

学 位 論 文 題 名

Fusion of HIV-1 Tat protein transduction domain to poly-lysine as a new DNA delivery tool

(HIV-1 Tat タンパクのタンパク導入領域とリジン重合体の融合ポリペプチドによる新しい遺伝子導入法)

学位論文内容の要旨

目 的

今日、癌の遺伝子治療が提唱され、いくつかの臨床試験が試みられている。治療遺伝子の有用な担い手として様々なウイルス由来のベクターが開発されつつあるが、臨床的に投与されるウイルスには克服されるべき課題が多く残されている。その一つが抗原性の低いベクターの開発である。抗原性を抑えたウイルスベクターの開発はこれまでに数多く報告されているが、ウイルス自体が複数の大きなタンパクで構成されていることが原因で、その調製は非常に困難であった。そこで、低分子ポリペプチドを用いた新しい遺伝子導入方法を構築することを目的として、本研究を行った。

材 料 と 方 法

合成ポリペプチド：3種の pK 融合ポリペプチド (TAT-pK, RGD-pK, GGG-pK) と pK 配列をもたない TAT ペプチドは Hokkaido System Science 社にて solid phase 法を用いて合成された。

DNA/ペプチド複合体のアガロースゲル電気泳動：0.5 $\mu$ g の DNA ( $\lambda$  DNA/Hind III digest) とポリペプチドを混合し室温に 10 分間おいた後、0.5  $\mu$ g/ml エチジウムブロマイドを含んだ 1%アガロースゲルと TBE バッファーにて 100V の電圧で 30 分間電気泳動を行った。

培養細胞株への遺伝子導入： $2 \times 10^4$ - $1 \times 10^5$  個の細胞株をプレート上で培養し、6 時間後、DNA/ペプチド複合体を FCS 非添加培養液中で加えた。8 時間後 10%FCS 添加培養液を加え、さらに 48 時間培養後に遺伝子発現を検討した。

ルシフェラーゼアッセイと紫外線顕微鏡による EGFP 発現の解析：ルシフェラーゼアッセイは Luciferase Assay System (Promega 社) を用いて施行され、発光強度は Mini Lumat LB 9506 (BERTHOLD 社) を用いて測定された。EGFP 発現は蛍光顕微鏡 (Olympus 社)

にて検討した。ペプチドによる細胞毒性の検討： $2 \times 10^4$  個の細胞を様々な濃度のペプチドを含んだ培養液で 72 時間培養した後、 $10\mu\text{l}$  の WST-8 (和光純薬社) を加え 4 時間反応させた後マイクロプレートリーダーを用いて 490nm の吸光度を計測した。

**Flow cytometry 解析**：FITC でラベルした DNA フラグメントと各ポリペプチドを様々な濃度で混合した後、HEK293 細胞に暴露した。暴露後、細胞を 2mM EDTA 入りの PBS で  $37^\circ\text{C}$ 、5 分間処理した後、Becton Dickinson FACScan analyzer (Becton Dickinson 社) を用いて解析を行った。

## 結 果

電気泳動度の変化によるポリペプチドと DNA の結合の検討：全てのポリペプチドにおいて、対 DNA 重量比が 1 以上になったところで、混合物は泳動されなくなった。

ポリペプチドによる EGFP, ルシフェラーゼ遺伝子導入：TAT-pK/pcDNA-EGFP で処理された HEK293 細胞において、約 5% の細胞で EGFP の発現が認められた。一方、GGG-pK, RGD-pK/pcDNA-EGFP で処理された細胞においては、EGFP の発現は 1% 未満の細胞でのみ確認された。ルシフェラーゼアッセイでは、pK による遺伝子導入がペプチドの濃度に依存して増加していた。TAT-pK においては低濃度のペプチドにおいても高い遺伝子導入効率が認められた。pK 配列をもたない TAT による遺伝子導入効率は、pK と比較して低値であった。

**Flow cytometry 解析**：GGG-pK と RGD-pK による DNA の細胞膜接着はほとんどみられなかったが、TAT-pK においては 60 分の暴露でほとんどの細胞への接着が確認された。TAT-pK/DNA 複合体暴露後 1 時間で、核においても FITC の蛍光が認められた。

細胞毒性の検討：高濃度のペプチドに暴露で細胞毒性を認めたが、遺伝子導入に用いる濃度での細胞毒性は認められなかった。

遺伝子導入の機序の解析：TAT-pK による遺伝子導入効率は塩化アンモニウム、クロロキンの濃度に依存して増幅された。

各種細胞株に対する TAT-pK の遺伝子導入：TAT-pK による遺伝子導入効率はリポフェクション法と比較して、12 種の癌細胞株中 11 株において良好であった。

## 考 察

86 アミノ酸からなる HIV-1 の Tat タンパクの 47-57 番目のアミノ酸配列 (YGRKKRRQRRR) を他のタンパクと融合させると、そのタンパクを細胞内に能動的に移送することが可能となることが報告されている。一方、ポリアルギニンやポリリジンなどの、正に帯電したアミノ酸重合体は、負に帯電している DNA と結合することが知られている。これらを融合させたポリペプチド TAT-pK が DNA と結合し、細胞内に効率よく遺伝子を導入することが確認され、その機序はエンドサイトーシスによるものと考えられた。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛  
副 査 教 授 秋 田 弘 俊  
副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

### Fusion of HIV-1 Tat protein transduction domain to poly-lysine as a new DNA delivery tool

(HIV-1 Tat タンパクのタンパク導入領域とリジン重合体の融合ポリペプチドによる新しい遺伝子導入法)

今日、遺伝子治療において臨床的に投与されるウイルスには克服されるべき課題の一つが抗原性の低いベクターの開発である。抗原性を抑えた低分子ポリペプチドを用いた新しい遺伝子導入方法を構築することを目的として、本研究を行った。

HIV の構成蛋白質である TAT の 47 番目から 57 番目の 11 アミノ酸 (YGRKKRRQRRR) は細胞膜を通過することが知られ、protein transduction domain (以下、TAT-PTD) と呼ばれている。アミノ酸のうち positive charge を有する Lysine が DNA と結合するため、TAT-PTD と Lysine のポリマーである polyLysine (以下、pK) との融合蛋白質 TAT-pK が、新しい遺伝子導入法として有用であるかについて検討した。

使用した合成ポリペプチドは 4 種類で、TAT-pK のほか、コントロールとして、アデノウイルス由来の RGD 配列と pK との合成ポリペプチドについてもあわせて検討した。

各種ポリペプチドと DNA を混合し電気泳動を行ったところ、いずれのポリペプチドにおいても、ポリペプチドの比が増加するにしたがって、電気泳動の度合いが低下し、DNA との電氣的結合が確認された。各種のポリペプチドと pcDNA-EGFP とを混合し、HEK293 細胞に曝露したあと EGFP の発現を蛍光顕微鏡にて観察したところ、pK 単独および RGD-pK では 1% 程度の発現であったのに対し、TAT-pK では 5% 程度の細胞で EGFP の発現が観察された。また、ルシフェラーゼアッセイでは、低濃度の TAT-pK においても高い遺伝子導入効率が認められた。FITC にて標識した DNA フラグメントとポリペプチドを用いて、ポリペプチド/DNA 複合体の細胞膜への接着を FACSscan にて検討した結果 pK 単独および RGD-pK による DNA の細胞膜への接着はほとんどみられなかったのに対し、TAT-pK では曝露後 60 分でほとんどの細胞への接着が確認された。TAT-pK/DNA 複合体が細胞膜を通

過する機序として、従来 TAT-PTD は細胞膜を直接貫通し細胞内にとりこまれると報告されているのに対し、今回の検討では、エンドサイトーシスによる機序も関与していると推測された。また TAT-pK による細胞毒性は遺伝子導入に用いる濃度での細胞毒性は認められなかった。またクロロキンとの併用により、12 種類の癌細胞株のうち 11 株でリポフェクタミンに比べより良好な導入効率が得られた。以上より TAT-pK は新しい非ウィルスベクターとして有用である可能性が示唆された。

口頭発表において、秋田教授より、他の種類の細胞株（浮遊系細胞など）での検討の有無、今回の研究からえられた至適条件、in vivo での検討の有無・可能性などについて質問があった。ついで加藤教授から、ウィルスベクターとの導入効率の比較、細胞間での遺伝子導入効率の差、遺伝子導入の Targeting について、実験の最もユニークな点についての質問があった。最後に、今村教授から、細胞毒性の機序、細胞膜を通過する機序、幹細胞を使った遺伝子導入の可能性について質問があったが申請者はおおむね妥当な回答をした。

新しい非ウィルスベクター、TAT-polyLysine は遺伝子導入効率、遺伝子導入の機序、細胞毒性について検討し、新しい非ウィルスベクターとして有用である可能性を示唆した本研究の意義は大きく、審査員一同協議の結果、本論文は博士（医学）の学位授与に値するものと判定した。