

京都大学	博士（工学）	氏名	森 友明
論文題目	Application of artificial zinc-finger protein technology: gene regulation and site-specific DNA cleavage (人工 DNA 結合タンパク質テクノロジーの応用：遺伝子調節と位置特異的 DNA 切断)		
(論文内容の要旨)			
本論文は、標的 DNA 配列の特異的認識が可能な人工 DNA 結合タンパク質（artificial zinc-finger protein: AZP）に転写調節ドメインを融合させた人工転写因子（artificial transcription factor: ATF）を用いた標的遺伝子の発現調節、および AZP に DNA 切断活性部位を融合させた人工制限酵素を用いた標的 DNA の位置特異的切断に関する研究成果をまとめたものであり、6 章からなっている。 第 1 章では、血管新生を制御する成長因子であり、医学的に重要な血管内皮成長因子 VEGF-A 遺伝子の発現を ATF を用いて低酸素下で制御できるかどうかを検証した。VEGF-A の発現を虚血性患部で亢進できれば、虚血性疾患を改善できるし、がん細胞で VEGF-A の発現を抑制できれば腫瘍形成を阻害することが可能となるからである。これまでに申請者のグループではこれら疾患の治療を目指して、VEGF-A プロモーターに結合する ATF を用いて通常酸素下で VEGF-A 遺伝子発現の制御に成功してきた。しかし、虚血性患部および腫瘍では細胞は低酸素状態にあり、VEGF-A の発現レベルが通常酸素濃度よりも高いことが知られている。そこで、この ATF が低酸素条件下でも VEGF-A 遺伝子発現を有効に制御できるかどうかを検証した。その結果、低酸素下でも、活性化ドメインを持つ ATF は VEGF-A 発現量を 24 倍まで増加し、また抑制ドメインを持つ ATF はコントロールに対して VEGF-A 量を 6%まで抑制できた。このように、開発した ATF は、疾患部位で見られる低酸素条件下でも VEGF-A 遺伝子発現の制御が可能であることが明らかとなった。 第 2 章では、臨床的応用を目指して、この ATF を虚血性患部や腫瘍特異的に発現できる系の開発を行った。実際の臨床試験において ATF 発現ベクターを全身投与した場合、疾患部位以外の正常（通常酸素下）組織内の VEGF-A 遺伝子発現を不必要に変化させてしまう可能性がある。そこで、プロモーターの上流に HRE（低酸素下で特異的遺伝子発現に重要な役割を果たすシスエレメント）を配置した低酸素誘導型の人工プロモーターを構築した。この人工プロモーターを用いた VEGF-A 用の ATF 発現ベクターを作製し、動物細胞における ATF 発現量を調べたところ、狙い通り低酸素下でのみ ATF を発現させることに成功した。次に、この新しい発現ベクターによる VEGF-A 発現量を調べると、活性化用の ATF は低酸素下特異的に VEGF-A 量を 22 倍まで増加し、また抑制用の ATF は低酸素下特異的に VEGF-A 量をコントロールの 38%まで抑制させることができた。今回開発した低酸素誘導型の人工プロモーターにより、低酸素下特異的な血管新生の制御が可能となり、ATF の臨床的安全性を高めることができた。 第 3 章では、ATF の有効性をさらに高めるため、細胞内で ATF 発現量を増大させる新規の発現系、すなわち標的遺伝子を活性化する ATF が自身の発現をも活性化できるような「自己増殖型」ATF 発現ベクターの開発を行った。この発現ベクターは ATF 発現を制御するプロモーターの上流に ATF 結合配列がタンデムに配置されている。まず、自己増殖型 ATF 発現ベクターによる ATF 発現量を調べると ATF 結合配列の数に依存して ATF 発現量の増加が確認され、意図通りに ATF が自身の発現も高めていることが示唆された。次にこのベクター導入後の VEGF-A 発現量を調べると、ATF 発現量の上昇とともに VEGF-A 発現量の上昇も確認され、開発した自己増殖型 ATF 発現ベクタ			

一が自身の ATF 発現量を高め、かつ標的遺伝子をさらに効率よく活性化させることに成功した。

ATF による治療効果を高めるためには、ATF 導入細胞の割合を高めることが有効である。そこで申請者は、ATF に細胞間移動能を持つといわれているヘルペス単純ウイルスの VP22 タンパク質を融合することにより、遺伝子導入された細胞内で発現された ATF を未 (ATF 遺伝子) 導入細胞へ移動させ、これにより ATF 導入細胞の割合を高めることが可能ではないかと考えた。しかしながら、VP22 タンパク質の細胞間移動 (分泌) 能は生細胞では確認されておらず、論争中であった。そこで第 4 章では、VP22 が生細胞から実際に分泌できるかどうかを調べた。VP22 の分泌を追跡するために β -galactosidase (β Gal) を融合し、その発現ベクターを細胞へ導入後、融合タンパク質の培地へ分泌する量と細胞内の量を β Gal の酵素活性を指標に調べた。その結果、融合タンパク質は時間依存的に分泌され、6 日後では発現したうちの 72% が培地に分泌していた。また、細胞膜障害アッセイよりこの分泌が細胞膜の損傷による漏れでなく、生細胞での積極的な分泌であることを確認した。VP22 は細胞膜透過ペプチドとしても知られ、本研究の結果とも合わせ、ATF 細胞間移動のために VP22 が有効である可能性が示唆された。

第 5 章では、前章で分泌能を確認した VP22 を融合させることにより、ATF に細胞間移動能を賦与し、未 (ATF 遺伝子) 導入細胞の標的遺伝子の発現を活性化できるかどうかを検証した。VP22-ATF 発現ベクターを導入した細胞と ATF による遺伝子発現のモニター用のレポータープラスミドを導入した細胞とを共培養し、この細胞間移動をレポーター遺伝子の活性化で検出できる系を構築した。しかしながら、レポーター遺伝子発現の解析からは、ATF の細胞間移動を検出することができなかった。前章で VP22 の分泌は確認しているので、VP22-ATF 融合タンパク質を細胞間移動をさせるにはさらに細胞膜透過ペプチドを融合することが必要なことが示唆された。

第 6 章では、ゲノム工学用の新たなツールとして、DNA 切断部位を二つの AZP で挟んだ、人工制限酵素を開発した。人工制限酵素として、zinc-finger protein と制限酵素 FokI の活性部位から成る ZFN (zinc-finger nuclease) が現在注目されている。しかし、その DNA 切断には FokI を介して二量化する必要がある、その際ホモ二量体 ZFN による標的配列外での DNA 切断の問題がある。また FokI のホモ二量化能は低いため、従来の ZFN では基質 DNA と切断生成物の識別ができず、天然の制限酵素のように触媒的に DNA を切断することができない。そこで申請者は、これらの問題を解決すべく、DNA 切断活性部位として FokI 2 分子をペプチドリンカーで繋いだ single-chain FokI (scFokI) を、二つの AZP で挟んだ「サンドイッチ型人工制限酵素」AZP-scFokI-AZP を創出した。この AZP-scFokI-AZP はその構造上の特性から切断生成物よりも基質 DNA により強く結合するので、天然の制限酵素のように高ターンオーバー型の切断反応が可能で、実際に 100 倍量の基質 DNA を切断することに成功した。また、その切断位置を解析したところ、2 つの AZP 結合サイト間の DNA 領域を 1 ヶ所で特異的に切断できることが分かった。これらの結果から、サンドイッチ型人工制限酵素は、より理想的な人工制限酵素の開発につながると考えられる。

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、人工 DNA 結合タンパク質 (AZP) の、標的遺伝子の発現調節および標的 DNA の位置特異的切断への応用に関する研究成果についてまとめたものであり、得られた主な成果は次のとおりである。

1. 人工転写因子 (ATF) を用いた、標的の内在性遺伝子の発現を人為的に制御することにより、疾患治療の可能性を示した。すなわち、開発した ATF 発現系を用いて、虚血性疾患および固形腫瘍形成に深く関わり、血管新生を亢進することが知られている VEGF-A 遺伝子の低酸素下のみでの発現活性化および抑制に成功した。この成果は、ATF を用いて、正常細胞へは全く影響を与えずに、標的患部のみにおいて VEGF-A 遺伝子の発現を制御することを可能にし、ATF を用いた安全な治療法の開発へつながると考えられる。

2. ATF 自身の発現ベクターのプロモーターに ATF 結合サイトを導入することにより、自己増殖型の ATF 発現系の構築に成功した。このことは、VP22 のような細胞間移動能を有するタンパク質との融合等により、この大量に発現された ATF を近傍の (未 ATF 遺伝子導入) 細胞へ移動させることが可能となれば、ATF による標的遺伝子発現の調節効率をさらに高められることを示唆している。

3. 従来の人工制限酵素での問題点を改善した、サンドイッチ型人工制限酵素を開発した。この新規人工制限酵素では、DNA 切断活性部位を 2 つの AZP で挟んでいるので、2 つの AZP 結合サイト間の DNA 領域を切断するようにデザインされている。そのため、このサンドイッチ型人工制限酵素は基質 DNA に強く結合し、かつ DNA 切断後、切断生成物への結合は著しく低下することから、(従来の人工制限酵素で不可能であった) 高ターンオーバー型の DNA 切断に成功した。また、天然の制限酵素のように位置特異的 DNA 切断にも成功し、ゲノム工学用の有効なツールとなり得ることが示された。

以上のように、本論文は、特異的 DNA 認識能を有する AZP に転写調節ドメインや DNA 切断活性部位機能ドメインを付加することにより、標的遺伝子発現の人為的調節および標的 DNA 配列の位置特異的切断が可能なことを実証しており、学術上、實際上寄与するところが少なくない。よって、本論文は博士 (工学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 22 年 4 月 27 日、論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。