



Title	Enhancement of phage-mediated gene transfer by nuclear localization signal
Author(s)	芥, 照夫
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/44442
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	芥 照 夫
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 9 6 6 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学 位 論 文 名	Enhancement of phage-mediated gene transfer by nuclear localization signal (核移行シグナル提示ラムダファージによる遺伝子導入の向上)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 米田 悦啓 (副査) 教 授 目加田英輔 教 授 田中亀代次

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

遺伝子治療用ベクターは、ウイルスベクターとノンウイルスベクターの2つに大別されるが、そのうちノンウイルスベクターの最大の問題は、導入遺伝子の核内到達率が極めて低く、治療用遺伝子の十分な発現が達成できない点にある。特に、細胞質と核の間は核膜で隔てられており、核膜孔を介して分子の往来がある。DNA 等の巨大分子を核移行させるには、核膜孔通過可能なまでに DNA を凝縮し、これに核移行シグナル (NLS) を利用することで、達成可能と考えられている。しかしながら、第一段階の DNA の均一凝縮粒子を調製することが極めて困難であり、研究は遅々としている。我々は、凝縮 DNA 粒子として大腸菌にて大量調製可能なラムダファージに着目し、このファージ頭部の正二十面体構造にファージディスプレイの手法で NLS を提示させ、DNA の核移行と遺伝子発現向上に向けて検討をおこなった。

【方法ならびに成績】

ラムダファージの頭部は、2種の蛋白 gpD 蛋白と gpE 蛋白が規則正しく会合し、直径 55 nm の正二十面体構造をなしている。このうち gpD 蛋白質の N 末端側に SV40 ラージ T 抗原由来の 32 アミノ酸の NLS を融合させた NLS- λ ファージ粒子の構築した。 λ ファージのゲノムは、市販の λ gt11 を出発材料として、まず、gpD 遺伝子にアンバー変異を導入し、EcoRI-SacI 間の 5690 bp を削除したゲノムサイズ 78.3%変異 λ ファージベクター λ D1180 (*Dam15 del EcoRI-SacI cIts857 nin5 Sam100*) を構築した。この変異ファージは、gpE のみで頭部を形成することができ、サブレッサー変異のない大腸菌宿主 TOT10 に溶原化させると、32 度では、大腸菌が正常に増殖し、45 度 15 分の熱誘導により、ファージが増殖する。この溶原化大腸菌 TOP10 (λ D1180) に、NLS-gpD 蛋白を供給する発現プラスミドベクターを導入し、NLS- λ ファージ粒子を調製をおこなった。NLS-gpD が頭部にアセンブリーし、かつ NLS エピトープが表面に提示されていることは、抗 NLS 抗体を用いたウェスタンブロッティングと免疫沈降および importin α によるアフィニティー吸収により確認した。また電子顕微鏡観察により、野性型ファージの 55 nm とほぼ同一の粒子サイズであることも確認した。ヒト胎児肺細胞 HEL-R66 の細胞質にマイクロインジェクションしたところ、核に集積することをレーザー共焦点顕微鏡による観察および核フラクション回収後、タイター測定により確認した。また、マイクロインジェクションし、経時的に GFP の蛍光を発する細胞をカウントすることで、遺伝子発現

の検討を行ったところ、NLS 結合 λ ファージの場合、24 時間経過後、約 50% の細胞に遺伝子発現が認められた。対照として λ DNA をインジェクションした場合、全く遺伝子発現が認められなかった。さらに、Lipofectin により、COS-7 細胞にトランスフェクションし、48 時間後のルシフェラーゼ活性を測定したところ、NLS 結合 λ ファージは、野生型 λ ファージの約 30 倍、 λ DNA の 4 倍、活性が高かった。以上より、NLS 依存的に遺伝子発現が向上することが示された。

【総括】

SV40 ラージ T 抗原由来の 32 アミノ酸の核移行シグナルを結合した λ ファージは、動物細胞の核にターゲティングすることが分かった。さらに遺伝子発現の向上も確認され、遺伝子治療用ノンウイルスベクターの問題点である DNA の核移行の問題解決の糸口となる基礎データを提示できた。

論文審査の結果の要旨

遺伝子治療用ベクターは、ウイルスベクターとノンウイルスベクターの 2 つに大別されるが、そのうちノンウイルスベクターの最大の問題は、導入遺伝子の核内到達率が極めて低く、治療用遺伝子の十分な発現が達成できない点にある。特に細胞質と核の間は核膜で隔てられており、核膜孔を介して分子の往来がある。従って、DNA などの巨大分子を核移行させるには、核膜孔通過可能なまでに DNA を凝縮し、核移行シグナル (NLS) を利用して、核内にデリバリーさせる必要がある。しかしながら、第一段階の DNA の均一凝縮粒子を調製することが極めて困難であり、研究は遅々としている。我々は、DNA の均一凝縮粒子を調製する手段として大腸菌にて大量調製可能なラムダファージに着目し、頭部の正二十面体を構築する gpD 蛋白質の N 末端に SV40 ラージ T 抗原由来の 32 mer の NLS を提示させた NLS-ファージを調製し、DNA の核移行と遺伝子発現向上に向けて検討をおこなった。

NLS-ファージに NLS-gpD が頭部にアセンブリーし、かつ NLS がエпитープが表面に提示されていることは、抗 NLS 抗体を用いたウエスタンブロッティングおよび importin α を用いた *in vitro* 結合吸収実験により確認した。また、電子顕微鏡観察により、野生型ファージとほぼ同じ 55 nm であることも確認した。ヒト胎児肺細胞 HEL-R66 の細胞質にマイクロインジェクションしたところ、核に集積することを共焦点レーザー顕微鏡による観察および核フラクション回収後、ファージタイターを測定により確認した。また、遺伝子発現を検討したところ、NLS ファージは、野生型の 30 倍、naked DNA の 4 倍遺伝子発現の向上がみられた。

本研究は、遺伝子治療用ノンウイルスベクターの問題点である DNA の核移行の問題解決の糸口となる基礎データを提示した内容であり、学位の授与に値すると考えられる。