小プロモーターを配置すると、Doxの添加/非添加によって人工トランスアクチベーターのTREへの結合を制御することによってプロモーター下流の目的遺伝子の発現を誘導することができる (図2上)。Tetシステムでは、基本的に人工トランスアクチベーター (TA) タンパク質を細胞内で発現しておく必要があり、そのためにTAの発現ユニットを目的遺伝子の発現ユニットとは別に構成して、常時発現させておく場合が多い。そして誘導薬剤の添加の有無でTAの活性化により目的遺伝子発現を誘導する。もともとはDox添加によりTREとの結合が消失することにより目的遺伝子発現をオフにするシステムとして開発されたが (Tet-Off), 変異Tetリプレッサーの開発によりDox添加により発現誘導するシステム (Tet-On) も利用できるようになっている。

上記のTetシステムによる人工の遺伝子発現誘導システムは、細胞がもともと持っている遺伝子発現調節とは独立して、単に薬剤の添加/非添加によって導入遺伝子発現の誘導を行うことができるため、遺伝子機能解析のツールとして基礎生物学の分野で繁用されている。我々もこのシステムを用いた実用的な細胞構築として、人工肝臓システムや薬剤スクリーニングに利用するために、ヘパトーマ細胞に肝細胞において肝機能発現を調節している8つの肝特異的転写因子遺伝子をDox添加によって同時に誘導発現できる細胞を作製した²⁾。この細胞では、

Dox非添加ではヘパトーマとして通常の培養培地で旺盛に増殖させることができるが、Dox添加による8つ肝特異的転写因子の過剰発現により、増殖が停止するとともに肝分化時にみられる形態変化を引き起こし、生体内肝細胞に匹敵する肝機能発現を誘導することができる。

Tetシステムは薬剤添加によって好みのタイミング (時間的な制御) で外来遺伝子を発現させることができるシステムであるが、空間的な制御あるいは量的な制御については考慮されていない。我々は、Tetシステムのような人工的な転写誘導システムをベースに時間的、空間的および量的制御ができる遺伝子発現システムの開発を行っている。

温熱誘導型発現システムの開発

遺伝子治療や動物細胞による物質生産などへの応用においても精緻な発現制御を伴う遺伝子発現システムの開発が必要となっている。我々は、このために組織特異的あるいは環境因子に反応して自律的に大量遺伝子発現を誘導するためのシステムを開発してきた。組織特異的あるいは環境因子に反応する発現システムを構成する際に、単純には、元来生物が有している機能の利用として、それに対応する組織あるいは環境因子によって特異的に発現しているタンパク質のプロモーター領域を利用することが考えられる。しかし、生物が独自に進化させた発現ユニットは細胞内でそのタンパク質発現のために構成が最適化されているので、発現させるタンパク質を変えて人工的な発現ユニットとして再構成する場合には、高発現にならなかったり、制御領域全体を利用するとかなり長大な領域を必要とすることがある。また、このアプローチでは一般性をもって発現ユニットを設計することは困難である。我々は、単純化された機能モジュールの組合せによる発現ユニットの再構成という考えに基づいて、発現をオンにする機能 (スイッチ) と発現量を増大させる機能 (アンプ) を分けて、それらを組み合わせることによって大量発現を誘導するシステムの開発を行った。具体的な応用として、温熱誘導型の遺伝子発現システムの例を示す³⁾。温熱誘導のような環境因子刺激応答型のシステムでは、時間的、空間的発現制御が可能となる。ここでは、アンプ機能にTetトランスアクチベーターシステムを利用することとし、温熱誘導できるヒートショックプロテイン (HSP70B') プロモーターの機能領域 (456 bp) を同定して、これをスイッチとして、Tetシステムでの目的遺伝子発現のためのTRE下流の最小プロモーターの代わりに用いた (図2下)³⁾。このようなHSPプロモーターを用いたシステムでは43–45°Cの

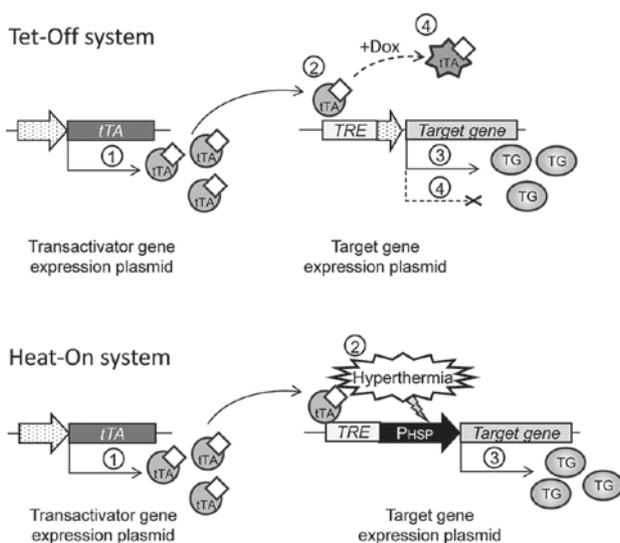


図2. Tet-OffシステムとHeat-Onシステム

温熱刺激によって、ヒートショックファクター (HSF) が細胞質から核へ移行し、HSPプロモーター上のヒートショックエレメント (HSE) へ結合することによって下流遺伝子の転写が開始される。HSP70B'プロモーターは比較的厳密に誘導されるプロモーターであるが、転写活性は高発現ウイルスプロモーターと比べるとあまり高くない。この発現誘導システムでは、転写活性型TAを細胞内で恒常的に発現させておくと、温熱の有無により発現を誘導できるHeat-Onシステムとなった。転写活性型TAが存在しても温熱誘導がかからない場合には、目的遺伝子の転写はほとんどおこらず、温熱によりHSFが転写をオンにすると、HSFよりも強い転写活性を持つTAによりHSPプロモーター単独より目的遺伝子の高い発現が誘導された。温熱刺激は長時間かけると細胞に対してダメージとなるので、基本的に一過的な刺激を加えることになる。そのため、この温熱応答型遺伝子誘導システムでは、温熱刺激によって誘導された目的遺伝子発現は持続せず速やかに低下した。物質生産への応用では、一回の温熱刺激により持続的な目的遺伝子の大量発現が誘導されるのが望ましい場合が多い。これを実現するため、上記の温熱誘導型遺伝子発現システムの機能モジュールの配置構成を変えたシステムを開発した(図3上)⁴⁾。このシステムでは、HSPプロモーターをTAの発現制御に用いることとし、HSPプロモーターの直下流に最小プロモーター領域をとまなうTREを配置した。これにより、まず温熱刺激により転写活性型TAの発現誘導がおこり(①)、生産された転写活性型TAは目的遺伝子の発現誘導も行うが、HSPプロモーター下流のTREにも結合しポジティブフィードバック的に自身の発現を増強することによって持続的に転写活性型TAが生産される(②)。これにより、目的遺伝子の大量発現が持続的に誘導されることになる(③)。いままで

解説したシステムでは、TAを転写活性化に利用するため、目的遺伝子とTAの2つの発現ユニットが必要である。温熱誘導でかつ持続型の発現システムにおいて、IRESを用いたバイストロニックな発現システムを取り入れることで、システムを1つの発現ユニットにまとめたワンパックシステムとすることができる(図3下)⁴⁾。ワンパックシステムでは、温熱誘導により目的遺伝子とTAの両方のタンパク質の同時生産がIRESにより行われ、生産されたTAにより、HSPプロモーター下流のTREに結合しポジティブフィードバック的に目的遺伝子とTA生産を持続的に誘導する。これらの遺伝子発現システムを作製して、目的遺伝子としてレポーター遺伝子を用いて細胞に導入し、43°Cに1時間晒した後に導入レポーター遺伝子の発現挙動を解析したところ、温熱刺激により発現が誘導され、TA生産のポジティブフィードバックループによる目的遺伝子の発現増強も観察された。温熱誘導型遺伝子発現システムを開発することができたので、本システムを用いたがん温熱療法における遺伝子治療への応用について検討した。

温熱誘導型発現システムの遺伝子治療への応用⁵⁾

一般にがん細胞は正常組織の細胞に比べて熱に弱い性質を持つため、熱を利用してがん細胞を殺す、温熱療法が行われている。がん組織は42°C以上で傷害を受けるとされ、その温度まで加温することで熱によりがん細胞を物理的に殺すことが可能となる。温熱療法の治療効果としては、熱でがん細胞を物理的に殺すほかに、がん免疫を増強する効果があることが分かっている。一方で、腫瘍組織だけを局所的に加温することは容易ではなく、正常細胞までも傷つけるおそれがあり、温熱治療の問題点となっている。生体内での局所加温の方法として、交流磁場中で発熱する磁性ナノ粒子をドラッグデリバリーシステムによって腫瘍部位に送達し、磁場照射を行うことで腫瘍部位だけを加温する治療法の研究が行われている。しかし、温熱療法だけでがん組織を消滅させることは困難な場合もあり、放射線療法、化学療法、免疫療法といった他の治療法との併用も行われる。ここでは、先に述べた温熱誘導型遺伝子発現システムを、温熱療法との併用効果を狙ったがんの遺伝子治療における治療遺伝子発現システムとして利用する可能性について検証を行った。

まず*in vitro*で評価するために治療遺伝子として単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子を温熱誘導型遺伝子発現システムの目的遺伝子として導入した。HSV-TKは、抗ウイルス薬として使わ

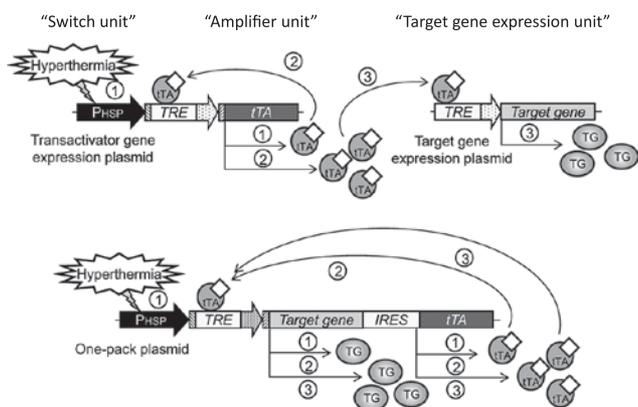


図3. 持続発現型Heat-Onシステム

れているプロドラッグであるガンシクロビル (GCV) に作用して、DNA合成阻害を引き起こす毒性物質に変換することで殺細胞作用を発揮する。HSV-TK発現細胞はGCV投与で特異的に殺されることから、がん遺伝子治療の治療遺伝子候補として用いられている。がん細胞のモデルとしてHeLa細胞に、HSV-TK遺伝子を発現する温熱誘導型遺伝子発現システムが搭載されたプラスミドを導入し、43°C、30分間加温の有無により、種々のGCV濃度下での培養において、その後の細胞生存率の変化を測定した(図4)。加温を行わなかった条件では、10 mg/mL以上の高濃度のGCVにより細胞死が観察されたが、それ以下の濃度では細胞死は認められなかった。今回の条件では、加温だけではあまり殺細胞効果はみられなかった。一方、治療プラスミドを導入し、43°Cの加温を行った条件では、臨床で応用できるGCV濃度範囲で、温熱による遺伝子発現の効果により顕著に高い殺細胞効果が得られた。また、Doxを添加した後に加温を行った条件では、TAのポジティブフィードバック効果がキャンセルされるため、殺細胞効果が抑制された。これらの結果より、我々が構築した温熱誘導型で転写のポジティブフィードバックループを含む遺伝子発現システムは、温熱により治療遺伝子が誘導発現され、ポジティブフィードバックループにより発現増強されることで、GCVによる殺細胞に顕著な効果があることがわかった。次に、担癌モデルマウスを使って*in vivo*での効果を検証した。*In vivo*での実験では局所加温を行う必要があるため、加温は、磁性ナノ粒子に磁場照射することによって行うことにした。また治療用遺伝子としては、TNF- α 遺伝子を用いた。A549細胞をマウスに移植し、

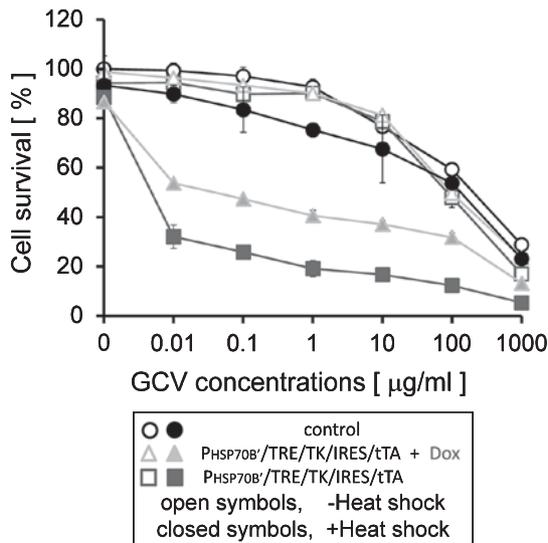


図4. 温熱誘導型遺伝子発現システムの細胞での評価

その後がん組織に治療用プラスミドをカチオニックリポソームとともに注入した(図5)。24時間後に磁性ナノ粒子(マグネタイトカチオニックリポソーム)をがん組織に注入した。磁性ナノ粒子の注入から24時間後に交流磁場照射により腫瘍表面が30分間43°Cになるように維持した。その後、腫瘍組織でのTNF- α 生産量と経時的なマウス内での腫瘍体積の変化を測定した(図6)。その結果、磁場照射によって腫瘍組織内でTNF- α の生産が誘導された。転写のポジティブフィードバックループを組み込んだものは、ないものに比べて腫瘍組織内の

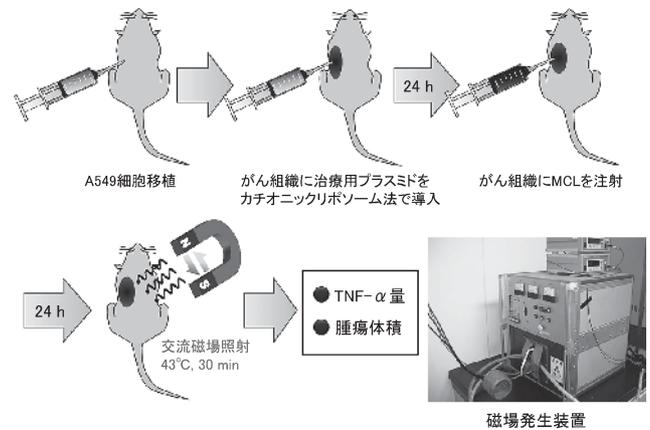


図5. 担癌モデルマウスを使った温熱遺伝子治療の実験スキーム

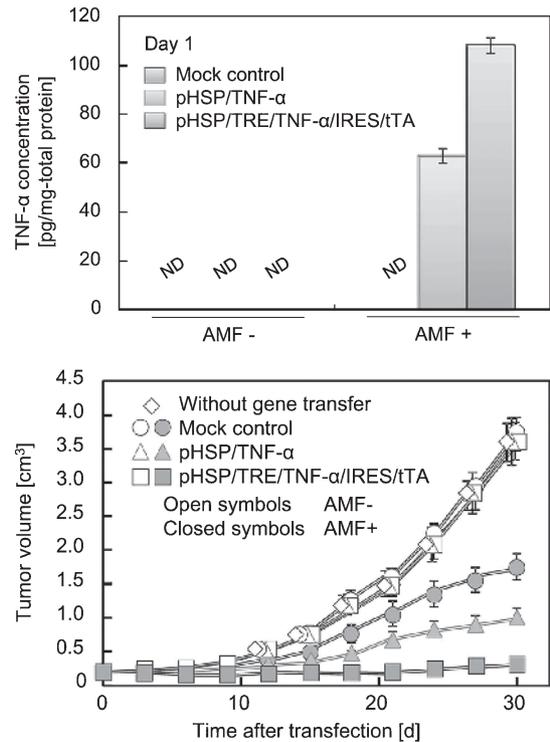


図6. 温熱遺伝子治療の治療効果の検証。腫瘍組織でのTNF- α 生産量(上)と経時的な腫瘍体積の変化(下)

TNF- α 生産量も高くなった。腫瘍体積に関しても、遺伝子導入の有無にかかわらず磁場照射による温熱治療処理をしなかったマウスでは腫瘍体積の著しい増大が観察されたのに対して、磁場照射による温熱処理によって腫瘍体積の増大を抑えることができ、転写のポジティブフィードバックループを含む温熱誘導型TNF- α 発現プラスミドを導入したマウスでは、腫瘍体積の増大がほとんど見られなく、本システムによる温熱遺伝子治療の有効性を確認することができた。

このように、本システムは温熱誘導型の遺伝子発現システムであるが、磁性ナノ粒子との併用によって磁場誘導型の遺伝子発現システムとして利用できる。磁性ナノ粒子を細胞内に取り込ませると、磁場照射による細胞内の局所的な加温によっても遺伝子発現誘導が可能であることがわかっている。この場合は、周囲の環境の温度上昇はほとんど観察されないことから、磁性ナノ粒子を含んだ細胞と含んでいない細胞で磁場照射による厳密な遺伝子発現制御が可能であると考えられる。

おわりに

温熱誘導型遺伝子発現システムの開発と遺伝子治療への応用について解説したが、本システムでは、発現誘導のスイッチとなるプロモーターを置き換えることで、汎用的な大量遺伝子発現システムとして利用することが可

能である。プロモーターとして卵白タンパク質オボアルブミンのネガティブコントロール領域を含む最小プロモーターを用いて、トランスジェニックニワトリでの輸卵管組織特異的な医薬品タンパク質の大量生産のための遺伝子発現システムを開発した⁶⁾。また、p53プロモーターを用いることでDNA損傷を及ぼす薬剤などのスクリーニングに利用可能な細胞センサー構築のための遺伝子発現システムの開発も行っている⁷⁾。最近では、酸素濃度感受性プロモーターを用いて、さらに人工トランスアクチベーターにも酸素濃度によって分解機能を持たせることによって厳密な誘導制御を可能とした、組織内の酸素濃度検知に利用できる細胞センサーのための遺伝子発現システムを開発している⁸⁾。さらに改良を進めることによって、これらの遺伝子発現システムが実際の応用に使われるようになることを期待したい。

文 献

- 1) Marner, W. D.: *Biotechnol. J.*, **4**, 1406 (2009).
- 2) Yamamoto, H. *et al.*: *Biochem. Eng. J.*, **60**, 67 (2012).
- 3) Ito, A. *et al.*: *Int. J. Hyperthermia*, **28**, 788 (2012).
- 4) Yamaguchi, M. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **114**, 460 (2012).
- 5) Yamaguchi, M. *et al.*: *ACS Synth. Biol.*, **3**, 273 (2014).
- 6) 小畑玲奈ら: 日本生物工学会第67回大会, 3P-238 (2015).
- 7) Ono, A. *et al.*: *J. Biosci. Bioeng.*, **120**, 463 (2015).
- 8) 小野章彦ら: 日本生物工学会第67回大会, 3P-233 (2015).