

## 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 遺伝子細胞医薬部  
研究者 水口 裕之

### 要旨

テトラサイクリン制御性のサイレンサーやトリプル遺伝子発現系からなるアデノウイルスベクターを用いて、遺伝子発現をpositiveに効率良く制御できるTet-onシステムを搭載したアデノウイルスベクターの改良を行った。

### 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。また、E4領域と3' ITRの間の領域にXbaI部位を、E3欠損領域にCsp45I部位を有したベクタープラスミドpAdHM48を作製した。さらに、それぞれの領域への外来遺伝子の挿入が容易なように、マルチクロニング部位の両端にそれぞれの制限酵素部位を有したシャトルプラスミドを作製した。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。従って、E1/E3欠損領域およびE4領域と3' ITRの間の領域の3領域に、in vitroライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用して簡便に外来遺伝子を挿入することが可能になった（図1）。

#### (2)発現制御型アデノウイルスベクターの作製

Tet-offシステムあるいはTet-onシステムのための転写活性化因子tTA (tetracycline-responsive transcriptional activator) あるいはrtTA (reverse tetracycline-responsive

transcriptional activator) の発現単位をE3欠損領域に挿入し、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 (またはヒト分泌性アルカリフォスファターゼ (SEAP)) 遺伝子からなるカセットをE1欠損領域に挿入したアデノウイルスベクター、AdOff-L2、AdOn-L2 (AdOff-S2、AdOn-S2) を作製した。また、rtTAの発現単位にイントロンAの配列を付与したアデノウイルスベクター、AdOn-L4 (AdOn-S4) を作製した。

E3欠損領域にrtTA発現単位を、E4領域と3' ITRの間の領域にtTS (tetracycline-controlled transcriptional silencer) 発現単位を、E1欠損領域にテトラサイクリン誘導性のプロモーター下にルシフェラーゼ (またはSEAP) 発現単位を挿入したアデノウイルスベクター Ad-rtTA-tTS-L (Ad-rtTA-tTS-S) を作製した (図1)。

各アデノウイルスベクターは293細胞に3次感染までさせることにより大量調製した。アデノウイルスベクターを塩化セシウムの密度勾配遠心にて精製し (2回)、10 mM Tris (pH7.5)、1 mM MgCl<sub>2</sub>、10 % glycerolからなる溶液で透析した。アデノウイルスベクターの生物学的 (PFU: Plaque Forming Unit) タイターはEnd-point dilution法で測定した。

### (3) 培養細胞への遺伝子導入

SK HEP-1、HeLa、ECV304細胞などを96穴プレートに1 x 10<sup>4</sup> cells/well播種し、翌日各アデノウイルスベクターを種々の濃度で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およびSEAP活性を測定した。

### (4) マウスへの遺伝子導入

各アデノウイルスベクターを1 x 10<sup>9</sup> 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。ドキシサイクリンはdrinking waterとしてマウスに与えた。

## 3. 研究成果

H13年度に、テトラサイクリンの遺伝子発現制御系に必要なコンポーネントをアデノウイルスベクターのE1/E3両欠損領域に搭載したベクターを開発し、発現をnegativeに制御できるTet-offシステムを有したベクターがin vitro、in vivoの両条件下で優れた発現制御能を示すことを報告した。しかしながら、発現をpositiveに制御できるTet-onシステムによる発現制御能は低いこと (数倍から30倍以下の発現制御能)、遺伝子治療や遺伝子機能解析研究をはじめ多くの目的にはTet-onシステムの方が好ましいことから、その改良が必要と考えられた。

そこで本年度は、Tet-onシステムを搭載したアデノウイルスベクターの改良を行った。主に以下の3項目について改良を試みた。1) rtTAの発現レベルを上昇させ、2) テトラサイクリン制御性のサイレンサーであるtTSを用いることでbasal活性を抑え、3) かつ単一のアデノウイルスベクターで3者 (目的遺伝子、rtTA遺伝子、tTS遺伝子) の遺伝子を発現させることである。

1) については、E3欠損領域に挿入したrtTA発現単位 (CMVプロモーターにより制御されている) にイントロンAの配列を付与した。2, 3) については、3者 (目的遺伝子、rtTA遺伝子、tTS遺伝子) の遺伝子を単一のベクターで発現させる様々なベクターを作製した。このため、まず3者の遺伝子をアデノウイルスゲノムの異なった領域に独立に搭載できるトリプル遺伝子発現系からなるアデノウイルスベクターを開発した (図1)。E1/E3欠損領域に加え我々が注目した領域はE4領域と3' ITRの間の領域であり、この部位に制限酵素ユニーク部位のXbaI部位を挿入した。作製したベクタープラスミドpAdHM48はE1欠損領域にI-CeuI、SwaI、PI-SceI部位を、E3欠損領域にCsp45I部位を、E4領域と3' ITRの間の領域にXbaI部位を有しており、それぞれの領域に簡便なin vitroライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用して外来遺伝子を挿入できる。

このシステムを利用して目的遺伝子 (ルシフェラーゼあるいはSEAP; テトラサイクリン誘導性プロモーターにより制御) をE1欠損領域に、イントロンAを付与したrtTA遺伝子 (CMVプロモーターにより制御) をE3欠損領域に、tTS遺伝子 (EF1 $\alpha$ プロモーターにより制御) をE4領域と

3' ITRの間の領域に同時に搭載させたアデノウイルスベクターを開発した。本改良型Tet-onシステムを搭載したアデノウイルスベクター (Ad-rtTA-tTS-L、Ad-rtTA-tTS-S) は、レポーター遺伝子としてルシフェラーゼあるいはSEAP遺伝子のどちらを用いても、種々の細胞株で60-2500倍以上の高い遺伝子発現制御能を示した (図2)。この遺伝子発現誘導能は、tTS発現単位を有せず、E3欠損領域にrtTA発現単位だけを有したベクター (AdOn-L4、AdOn-S4) に比べ遙かに (1~2オーダー) 優れていた。一方、アデノウイルスゲノムの同一領域 (E1あるいはE3欠損領域) にIRES (internal ribosome entry site) 配列や両方向性プロモーターを用いて複数の外来遺伝子を搭載させたベクターでは高い発現制御能を示さず、個々の遺伝子を独立に、異なった領域で発現させることが重要なことが判明した。

#### 4. 考察

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両欠損領域、さらにE4領域と3' ITRの間の領域にも*in vitro*ライゲーションで外来遺伝子を導入できるダブル・トリプル遺伝子発現系を搭載したアデノウイルスベクターの開発を行った。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。個々の遺伝子発現単位を異なった領域に挿入することで、プロモーター干渉等を抑え、効率良く個々の遺伝子を発現させることが期待できる。3領域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の開発は、本研究が世界で初めてのものである。

本ベクターシステムの適用例として、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オペロンを利用した遺伝子発現制御系を搭載させた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両欠損領域、あるいはE4領域と3' ITRの間の領域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システムの開発を行った。テトラサイクリンの発現制御系は、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Tet-off、Tet-onシステム (それぞれtTA、rtTAを転写活性化タンパク質として利用) からなるが、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。

そこで次に、rtTAの発現量を増大させること、およびtTSを用いることによりTet-onシステムを搭載したアデノウイルスベクターの改良を試みた。rtTAの発現量を増大させる目的にはイントロンAを用いた。我々はイントロンAの配列をCMVプロモーターの下流に挿入することで、*in vitro*で2-20倍以上、*in vivo*で10-50倍以上の遺伝子発現効率の上昇が認められることを明らかにしている。これはイントロンの付与により転写産物がスプライシングされmRNAの核外輸送と翻訳が促進されることや、mRNAの安定性の向上が関与しているものと考えられる。また、tTS遺伝子を搭載させるためには、トリプル遺伝子発現系からなるアデノウイルスベクターを用いた。目的遺伝子、rtTA、tTSの3種類の外来遺伝子を独立に異なった領域から発現できるトリプル遺伝子発現系を用いることで、飛躍的な遺伝子発現誘導能の改善が認められた。本システムでは、E1欠損領域に挿入する目的遺伝子を*in vitro*ライゲーションに基づいたプラスミド構築を利用して置き換えるだけで、任意の外来遺伝子の発現を効率良くpositiveに制御できるアデノウイルスベクターが簡便に作製できることから、本ベクターシステムは広範な目的に有用であると考えられる。

以上、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。来年度は、本ベクターシステムを発現制御能に優れた変異rtTA (2nd

generation rtTA) と組み合わせて利用することなどにより、更なる改良を行う予定である。

## 5. まとめ

平成14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) アデノウイルスゲノムのE1/E3欠損領域、さらにE4領域と3' ITRの間の領域にもin vitroライゲーションで外来遺伝子を導入できるトリプル遺伝子発現系を搭載したアデノウイルスベクターの開発に成功した。

2) 目的遺伝子をE1欠損領域に、Tet-onシステムのための転写活性化因子のrtTA遺伝子をE3欠損領域に、転写抑制因子のtTS遺伝子をE4領域と3' ITRの間の領域に同時に搭載させたアデノウイルスベクターを開発し、発現誘導能に極めて優れていることを明らかにした。

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.*, 4, 240-247 (2002)

(2) Z.L. Xu, H. Mizuguchi, I. Ishii-Watabe, E. Uchida, T. Mayumi, T. Hayakawa. Strength evaluation of transcriptional regulatory elements for transgene expression by adenovirus vector. *J. Control. Rel.* 81, 155-163 (2002)

(3)水口裕之、早川堯夫；遺伝子機能解析のための遺伝子導入ベクター-ウイルスベクターを中心として-；蛋白質核酸酵素、印刷中

(4)水口裕之、早川堯夫；in vitroライゲーションを利用したアデノウイルスベクターの作製・増殖法；実験医学、20、1799-1804 (2002)

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

## 7. 知的所有権の取得状況

水口裕之、早川堯夫（発明人）；三重遺伝子発現系を含むアデノウイルスベクター；特願2002年第126776号

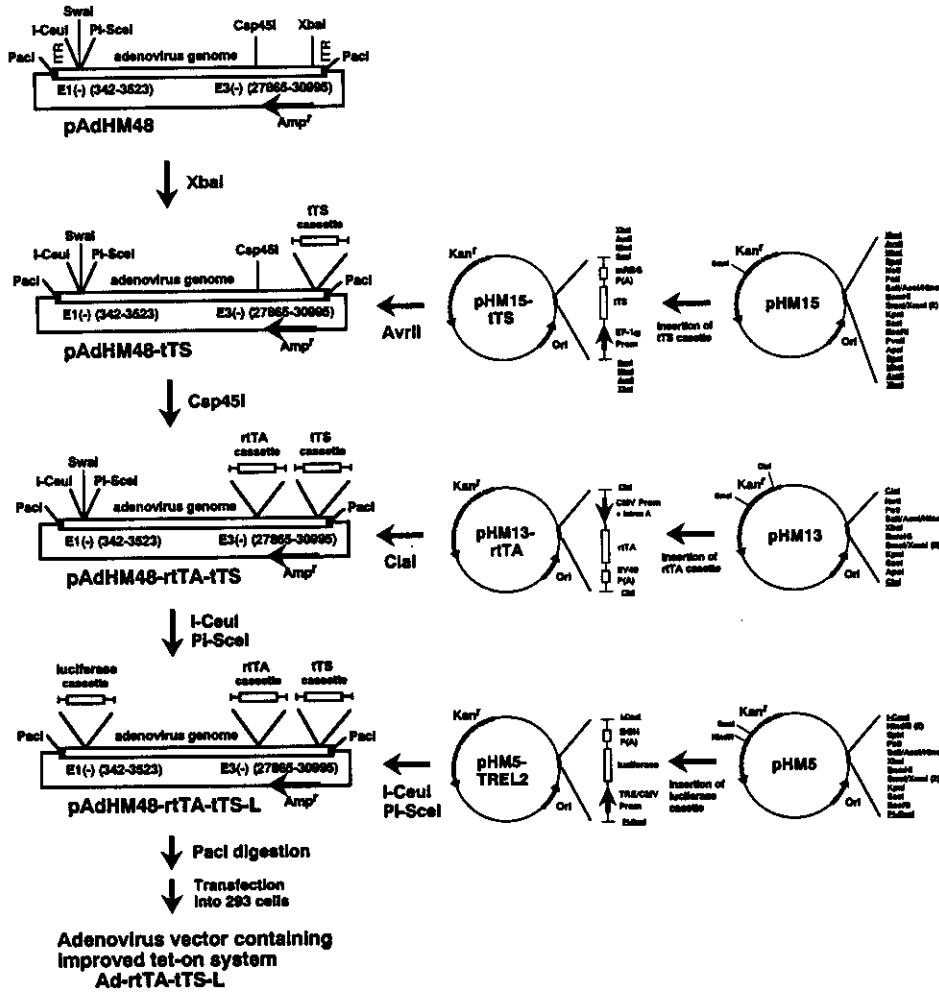


Fig.1 The construction strategy of Ad vectors containing the trinal gene expression system. XbaI-digested pAdHM48 was ligated with AvrII-digested pHM15-tTS. The resulting plasmid pAdHM48-tTS was digested with Csp45I, and ligated with ClaI-digested pHM13-rTA as reported previously. Next, the resulting plasmid pAdHM48-tTS-rTA was digested with I-CeuI and PI-SceI, and ligated with I-CeuI and PI-SceI-digested pHM5-TREL2 as reported previously. Finally, the resulting plasmid pAdHM48-tTS-rTA-tTS-L was digested with PaclI, and transfected into 293 cells, generating a recombinant Ad vector carrying an improved tet-on system.

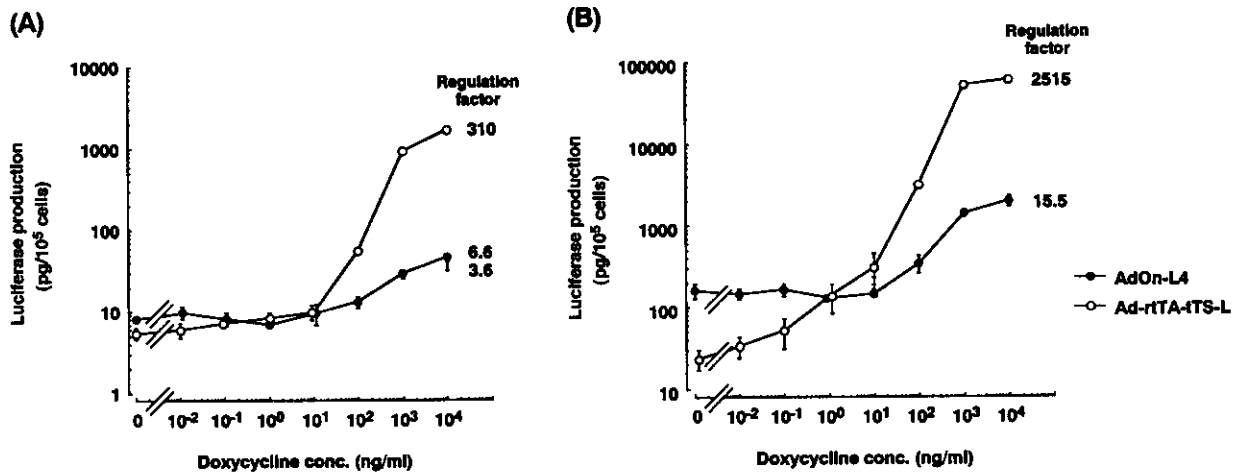


Fig.2 Regulated luciferase expression in SK HEP-1 cells transduced with various Ad-mediated tet-on systems. SK HEP-1 cells were transduced with AdOn-L4 or Ad-rTA-tTS-L (A: MOI=5, B: MOI=50), and cultured with medium only or medium containing various concentrations of doxycycline. After culture for 48 h, luciferase production in the cells was determined. Luciferase production in the non-transduced cells was  $0.5 \pm 0.2$  pg/10<sup>5</sup> cells. The regulation factor is the ratio of maximum luciferase production to minimum luciferase production. The data are expressed as mean  $\pm$  S.D. (n=3 or 4).