

京都大学	博士（薬学）	氏名	中西秀之
論文題目	外来遺伝子長期発現と組み込み位置選択性の向上を目的とした新規遺伝子組み込み型ベクターの開発に関する研究		

（論文内容の要旨）

遺伝子組み込みは外来遺伝子の長期発現と細胞分裂時の複製や両娘細胞への分配を可能とし、遺伝子治療をはじめ培養細胞やトランスジェニック動物による製剤用蛋白質の産生、iPS細胞の作製に利用されるなど、近年の医学や医療において重要な役割を果たしている。こうした遺伝子組み込み技術の応用、中でも遺伝子を導入できる細胞数やそれらの細胞の分裂回数が限られる遺伝子治療では組み込み効率の高いベクターが必要である。また、内在遺伝子近傍への組み込みによる変異を避けるためには、組み込み位置選択性の高さも求められる。申請者はこうした要求に応えうる遺伝子組み込み型ベクターの開発を目的として、非ウイルス性の遺伝子組み込みシステムである*piggyBac*トランスポゾンを搭載したベクターを設計し、哺乳類染色体への遺伝子組み込みとそれに伴う遺伝子長期発現の可能性を検証した。また、これらのベクターの配列、形状、投与量等の最適化により組み込み効率の改善を行った。さらに、同じく非ウイルス性の遺伝子組み込みシステムである*phiC31*インテグラーゼと配列選択的DNA結合蛋白質の組み合わせにより、組み込み位置選択性の向上に成功した。

第1章 *piggyBac*トランスポゾンベクターによる*in vivo*での発現長期化

トランスポゾンはトランスポザーゼと呼ばれる酵素の作用により元の位置から切り出され、別の位置へと組み込まれることで移動するDNAである。目的遺伝子が搭載されたトランスポゾンを持つベクター（ドナーベクター）とトランスポザーゼを発現するベクター（ヘルパーベクター）を共に細胞内に導入することで、目的遺伝子を染色体へ組み込める。このトランスポゾン的一种である*piggyBac*は哺乳類染色体への組み込み効率が高く、サイズの大きい配列も組み込めるという利点が*in vitro*の検討で示される一方で、*in vivo*での評価は行われていなかった。そこで*piggyBac*トランスポゾンのドナーベクターとヘルパーベクターを作製し、これらのベクターをハイドロダイナミクス法によりマウスに投与した。その結果、ヘルパーベクターを投与しなかった群と比較して発現の長期化が認められ、*piggyBac*トランスポゾンベクターにより、*in vivo*においても長期発現が可能であることが示された。

第2章 高効率な遺伝子組み込み・長期発現を目的とした*piggyBac*トランスポゾンベクターの最適化

先天性・慢性疾患の治療には長期かつ十分な治療遺伝子の発現が必要であり、それには高い組み込み効率が求められる。他のトランスポゾンではベクターの形状（線状/環状）やヘルパーベクター量の違いにより組み込み効率が異なるという報告があるため、申請者はこれらの違いが*piggyBac*トランスポゾンベクターの組み込み効率に与える影響を検討した。その結果、ドナーベクターが線状DNAの場合、環状DNA

と比較して*piggyBac*トランスポゾンによる遺伝子組込み効率は有意に低くなること
が示された。また、ある一定量までのヘルパーベクター増量は組込み効率を上昇さ
せたが、それ以上になると遺伝子組込みの効率は却って低下した。以上、*piggyBac*
トランスポゾンベクターにより高い遺伝子組込み効率を得るためには、環状DNAの
ドナーベクターと適切な量のヘルパーベクターの組み合わせが重要であることを明
らかにした。

第3章 挿入変異の回避を目的とした位置選択的遺伝子組込み

内在遺伝子及びその近傍への組込みによる挿入変異は遺伝子組込みの安全性に関
わる最重要問題の一つである。そこで申請者は、染色体の特定位置に対する選択的
組込みを目的とし、配列選択的DNA結合蛋白質により特定の配列に固定されるドナ
ーベクターを設計した。まずN末端側がドナーベクターに、C末端側が標的となる
特定配列に結合するDNA結合蛋白質を設計し、その遺伝子を*piggyBac*トランスポ
ゾンのドナーベクターに挿入した。これにより組込み位置をDNA結合蛋白質の標的配
列近傍に限定可能かを検証したが、組込み自体が殆ど生じない結果となった。この
原因として、トランスポザーゼはトランスポゾン両端の配列を認識して組込むた
め、この両端の間に蛋白質が結合することでトランスポザーゼの作用が阻害される
可能性が考えられた。そこで、ドナーベクター側ではattB配列一箇所のみを認識
し、染色体のattPまたはpseudo attP配列にドナーベクターを組込むphiC31インテグ
ラーゼであれば、トランスポザーゼのような阻害を受け難いと考え、attB配列とDNA
結合蛋白質の遺伝子を有するドナーベクターを作製した。また、組込み位置選択性
を評価するため、組込み先となる標的ベクターとして、DNA結合蛋白質の標的配列
とattP配列を有し、これら2つの配列間距離がそれぞれ異なる複数のベクターを作製
した。何れの標的ベクターに組込まれるかを評価した結果、回収した組込み産物の
うち、標的-attP配列間距離が標的配列の上流方向に約0.2 kbである標的ベクターに
組込まれたものの占める割合がDNA結合蛋白質によって増大した。以上、DNA結
合蛋白質とphiC31インテグラーゼの組み合わせにより組込み位置選択性の向上が可
能であることが示された。

以上、申請者は*piggyBac*トランスポゾンベクターにより遺伝子組込みと長期発現
が可能であることを示し、高い組込み効率を得るための条件を明らかにした。ま
た、配列選択的DNA結合蛋白質とphiC31インテグラーゼを組み合わせにより遺伝子
組込みにおける位置選択性が高まる可能性を示した。これらの知見は遺伝子治療を
はじめとした遺伝子組込み技術の応用における効率、安全性を向上させる上で有用
な情報を提供するものと考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

遺伝子組込みは、外来遺伝子の長期発現と細胞分裂時の複製や両娘細胞への分配を可能とし、遺伝子治療をはじめ培養細胞やトランスジェニック動物による製剤用蛋白質の産生、iPS細胞の作製に利用されるなど、近年の医学や医療において重要な技術となっているが、その応用においては高い組込み効率および組込み位置選択性が求められる。著者はこうした条件を満たす遺伝子組込み型ベクターの開発を目的として、非ウイルス性の遺伝子組込みシステムである *piggyback* トランスポゾンを搭載したベクターを設計し、哺乳類染色体への遺伝子組込みとそれに伴う遺伝子長期発現の可能性を検証すると共にベクターの配列、形状、投与量等の最適化により組込み効率の改善を行った。さらに、同じく非ウイルス性の遺伝子組込みシステムである *phiC31* インテグラーゼと配列選択的DNA結合蛋白質の組み合わせにより、組込み位置選択性の向上を試みた。

トランスポゾンは、トランスポザーゼと呼ばれる酵素の作用により元の位置から切り出され別の位置へと組込まれることで移動するDNAで、目的遺伝子が搭載されたトランスポゾンを持つドナーベクターとトランスポザーゼを発現するヘルパーベクターを共に細胞内に導入することにより、目的遺伝子を染色体へ組込める。*piggyBac* は *in vitro* で哺乳類染色体への組込み効率が高くサイズの大きい配列も組込めるという利点を有することから、*piggyBac* トランスポゾンのドナーベクターとヘルパーベクターを作製しハイドロダイナミクス法によりマウスに投与した結果、長期の発現が認められた。次に組込み効率の改善を目的として、ベクターの形状(線状/環状)の違いやヘルパーベクター量の影響を検討した結果、環状ドナーベクターの方が組み込み効率が高く、またヘルパーベクターには最適量があることが明らかとなった。さらに、染色体の特定位置への選択的組込みを目的として、配列選択的DNA結合蛋白質により特定の配列に固定されるドナーベクターの設計を行い、N末端側がドナーベクターにC末端側が標的となる特定配列に結合するDNA結合蛋白質を設計してその遺伝子を *piggyback* トランスポゾンのドナーベクターに挿入したが、組込みは殆ど生じなかった。この原因として、トランスポゾンの両端間に蛋白質が結合することでトランスポザーゼの作用が阻害される可能性が考えられたので、ドナーベクター側では *attB* 配列一箇所のみを認識し染色体の *attP* または *pseudo attP* 配列にドナーベクターを組込む *phiC31* インテグラーゼに着目し、*attB* 配列とDNA結合蛋白質の遺伝子を有するドナーベクターを作製した。組込み先となる標的ベクターとして、DNA結合蛋白質の標的配列と*attP* 配列を有し、その配列間距離がそれぞれ異なる複数のベクターを作製して組込みを評価した結果、標的-*attP* 配列間距離が標的配列の上流方向に約0.2 kbである標的ベクターに組込まれたものの占める割合がDNA結合蛋白質によって増大し、DNA結合蛋白質と *phiC31* インテグラーゼの組み合わせにより組込み位置選択性の向上が得られることが示された。

以上、著者は *piggyback* トランスポゾンベクターにより遺伝子組込みと長期発現が可能であることを示し、高い組込み効率を得るための条件を得た。また、配列選択的DNA結合蛋白質と ϕ C31 インテグラーゼを組み合わせによる位置選択性向上の可能性を示した。これらの知見は遺伝子治療をはじめとした遺伝子組込み技術の応用において効率、安全性を向上させる上で有用な情報を提供するものと考えられる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成24年2月22日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降