

審査の結果の要旨

氏名 松 本 有

本研究は人工遺伝子キャリアを用いた遺伝子導入において、細胞内、特に細胞核内における外来遺伝子(プラスミド DNA)の挙動を解析したものである。構造変化と遺伝子発現との相関を明らかにするため、スペクトル分光型共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて遺伝子発現の検出とプラスミド DNA の凝縮・脱凝縮の計測を同時に行い、下記の結果を得ている。

1. 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。

2. 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 ヘ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。

3. 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。

以上、本論文は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、学位の授与に値するもの

と考えられる。