



外来核酸が細胞内でどのような運命をたどるかを解明 —細胞の外来遺伝子に対する防御のしくみを可視化—

研究成果のポイント

- ・1分子蛍光イメージング技術で生きた細胞内に導入された核酸の運命を解明。
- ・外来遺伝子発現に対する防御機構、核酸分解活性が細胞種によって異なることを発見。
- ・核酸医薬・遺伝子治療の分子基盤解明と効率化に資する新知見。

研究成果の概要

生きた細胞の中での核酸分子の振る舞いを可視化する技術を開発し、外部から導入された核酸が細胞内でどのような運命をたどるかを解明しました。今回の研究では1分子蛍光イメージング技術を駆使し、外部から細胞内に導入された外来核酸の振る舞いを可視化し解析しました。その結果、細胞質における核酸の分解が外来遺伝子発現に対する重要な防御機構の一つとして働いており、効率的な外来遺伝子発現を妨げていることを見出しました。さらに、見出された分解酵素活性は細胞の種類によって大きく異なることを発見しました。

今まで、細胞内に導入された外来の核酸の運命はブラックボックスとして扱われてきました。今回の成果は今まで試行錯誤で研究が進められていた遺伝子導入研究に理論的バックボーンを提供するものであり、核酸医薬や遺伝子治療の分子基盤解明並びに高効率化への貢献が期待されます。

本研究は、国立研究開発法人産業技術総合研究所（理事長 中鉢 良治）バイオメディカル研究部門（研究部門長 近江谷 克裕）バイオアナリティカル研究グループと、国立研究開発法人理化学研究所（理事長 松本 紘）生命システム研究センターナノバイオプローブ研究チーム神 隆 チームリーダー等との共同研究により行われました。

論文発表の概要

研究論文名：Raster image cross-correlation analysis for spatiotemporal visualization of intracellular degradation activities against exogenous DNAs（ラスタ画像相互相関分光法による外来遺伝子に対する細胞内分解活性の時空間的可視化解析）

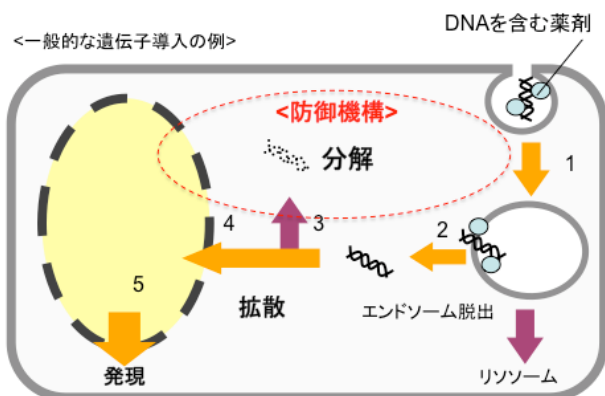
著者：佐々木章¹⁾、山本条太郎²⁾、神 隆³⁾、金城政孝²⁾

1) 国立研究開発法人産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門バイオアナリティカル研究グループ 2) 国立大学法人北海道大学大学院先端生命科学研究所先端細胞機能科学分野 3) 国立研究開

研究成果の概要

（背景）

DNA や RNA などの核酸の生体内への導入は、核酸医薬や遺伝子治療の基礎となる重要技術です。細胞外から導入された外来の核酸が治療効果を発揮するには、核酸分子が破壊されことなく効率的に核等の機能部位に至ることが必要です。しかし、現時点では実用化に耐える程の導入方法は開発されていません。この原因の一つは、外来核酸の導入から機能発現に至る経路やメカニズムの解明が欠落し、ブラックボックスのままである点です。このブラックボックスの全容を明らかにすることができれば、より効率的かつ理論的な創薬や医学研究を推進することが可能となります。そこで、生きた細胞内で動的に変化する外来核酸の局在や分解を時空間的に解析し、定量的に表現する技術が望まれていました。



細胞への外来核酸導入概念図

（研究手法）

創薬や疾病の治療法の開発のため、生体メカニズムに関連するタンパク質などの機能解明を目指し、新しい基盤技術の開発に取り組んできました。生きた細胞の中で1分子レベルの動態を定量化することは容易ではありませんでしたが、今回産業技術総合研究所・理化学研究所と共同で1分子蛍光イメージング技術の一つであるラスタ画像相互相関分光法（Raster image cross-correlation spectroscopy; ccRICS）^{※1}を用いた核酸分解過程の定量化について研究を推進しました。

（研究成果）

細胞内への核酸の導入（トランスフェクション）^{※2}は細胞生物学研究において外来遺伝子発現に広く用いられている技術で、遺伝子治療やiPS細胞^{※3}作製の基礎となる技術です。細胞内に導入された核酸は分解されると考えられています。核酸の分解がいつ、どこで起こっているか明らかにするため、今回の研究では、分子の動きや分子間相互作用を定量化できる1分子蛍光イメージング技術の一つであるラスタ画像相互相関分光法（Raster image cross-correlation spectroscopy; ccRICS）を用いました。そのため、核酸の分解を検出するプローブ^{※4}として2色の蛍光色素で両末端を標識したDNAを作製しました。作製したDNAプローブとccRICS法を組み合わせ、2色の蛍光強度ゆらぎの同時性を

解析することで DNA が分解されたかどうか判断することができます。次に、この DNA 分解プローブを制限酵素^{※5}で処理したところ、分解過程を経時的に定量化できることが明らかになりました。また、大量の（ぱらぱら漫画のように）時間経過する画像を一度に処理可能な画像解析プログラムを開発し、蛍光顕微鏡画像の動画を用いて DNA プローブの分解度を追跡する手法を確立しました（図 1）。

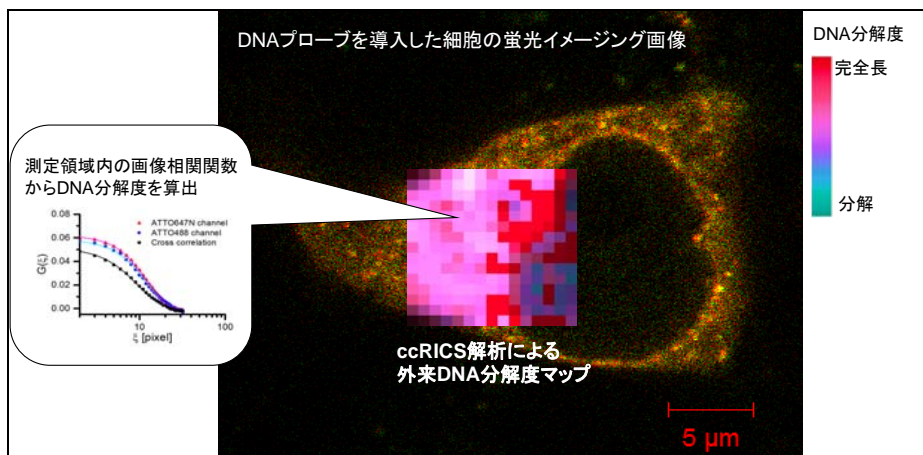


図 1 ラスター画像相互相関分光解析の概要

トランスフェクションにおいて、環状の DNA を導入する場合に対し、直鎖状の DNA を用いると導入遺伝子発現の効率が下がると考えられています。我々は単一細胞内の遺伝子発現効率に関して、環状 DNA と直鎖状 DNA（いずれも改変型緑色蛍光タンパク質 EGFP^{※6}の遺伝子情報を含む）をそれぞれ MEF 細胞^{※7}と HEK293 細胞^{※8}に導入した際の EGFP 発現効率を単一細胞レベルで検証しました。その結果、MEF 細胞では発現効率に変化が生じましたが、HEK293 細胞では発現効率の差は検出されませんでした。これは細胞株間での DNA 分解活性の差であるという仮説を立てました。

この仮説を検証するため、DNA プローブをマイクロインジェクション^{※9}した細胞を ccRICS 解析して DNA 分解活性を調べたところ、MEF 細胞では導入後 5 分程度で分解が進行したのに対し、HEK293 細胞では顕著な分解は見られませんでした（図 2）。

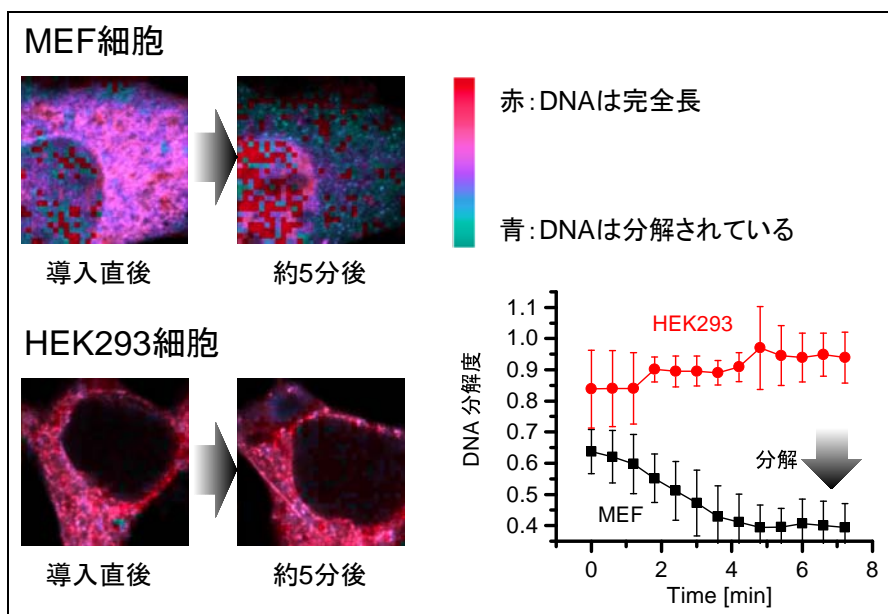


図 2 MEF 細胞と HEK293 細胞における細胞内核酸分解活性の定量化

結論として、細胞株によって DNA 分解活性、すなわち外来遺伝子に対する防御機構の強度が大きく異なり、それは遺伝子導入経路のバリアーとして機能していることが明らかになりました。これは、生きた細胞の中で外来 DNA の分解をリアルタイムに直接観察した世界初の成果です。同時に、DNA 分解活性と遺伝子発現は相関し、細胞株によって活性に差が見られたことから、例えば臓器によって核酸医薬の効果が異なる可能性を示唆する等、DNA 分解活性が遺伝子導入効率向上に重要な鍵であるという新しい考え方を提唱するに至りました。

(今後への期待)

今後は本研究で発見した DNA 分解酵素活性を担う分子を同定し制御することが求められます。そのために次世代シーケンサー^{※10}等の技術を組み合わせつつ、さらなる解析を行う予定です。将来的に核酸医薬や遺伝子治療の効率上昇はもちろん、ウイルス等に対する生体防御機構や核酸代謝、さらには疾患との関連など「生体内の核酸分解の意義」の解明を目指し研究を進めていきます。

お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究院先端細胞機能科学分野

教授 金城 政孝 (きんじょう まさたか)

TEL : 011-706-9005 FAX : 011-706-9006 E-mail : kinjo@sci.hokudai.ac.jp

〔用語解説〕

※1 ラスター画像相互相関分光法 (Raster image cross-correlation spectroscopy; ccRICS)
共焦点光学系で形成された微小な測定領域を走査して得られた細胞画像を取得して、その中における2色の蛍光強度の同時性を解析することで分子間の相互作用を定量化する方法。本研究ではDNAで連結された2つの色素が分離したかどうかを判別してDNA分解を検出するために用いた。

※2 トランスフェクション

動物細胞に外部から核酸を導入する技術。現在、ウイルスを用いた方法と試薬で人工的に導入する方法などが開発されている。

※3 iPS細胞

人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell)。すでに分化した体細胞に数種類の遺伝子を導入することで作製される。すべての細胞に分化できる能力を持つ。

※4 プローブ

ある物質や機能、環境を検出するためのセンサー物質。

※5 制限酵素

DNAの塩基配列を認識し、切断する酵素。分子生物学のツールとして広く利用されている。

※6 改変型緑色蛍光タンパク質 EGFP

ノーベル賞を受賞した下村博士がオワンクラゲから発見した、緑色の蛍光を発するタンパク質 GFP（緑色蛍光タンパク質）を遺伝子改変し蛍光の波長と強度を改良したタンパク質。

※7 MEF 細胞

マウス胎児繊維芽細胞由来の細胞株。トランスフェクションが難しいとされる。

※8 HEK293 細胞

ヒト胎児腎細胞由来の細胞株。生物学実験で広く用いられ、特にトランスフェクション効率が高く哺乳類細胞内でタンパク質を調製する用途で用いられている。

※9 マイクロインジェクション

培養細胞 1 個の中に微量な物質を注射する技術。

※10 次世代シーケンサー

短い断片に切断したゲノム等を使用し、大規模な DNA 配列をハイスループットに決定することができるシーケンサー。