

平成13年度

若手研究者奨励研究報告書

創薬等ヒューマンサイエンス研究

第1分野

抗エイズウイルス薬、エイズ付随症状
に対する治療薬の開発に関する研究

外来遺伝子の発現調節能を有した高効率遺伝子導入・ 発現系の開発

所 属 国立医薬品食品衛生研究所 生物薬品部
研究者 水口 裕之

要旨

遺伝子導入効率に優れたアデノウイルスベクターのE1およびE3欠損領域に、遺伝子発現制御系としては最も汎用されているテトラサイクリンの発現制御系を搭載させた発現制御型アデノウイルスベクターを開発し、その諸性質を検討した。

1. 研究目的

本研究は、ポストゲノムの遺伝子機能解析研究に必須の遺伝子導入・発現技術に関する基盤技術を開発することを目的としている。ヒトゲノム配列の解読により、ヒトゲノム研究も構造解析から機能解析へとその力点が移りつつある。即ち、機能が未知の新規遺伝子の機能解明が現在の最大の国際競争になりつつある。遺伝子・タンパク質の機能解明は、DNAチップ、in silico解析等によるトランスクリプトーム、プロテオーム解析などにより絞り込み、推定が行われているが、決め手となるのは、標的細胞やin vivoに候補遺伝子を導入して発現させ、その機能を直接評価する実証的解析である。しかし、in silico、トランスクリプトーム、プロテオーム解析法の急速な進展に比し、実証的解析系の開発は極めて遅れている。これは適切な遺伝子導入・発現技術の開発が遅れているためであり、高効率の遺伝子導入活性を有し、目的遺伝子の発現を可逆的に、かつ定量的に調節し、細胞機能の変化を直接解析できる基盤技術の開発は極めて重要である。そこで本研究では、既存のベクターでは最も遺伝子導入効率が優れているとされているアデノウイルスベクターをベースにして、薬剤反応性の転写活性化因子の遺伝子とその応答配列を含んだプロモーターをもつ目的遺伝子を単一のベクターに搭載し、外的に加えた薬剤により目的遺伝子の発現制御が可能なベクターシステムの開発を行った。

2. 研究方法

(1)ベクタープラスミドとシャトルプラスミドの作製

アデノウイルスゲノムのE3欠損領域にユニークな制限酵素部位であるCsp45I、ClaI、あるいはI-SceI部位を挿入したベクタープラスミドpAdHM19、-20、および-21を作製した (Fig.1)。これらのベクタープラスミドはE1・E3領域を除く全てのアデノウイルスゲノムを有しており、E1欠損領域にはユニークな制限酵素部位であるI-CeuI、SwaI、PI-SceI部位を有している。また、E3欠損領域への外来遺伝子の挿入を容易にするように、シャトルプラスミドpHM10、-11、-13を作製した (Fig.1)。これらはマルチクローニング部位の両端にそれぞれI-SceI、ClaI/Csp45I、ClaI部位を有している。なお、ベクタープラスミドはアンピシリン耐性遺伝子を、シャトルプラスミドはカナマイシン耐性遺伝子を有している。

(2)発現制御型アデノウイルスベクターの作製

シャトルプラスミドpHM11にtet-offシステムのための転写活性化因子tTA (tetracycline-responsive transcriptional activator) の発現単位を挿入 (CMVプロモーターを使用) してpHM11-TetOffを作製し、Csp45I処理したpHM11-TetOffをベクタープラスミドpAdHM20のClaI部位に挿入した (Csp45IとClaIの切断フラグメントは互いに結合できるが

再切断はされない) (なお、tTA、rtTAはそれぞれテトラサイクリンの添加により目的外来遺伝子の発現をoffあるいはonにする作用をもつため、tet-off、tet-onシステムを呼ばれている)。この際、ライゲーション産物をClaI処理することでセルフ・ライゲーションによる親プラスミドの出現を抑え、目的の組換えプラスミドpAdHM20-TetOff1を極めて効率良く選択することができた。次に、テトラサイクリン応答性のプロモーター (TRE/CMV) とルシフェラーゼ遺伝子からなるカセット (pHM5-TRE-LのI-CeuI/PI-SceIフラグメント) をE1欠損領域のI-CeuIとPI-SceI部位に挿入することでpAdHM20-TetLを得た。pAdHM20-TetLをPacI処理し、293細胞にトランスフェクションすることでルシフェラーゼ発現tet-offアデノウイルスベクターAdOff-L2を得た。同様に、tTAのかわりに、rtTA (reverse tetracycline-responsive transcriptional activator) をE3欠損領域に挿入したルシフェラーゼ発現tet-onアデノウイルスベクターAdOn-L2を得た。さらに、ルシフェラーゼ遺伝子のかわりにヒト分泌性アルカリフォスファターゼ (SEAP) を挿入したtet-offアデノウイルスベクターAdOff-SEAP2、tet-onアデノウイルスベクターAdOn-SEAP2を作製した。また、CMVプロモーターの下流にルシフェラーゼあるいはSEAP遺伝子を連結させ、これらの発現カセットをE1欠損領域に挿入した従来型アデノウイルスベクターAd-L2、Ad-SEAP2を作製した。

(3) 培養細胞への遺伝子導入

SK HEP-1、HeLa、ECV304、LN319細胞を96穴プレートに 1×10^4 cells/well播種し、翌日AdOff-L2、AdOn-L2あるいはAd-L2を種々の濃度で1.5時間作用させた。種々の濃度のドキシサイクリン存在下で48時間培養後、ルシフェラーゼ活性を測定した。

(4) マウスへの遺伝子導入

AdOff-SEAP2、AdOn-SEAP2、Ad-SEAP2を 1×10^9 PFU、マウス (Balb/c、nude) の尾静脈内に投与し、経口的に血中SEAPレベルを測定した。3日目からはドキシサイクリン (1 mg/ml) 入りのdrinking waterを与えた。

3. 研究成果

平成13年度は、以下に示すように当初の計画以上の成果を得た。

(1) 複数の外来遺伝子を挿入できるアデノウイルスベクターシステムの開発

研究代表者らは、in vitroライゲーションを利用した簡便なアデノウイルスベクター作製法を開発しているが、本法を改良・発展させて、E1・E3両欠損部位に1ステップのin vitroライゲーションで外来遺伝子を導入できるベクターシステムの開発を行った。

作製したベクタープラスミドはE1およびE3領域を除いたアデノウイルス全ゲノムを含み、E3欠損部位にユニークな制限酵素部位のClaI、Csp45I、あるいはI-SceI認識配列を有している。ClaIとCsp45Iは通常の6塩基認識酵素であり、I-SceIは18塩基認識酵素である。また、目的遺伝子のE3欠損部位への挿入を容易にするように、マルチクロニング部位の両端にClaI、Csp45I、あるいはI-SceI認識配列を有したシャトルプラスミドを作製した (Fig.1)。これにより、目的遺伝子をシャトルプラスミドに挿入した後、ClaI、Csp45I、あるいはI-SceI部位を利用することで、1ステップのin vitroライゲーションで目的遺伝子をアデノウイルスDNAのE3欠損領域に導入できるシステムの構築が可能となった。また、E1欠損領域には3種のユニークな制限酵素部位であるI-CeuI、SwaI、PI-SceI部位を有しており、簡便なin vitroライゲーションで目的遺伝子をE1欠損部位にも挿入できる (E1欠損領域への外来遺伝子挿入用のシャトルプラスミドも作製済み)。

本システムが開発されたことにより、複数のタンパク質が互いに共同作用や相互作用することで機能を発揮するような分子 (タンパク質) などを単一のアデノウイルスベクターで発現させることが可能となった。

(2) 発現制御型アデノウイルスベクターの開発とその機能評価

上記システムが作製されたことで可能になった遺伝子発現系の一例として、テトラサイクリン

の遺伝子発現制御系をアデノウイルスベクターに搭載させたシステムが考えられる。即ち、発現制御に必要なコンポーネントをE1・E3両欠損部位に挿入することにより、単一のベクターでの目的遺伝子の発現制御が可能なベクターシステムが開発できる。このようなベクターシステムが開発されれば、転写活性化遺伝子を発現するアデノウイルスベクターと、テトラサイクリンの応答性のプロモーターの制御下に目的遺伝子を発現するアデノウイルスベクターを共作用（共投与）する必要がなくなり、余分なベクターを作製しなければならないといった問題点や、両者のベクターを共感染させなければいけないといった問題点が解決され、より効率の良い発現制御型アデノウイルスベクターの開発が期待できる。

そこで、tet-offあるいはtet-onシステムのための転写活性化因子であるtTAあるいはrtTAを発現するカセットをE3欠損領域へ、テトラサイクリン応答性のプロモーターの下流に目的遺伝子（モデルとしてルシフェラーゼあるいはヒト分泌性アルカリフォスファターゼ（SEAP）を使用）を連結させたカセットをE1欠損領域へ挿入したアデノウイルスベクターAdOff-L2、AdOn-L2（AdOff-SEAP2、AdOn-SEAP2）を作製した。各発現系を搭載したベクターの遺伝子発現制御能等を種々のヒト由来の細胞株、マウスを用いて比較・検討した。その結果、tet-offシステムを搭載したルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターAdOff-L2を作用させたSK HEP-1、HeLa、ECV304、LN319細胞においては、ドキシサイクリン（テトラサイクリンの誘導体）存在化（1-10 ng/ml以上）で培養することにより、ドキシサイクリン非存在下で培養した場合に比べ約20-200倍以上のルシフェラーゼ活性の低下が認められた（Fig.2にはHeLa細胞とECV304細胞の結果について示した）。一方、tet-onシステムを搭載したルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターAdOn-L2の場合には、ドキシサイクリンの添加（100-1000 ng/ml以上）によりルシフェラーゼ活性は約2-20倍程度しか上昇せず、低い発現誘導能しか示さなかった。また、AdOff-L2を作用させた細胞における最大ルシフェラーゼ活性はAdOn-L2の場合より10倍以上高く、強力なプロモーターとして知られているCMVプロモーターを用いたルシフェラーゼ発現アデノウイルスベクターAd-L2を作用させた場合のルシフェラーゼ活性値と同等以上であり、より高い目的遺伝子の発現を得ることが可能となった。さらに、発現のスイッチが置き換わるのに必要とされるドキシサイクリンの濃度（tet-offの場合はoffからonになる濃度、tet-onの場合はonからoffになる濃度）もtet-offシステムの方がtet-onと比較し約100倍低く、薬剤に対して高い感受性を示した。

次に、両システムを搭載したアデノウイルスベクターのin vivoでの機能を検討するために、SEAPを発現するtet-offあるいはtet-onのアデノウイルスベクターAdOff-SEAP2、AdOn-SEAP2をマウスの尾静脈内に投与し、経日的に血中SEAPレベルを測定した（ドキシサイクリンはdrinking waterとして与えた）。なお、本実験では抗SEAP抗体の出現による影響を無視し、各ベクターシステムの能力を正確に評価できるように、ヌードマウスを用いた。その結果、AdOff-SEAP2投与マウスにおいては、血中SEAPレベルはドキシサイクリンの有無により約500倍の誘導能を有しており、極めて効率の良い遺伝子発現レベルの制御が可能となった（アデノウイルスベクターはマウスに尾静脈内投与すると99%以上は肝臓に移行するため、肝臓で主に発現され血中に分泌されたSEAPレベルを測定したことになる）。この時の最大の血中SEAP活性は、CMVプロモーターを用いたSEAP発現アデノウイルスベクターAd-SEAP2を投与した場合の血中SEAP活性値よりも高いものであった。当然のことながら、Ad-SEAP2を投与したマウスにおいてはドキシサイクリンの有無によらず、血中SEAP活性は一定であった。一方、AdOn-SEAP2を投与したマウスにおいては、血中SEAP発現の誘導能は全くないかあるいは数倍程度であった。これはin vitroの検討で明らかとなったようにtet-onシステムにおいては、tet-offシステムに比べ低い発現制御能しか示さないこと、およびドキシサイクリンに対する低い感受性の両者が関与しているものと考えられた。従って、tet-onシステムに関しては更なる改良が必要と考えられた。

4. 考察

アデノウイルスのE3領域はウイルスの複製には必須でないことから、第一世代のアデノウイル

スペクターにおいては、外来遺伝子の挿入サイズの上昇を目的に、多くの場合削除されている。従って、E1欠損部位のみならずE3欠損部位にも外来遺伝子を挿入することが可能であり、目的によっては両者に外来遺伝子を導入する必要がある場合がある。例えば、複数の遺伝子をそれぞれ異なったプロモーターによって発現させるために、両者の発現ユニットをE1欠損部位に導入したもののプロモーター干渉などのために目的遺伝子を発現させることが出来ない場合などである。そこで、E3欠損部位にも新たな制限酵素ユニークサイトを挿入し、E1・E3両欠損領域にそれぞれ1ステップのin vitroライゲーションで外来遺伝子を導入できるシステムを開発した (Fig.1)。本システムの開発により、複数のタンパク質が互いに相互作用することで機能を発揮するような分子 (タンパク質) (例えば、P35とP40タンパク質の2量体からならインターロイキン12など) を単一のアデノウイルスベクターで発現させることが可能となった。

本ベクターシステムの適用例をとって、外来遺伝子の発現制御系としても最も広く用いられているテトラサイクリンの遺伝子発現制御系をアデノウイルスベクターに搭載させた発現制御型アデノウイルスベクターの開発を試みた。即ち、遺伝子発現制御に必要なコンポーネントをE1・E3両欠損部位に挿入することにより、単一のベクターでの目的遺伝子の発現制御が可能となる。大腸菌のテトラサイクリン耐性オペロンから得られた調節性因子 (レプレッサータンパク質とオペレーター配列) を利用した遺伝子発現制御系は、転写活性化タンパク質のtTAあるいはrtTAと、それらに対する応答配列であるテトラサイクリン制御性のプロモーター下に目的遺伝子を発現するユニットの両コンポーネントから構成される。そこで、tTAあるいはrtTAを発現するユニットをE3欠損領域へ、目的遺伝子 (モデルとしてルシフェラーゼあるいはヒト分泌性アルカリフォスファターゼ (SEAP) を使用) をE1欠損領域へ挿入したアデノウイルスベクターを作製し、その遺伝子発現誘導能をin vitro、in vivoの両条件下で比較・検討した。その結果、tet-offシステムを搭載したアデノウイルスベクターはtet-onシステムを搭載したベクターに比べ、発現制御能、薬剤 (ドキシサイクリン) に対する感受性の点で遙かに優れたものであった。

発現をpositiveに制御できるtet-onシステムの方が、遺伝子治療や遺伝子機能解析などの多くの目的には適していると考えられるが、その使用に当たっては注意が必要であり、更なる改良が必要と考えられた。tet-onシステムの改良にはテトラサイクリン制御性のサイレンサー作用を利用したtTS (tetracycline-controlled transcriptional silencer) を付与したベクターシステムの開発が考えられる。tTSを発現させることでバックグラウンド活性 (非誘導時の遺伝子発現レベル) を下げ、発現制御能の更なる上昇が期待できる。この場合、目的遺伝子、rtTA、tTSの3種類の外来遺伝子を発現させることが必要となるため、E3欠損領域からモノシストロニックに複数の外来遺伝子を発現させることが可能なIRES (Internal ribosome entry site) 配列を用いてrtTAとtTSを同時に発現させ、E1欠損領域から目的遺伝子を発現できるベクターシステムの開発が考えられる。さらに、3種類の遺伝子を独立に異なった領域から発現できるように、アデノウイルスの他の領域にもユニークな制限酵素部位を挿入することで、E1欠損領域、E3欠損領域と合わせ3ヶ所に同時に外来遺伝子を挿入できるアデノウイルスベクターシステムを開発することも考えられる。次年度以降は、上記のような改良型tet-onシステムを開発することで、より優れた発現制御型遺伝子導入・発現系の開発を計画している。

5. まとめ

平成13年度は、外来遺伝子の発現調節能を有した高効率遺伝子導入・発現系の開発研究として以下の成果を得た。

- 1) E1およびE3遺伝子を除去したアデノウイルス全ゲノムを含むベクタープラスミドのE3欠損部位に、ユニークな制限酵素部位 (ClaI、Csp45I、I-SceI認識配列) を挿入することで、E1欠損領域のみならずE3欠損領域にも簡便に外来遺伝子を挿入でき、複数の外来遺伝子を発現させることが可能なベクターシステムを開発した。本システムは共同作用や相互作用を伴う遺伝子の機能解析などには極めて有用なツールになると期待された。
- 2) 転写活性化タンパク質のtTAあるいはrtTAの発現単位をE3欠損領域に挿入し、目的遺伝子をE1欠損領域することでtet-offあるいはtet-onの発現制御型アデノウイルスベクターを作製し、

その機能をin vitroおよびin vivo (マウス) の両条件下で検討した。その結果、tet-offシステムを搭載したアデノウイルスベクターは優れた発現制御能を有していたが、tet-onシステムを搭載したベクターの発現誘導能は低く、改良が必要と考えられた。

以上、単一のベクターで目的遺伝子の発現制御が可能なアデノウイルスベクターシステムを開発し、その諸性質・有用性を明らかにした。

6. 研究発表

(1) H. Mizuguchi, T. Hayakawa. The tet-off system is more effective than the tet-on system for regulating transgene expression in single adenoviral vector. J. Gene Med., in press.

(2) H. Mizuguchi, T. Hayakawa. Characteristics of adenovirus-mediated tetracycline controllable expression system. Biochim. Biophys. Acta, 1568, 21-29 (2001).

(3) H. Mizuguchi, M. A. Kay, T. Hayakawa. In vitro ligation-based cloning of foreign DNAs into the E3 as well as E1 deletion region for generation of recombinant adenovirus vector. BioTechniques, 30, 1112-1116 (2001).

(4) H. Mizuguchi, M. A. Kay, T. Hayakawa. Approaches for generating recombinant adenovirus vectors. Adv. Drug. Del. Rev., 52, 165-176 (2001).

(5) 水口裕之；遺伝子治療とDDS、Drug Delivery System、17、60-61 (2002).

(6) 早川堯夫、水口裕之；遺伝子治療用医薬品の実用化と一層の進展に向けて—新世代アデノウイルスベクターの開発—、医薬ジャーナル、37、101-107 (2001).

(7) 水口裕之・早川堯夫；プラスミド構築に基づいた組換えアデノウイルスベクター作製技術、BIO INDUSTRY、18(7)、5-14 (2001).

(8) 水口裕之・早川堯夫；アデノウイルスベクター、バイオ医薬品の品質・安全性評価、pp383-393、早川堯夫・山崎修道・延原正弘編、エル・アイ・シー (2001).

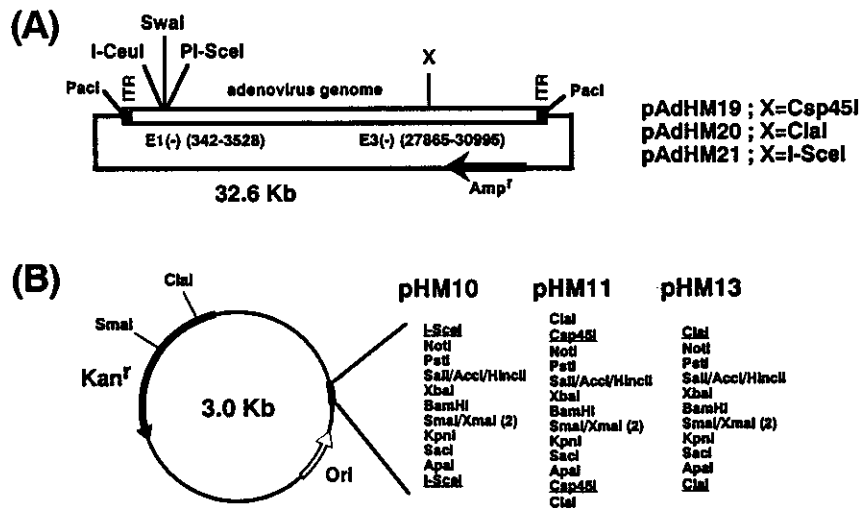


Fig. 1 Vector and shuttle plasmids
 (A) Vector plasmids, pAdHM19, -20, and -21.
 (B) Shuttle plasmids, pHM10, -11, and -13.

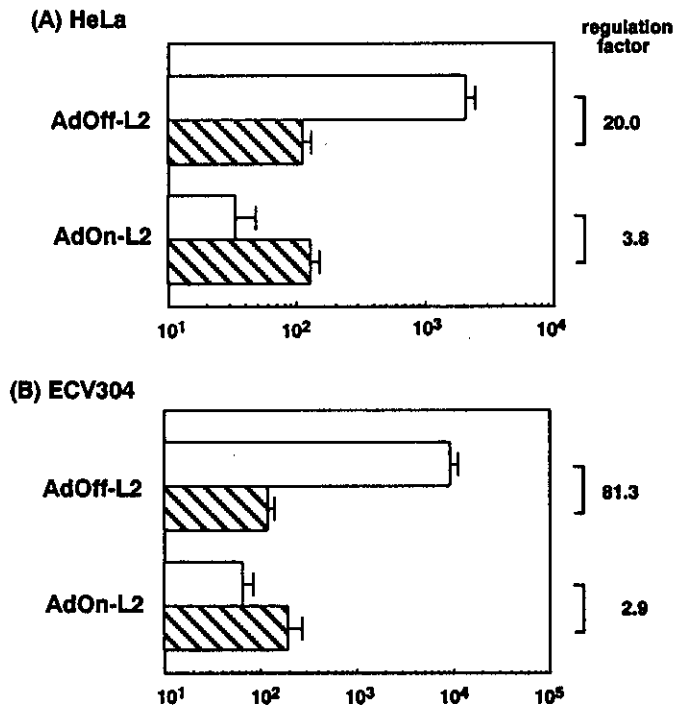


Fig.2 Ad-mediated tet-off and tet-on systems in other cell types. HeLa (A) and ECV304 (B) cells were transduced with AdOff-L2 or AdOn-L2 (MOI=12). The cells were cultured without (open columns) and with (slashed columns) doxycycline for 48 h. Ten ng/ml and 104 ng/ml of doxycycline were used for the tet-off and tet-on systems, respectively. Luciferase production in the cells was determined. Luciferase production in the non-transduced HeLa, ECV304, and LN319 cells was 0.03, 0.1, and 0.4 pg/105 cells, respectively. Each data represents the mean \pm S.D. of four experiments.

平成13年度

創薬等ヒューマンサイエンス総合研究事業
若手研究者奨励研究報告書

平成14年9月10日発行

発行 財団法人 ヒューマンサイエンス振興財団

〒103-0001 東京都中央区日本橋小伝馬町13番4号
共同ビル（小伝馬町駅前）4F
電話 03(3663)8641 FAX 03(3663)0448

印刷 株式会社 ソーラン社