

論文の内容の要旨

論文題目 Intranuclear FRET analysis of plasmid DNA
 conformational change in non-viral gene carriers

和訳 人工遺伝子キャリアの細胞核内における
 プラスミドDNA構造変化のFRET分析

指導教員 山嵜達也教授

 東京大学大学院医学系研究科

 平成17年4月入学

 医学博士課程

 外科学専攻

 松本 有

人工遺伝子キャリアを臨床に応用するためには、遺伝子導入効率の改善は不可欠である。人工遺伝子キャリアにはカチオニックポリマーとカチオニックリピッドなどがあり、一般的に正電荷を持つ塩基性の化合物である。これらは負に帯電した遺伝子と静電相互作用によって安定な複合体(ポリプレックス、リポプレックス)を形成する。

外来遺伝子が発現するまでには幾つかの障壁がある。すなわちエンドサイトーシスによる細胞内取込、エンドソーム脱出、細胞内輸送、核移行、転写である。これらのうち、遺伝子発現を調節する最大の因子は転写の開始である。

本研究では蛍光蛋白質Keima-RedをコードするプラスミドDNAを2つの蛍光物質FluoresceinとCy3で標識し、FRETを用いてDNAの凝縮・脱凝縮を計測した。プラスミドDNAがカチオン性高分子と複合体を形成していると、DNAは凝縮しているために2つの蛍光分子は物理的に接近しFRETを起こす。逆に複合体が完全あるいは部分的に分解するとプラスミドDNAは脱凝縮しFRETは弱くなる。一般的にプラスミドDNAを蛍光標識すると遺伝子発現能は失われるものが多いが、申請者は遺伝子発現能を保持する蛍光標識試薬を使用し、DNAの凝縮・脱凝縮とその発現を同時に追跡することに成功した。

代表的な市販遺伝子導入試薬であるpolyethylenimineとLipofectAMINE 2000を用いてHuh-7へトランスフェクションを行った。スペクトル分光型共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて経時的に観察すると、細胞内取込・核移行という位置的な情報だけでなく、FRET解析による遺伝子の凝縮・脱凝縮の情報が得られた。遺伝子凝縮の程度はスペクトル演算により定量化した。

2つのキャリアの細胞内輸送には相違があったが、いずれもキャリアが核へ到達後、Keima-Red遺伝子の発現が観察された。遺伝子発現細胞・非発現細胞に分けて解析を行うと、核内における遺伝子の脱凝縮が遺伝子発現と強く相関することが判明した。遺伝子発現に必要な遺伝子脱凝縮状態は、2つのキャリアでほぼ一致し、導入された遺伝子が核内での転写に至るには共通のプロセスが存在することが示唆された。ポリプレックスでは核移行後の遺伝子脱凝縮が遺伝子発現の律速段階であったのに対して、リポプレックスは核移行そのものが律速となっていた。

外来遺伝子であるプラスミドDNAを用いて、カチオン性高分子と解離し脱凝縮することが宿主細胞の転写プロセスを利用するために重要であることを、共焦点レーザー走査型スペクトル顕微鏡を用いてはじめて直接的に示した。

本手法により、外来遺伝子導入後の核内での脱凝縮とその発現に至る過程を細胞内でin situに観察した。細胞内メカニズムの解明を通じて、新規遺伝子キャリア開発に有用な知見をもたらすことが期待される。