

哺乳類細胞における人工遺伝子ネットワークの構築

中西 秀之^{1,2}・齊藤 博英^{2*}

はじめに

我々の体を構成する細胞は、細胞内あるいは周囲の環境に応じて遺伝子発現を制御するためのネットワークを有しており、これにより生体を適切な状態に保っている。近年、合成生物学分野の進展とともに、こうした内在遺伝子ネットワークと人為的に導入した外来遺伝子を相互作用させることで新たな人工遺伝子ネットワークを細胞内に構築し、これを生命機構の解明や医療に役立てようとする試みが進められている。

本稿では、哺乳類細胞における人工遺伝子ネットワークを構成する種々の遺伝子発現制御技術とその応用について紹介する。

発現制御の手法

外来遺伝子発現制御の手法としては、ドキシサイクリンなどの薬物の投与や、光などの物理刺激によって人為的に任意のタイミングで発現のON/OFFを切り替えるためのものが多く知られているが、本項では細胞内、あるいは生体内の状況に応じた自律的な発現制御が可能なものについて取り上げる。

発現制御のメカニズムとしては、目的遺伝子の転写を担う転写因子のDNAへの結合や核移行を制御するもの、メッセンジャーRNA (mRNA) とタンパク質またはmicroRNAとの結合によりスプライシングや翻訳を制御するものなどがある。以下、各制御手法のメカニズムについて述べる。

細胞内環境特異的制御配列の利用 細胞種特異的に遺伝子を発現させる制御配列はSurvivinプロモーター(がん細胞特異的)、MCKプロモーター(筋細胞特異的)などいくつか知られており、これらを外来遺伝子の制御配列として用いることで、細胞種特異的な発現制御が可能である^{1,2)}。しかしながら、こうした制御配列は標的以外の細胞でも遺伝子を発現させる場合や、発現レベルが低い場合がある点に注意する必要がある。

また、cAMP response element (CRE)、Nuclear factor of activated T-cells response element (NFAT-RE)といった制御配列はそれぞれcAMP濃度、カルシウムイオン濃度の上昇により発現を誘導するため、これらを外来遺伝子の制御配列として用いることで、細胞内cAMPやカルシウムイオン濃度変化に応じた発現制御も可能である。さらに、これらを制御配列として有する外来遺伝子

と、cAMPやカルシウムイオン濃度の変化を引き起こす受容体の遺伝子を共に導入することで、その受容体のリガンドとなる生体分子の濃度に応じた発現制御も可能となる。

例としてRossgerらは、ドーパミン結合時に細胞内cAMP濃度を上昇させるドーパミン受容体D1と、CREを制御配列としてもつ治療遺伝子を組み合わせ、ドーパミン濃度に応じて治療遺伝子を発現させる手法を報告している³⁾。

また、生体分子ではなく物理刺激に応じた発現制御を行った例として、熱によりカルシウムイオン流入を引き起こすイオンチャネルであるTRPV1と、NFAT-REを制御配列としてもつ遺伝子を組み合わせたものがある。Stanleyらのこの研究では、電波と磁性ナノ粒子による加熱を介して人為的な外来遺伝子の発現誘導を行っている⁴⁾。

転写因子-DNA間の結合の制御 DNA結合タンパク質の中には低分子化合物濃度や温度変化などにより標的DNA配列への結合能が変化するものがある。これらのDNA結合タンパク質と転写活性化または抑制ドメインの融合により人工転写因子を作製し、これらの人工転写因子の標的配列を外来遺伝子の制御配列として用いることで、細胞内環境に応じた発現制御が可能となる。

用いられるDNA結合タンパク質の例としては、細胞内の酸素濃度や栄養状態の指標であるNADH濃度が高いと標的DNA配列から解離するNADH-responsive transcriptional repressor (REX)⁵⁾、37°Cでは標的DNA配列に結合するが41°Cでは解離するHeat shock response regulator (RheA)⁶⁾、痛風や腫瘍崩壊症候群により上昇する尿酸により標的DNA配列から解離するhypothetical uricase regulator (HucR)⁷⁾などがあげられる。

また、転写活性化ドメインとしては単純ヘルペスウイルス由来VP16タンパク質の転写活性化ドメインや、それを4コピー連結したVP64が主に用いられる^{5,6)}。こうした転写活性化ドメインを用いた人工転写因子で発現制御を行う場合、制御対象となる外来遺伝子の制御配列としては、当該人工転写因子の標的DNA配列の下流にミニマルプロモーターを配置したものを用いる。ミニマルプロモーターは転写開始点を規定するものの、単独では転写を誘導できないため、人工転写因子が結合した場合のみ、転写が行われる(図1A)。

逆にKruppel-associated box (KRAB) タンパク質の

著者紹介 ¹ 独立行政法人日本学術振興会 E-mail: h.nakanishi@mail.cira.kyoto-u.ac.jp

^{2*} 京都大学IPS細胞研究所未来生命科学開拓部門(教授) E-mail: hirohide.saito@cira.kyoto-u.ac.jp

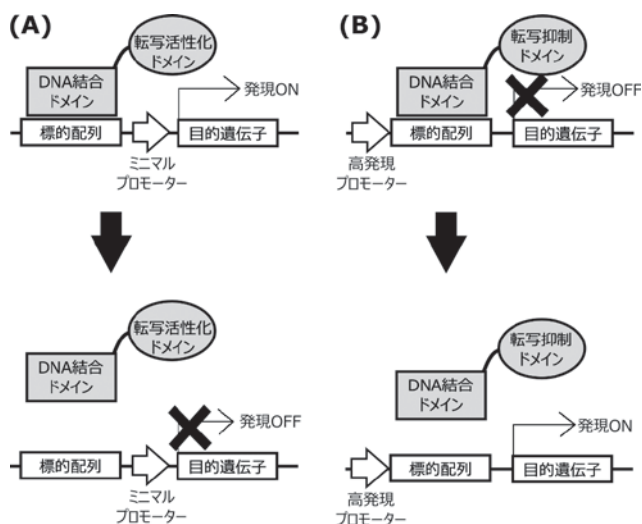


図1. 人工転写因子による発現制御. 人工転写因子のDNA結合ドメインと、その標的DNA配列との結合は低分子化合物や温度などによって変化する。(A) 転写活性化ドメインを有する人工転写因子の場合、結合時は発現がONになり、解離時はOFFになる。(B) 転写抑制ドメインを有する人工転写因子の場合、結合時は発現がOFFになり、解離時はONになる。

転写抑制ドメインのような転写抑制ドメインとDNA結合タンパク質を融合させることで、標的DNA配列への結合時のみ転写を抑制する人工転写因子も開発されている。こうした人工転写抑制因子で発現制御を行う場合、制御対象となる外来遺伝子の制御配列としては、高発現プロモーターの下流に当該人工転写因子の標的DNA配列を挿入したものをを用いる(図1B)⁷⁾。

RNAアプタマー-タンパク質間の結合による細胞内機構のmRNA, shRNAに対する作用の制御 ここまでは転写制御の手法について述べてきたが、転写によって生じたmRNAがタンパク質へと翻訳されるまでの過程を制御することも可能である。

RNAは分子内または分子間相補鎖形成により複雑な二次構造を取り得るが、こうした二次構造を形成するRNAの中には、特定の低分子化合物やタンパク質に結合する性質を有するものもあり、それらをRNAアプタマーと呼ぶ。このRNAアプタマーの配列をmRNAやshort hairpin RNA (shRNA)に挿入することで遺伝子発現を制御する例がいくつか報告されている。

一つは、イントロンに特定のタンパク質に結合するRNAアプタマーを挿入し、標的タンパク質の有無によりスプライシングを制御し、異なる成熟mRNAを作らせるものである。標的タンパク質が存在しない場合、スプライシング後の成熟mRNAにはすべてのエキソンが含まれる。一方、標的タンパク質が存在する場合、RNAアプタマーへの標的タンパク質結合により、スプライソソームによるスプライシングサイト認識が阻害され、RNAアプタマーが挿入されたイントロンの直後のエキ

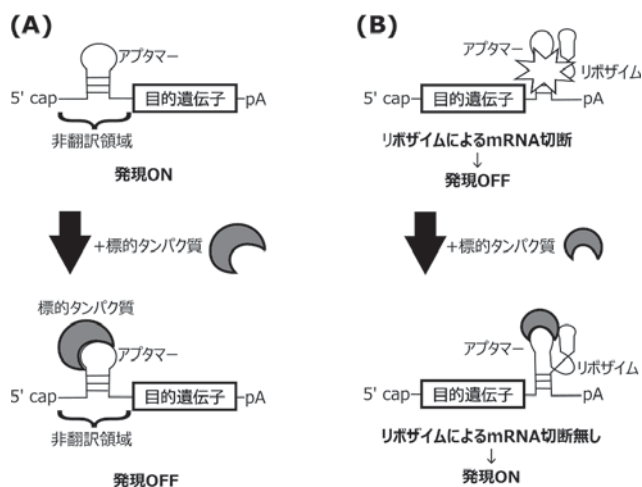


図2. RNAアプタマー-タンパク質間の結合による発現制御. (A) mRNAの非翻訳領域に含まれるRNAアプタマーにその標的タンパク質が結合すると、翻訳機構とmRNAとの相互作用が阻害され、mRNAの翻訳が抑制される。(B) リボザイムに付加されたRNAアプタマーに標的タンパク質が結合すると、リボザイムによるmRNAの分解が抑制され、目的遺伝子の発現がONになる。

ソンが除かれた成熟mRNAが作られる。Cullerらの研究では、この標的タンパク質結合により除かれるエキソンに終止コドン挿入し、蛍光タンパク質やプロドラッグ活性化酵素の遺伝子をその下流に配置している。これにより、標的タンパク質を発現している細胞でのみこれらの遺伝子を高発現させられるため、細胞特異的なイメージングや細胞死誘導が可能であると報告されている⁸⁾。

もう一つは、mRNAの非翻訳領域にRNAアプタマーを挿入し、標的タンパク質の有無により翻訳を制御するものである。筆者らは古細菌由来のタンパク質であるL7Aeに結合するRNAアプタマーをmRNAの5'非翻訳領域または開始コドン直下に挿入することで、このmRNAからの翻訳が、L7Ae存在下で顕著に抑制できることを示した(図2A)^{9,10)}。

さらに筆者らの研究室では、タンパク質の結合によって目的遺伝子の発現がOFFになる上記のシステムとは逆に、標的タンパク質(L7AeやBS15など)存在時に目的遺伝子発現がONになるシステムの開発にも成功している。この場合、標的因子結合アプタマーの直後にナンセンス変異依存mRNA分解(nonsense-mediated mRNA decay; NMD)を引き起こす配列があり、さらにその下流にinternal ribosome entry site (IRES)を挟んで目的遺伝子が配置されている。標的因子非存在時にはNMDによってmRNAが分解されてしまうため目的遺伝子は発現しない。一方、標的因子がアプタマーに結合するとNMDを引き起こすナンセンス変異上流の翻訳が阻害され、mRNAの分解が抑制されることによって、IRESを介した翻訳により目的遺伝子が発現する仕組み

である¹¹⁾。

また、mRNAの場合と同様に、shRNAのループ領域にアプタマーを挿入することで、標的タンパク質結合時にはDicerによりshRNAがsiRNAへと切断されるのを抑制し、それによりsiRNA活性を制御することも可能である^{10,12)}。

RNAアプタマーによるリボザイム活性の制御 二次構造を取るRNAの中には酵素活性を有するものもあり、それらはリボザイムと呼ばれる。RNA切断活性をもつリボザイムをmRNAの非翻訳領域に挿入した場合、mRNAは切断され、その翻訳は阻害される。ここで、リボザイムに対し、特定のタンパク質に結合するアプタマーの配列を付加した場合、標的タンパク質の結合によりリボザイム活性が阻害される。その結果、mRNAは切断されないため、目的遺伝子は発現する(図2B)。

例としては、Ausländerらによって報告された、RNA切断活性を有するハンマーヘッドリボザイムをレポーター遺伝子の非翻訳領域に挿入し、さらにこのハンマーヘッドリボザイムにフェージ由来N-ペプチドの結合モチーフであるnutR-boxBを付加したものがあつた。このリボザイムによる目的遺伝子mRNAの切断はN-ペプチドの結合により抑制されるため、N-ペプチド存在下でのみ目的遺伝子が発現するのである¹³⁾。

microRNA-mRNA間の結合による制御 マイクロRNA (microRNA) は相補的な配列をもつmRNAと相互作用し、それらの標的mRNAからタンパク質が作られるのを抑制する役割をもつ22塩基前後のRNAである。細胞はその種類や状態に応じてさまざまな異なるmicroRNAを発現しており、それらのmicroRNA発現パターンの違いが、細胞種ごとに異なる遺伝子発現制御の一翼を担っている。外から導入する遺伝子の場合も、これらのmicroRNAの標的となる配列を非翻訳領域に挿入しておくことで、内在遺伝子と同様の細胞種に応じた発現制御を受けさせることが可能である(図3)。

最近筆者らの研究室では、目的の細胞種特異的に高発現しているmicroRNAの標的配列をもつmRNAを試験管内転写反応により人工的に合成し、この人工mRNAを細胞に直接導入することで、そのmRNAからの蛍光タンパク質翻訳に対する抑制力(OFF)の強さを指標に目的の細胞種を自在に選別できる新たな手法を開発した¹⁴⁾。この手法は幹細胞分野へ応用可能である。これまで、細胞表面の抗原を認識する抗体を用いて細胞を選別する方法が主流であったが、標的細胞特異的に結合する抗体が存在しない場合も多いことが課題であった。本手法では、従来法で選別が困難な細胞も選別できる可能性がある。実際に、目的の細胞で発現するmicroRNAに反応する人工mRNAを設計することで、ヒトES細胞やiPS細胞から分化誘導した心筋細胞、内皮細胞、肝細胞やインスリン産生細胞を効率よく選別できた¹⁴⁾。DNAでの

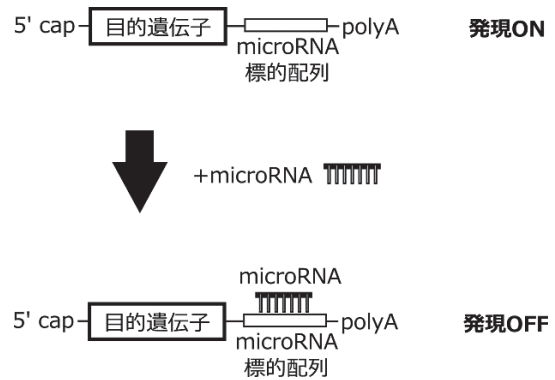


図3. microRNAによる発現制御. microRNAの標的配列(対象となるmicroRNAに対して相補的な配列)がmRNAの5'または3'非翻訳領域に存在すると、microRNAとタンパク質により構成されるRNA-induced silencing complexの働きによりmRNAの切断や翻訳抑制が生じる。

遺伝子導入は外来DNAのゲノムDNAへの組み込みにより内在遺伝子の変異を引き起こす危険性があるのに対し、mRNAを試験管内転写反応で合成して細胞に導入する場合はこのような危険性が低く、細胞内での半減期も約10時間程度と短いため、安全性が高く再生医療に資するさまざまな細胞を今後選別できると期待される。

複数の情報を統合しての発現制御

特定の細胞内環境に応じて遺伝子発現をONまたはOFFにできる制御システムは標的となる細胞のみでの効果発揮を可能とするが、必ずしも一つのシグナルのみで細胞の状態を判断可能な場合ばかりではない。

一例をあげると、がん細胞内には対応する正常組織の細胞(肝がんであれば正常肝細胞)内では発現していないタンパク質も存在するが、それらのタンパク質ががん細胞以外の細胞にはないかといえそうとは限らず、生殖細胞や幹細胞内には存在する場合もしばしばである。こうした場合に、たとえば「正常肝細胞と肝がん細胞で発現しているタンパク質A」と「がん細胞と生殖細胞で発現しているタンパク質B」のどちらか片方のみ反応するシステムでは、正常肝細胞と生殖細胞の両方を残したまま、肝がん細胞のみを除くことはできない。しかしながら、AとBの両方が存在する場合にのみ反応するシステムであれば、それが可能となる。このように細胞内環境に関する複数の情報を統合して発現のON、OFFを切り換えられるシステムであれば、より厳密に細胞内環境に合わせた応答が可能である。

前述の例のケースのように、二つのインプットが両方存在する場合にのみアウトプットが有るものはANDゲートと呼ばれる論理回路の一種であるが、その他にも表1に示すような論理演算を行う論理ゲートが存在する。本項では、前述の発現制御手法を組み合わせることで如何にしてこれらの論理ゲートを実現するかについて

表1. 代表的な論理ゲート

ゲート名	インプット1	インプット2	アウトプット
OR	×	×	×
	×	○	○
	○	×	○
	○	○	○
AND	×	×	×
	×	○	×
	○	×	×
	○	○	○
XOR	×	×	×
	×	○	○
	○	×	○
	○	○	×
NOR	×	×	○
	×	○	×
	○	×	×
	○	○	×
NAND	×	×	○
	×	○	○
	○	×	○
	○	○	×

述べる。

転写因子の組み合わせによる論理ゲート

Lohmuellerらは、複数の人工転写因子の組み合わせによるORならびにNORゲートについて報告している。二種類のインプットのうち、どちらか片方でもあれば目的遺伝子の発現がONになるORゲートは、インプットとして標的DNA配列が異なる二種類の人工転写活性化因子を用い、それらの標的DNA配列を目的遺伝子の制御配列としたものである。これら二種類の人工転写活性化因子のどちらか片方でも標的DNA配列に結合すれば、目的遺伝子の転写が引き起こされる(図4A)¹⁵⁾。

逆に、二種類のインプットのうちどちらか片方でもあれば目的遺伝子の発現がOFFになるNORゲートは、標的配列が異なる二種類の転写抑制因子をインプットとしており、それらのうちどちらか一方でも標的配列に結合すれば目的遺伝子の発現はOFFになるが、どちらもない場合はONになる(図4B)¹⁵⁾。

また、Nissimらは一つの人工転写因子を二つの断片に分割し、それぞれにヘテロ二量体化ドメインを融合させて別々に発現させることで、両断片が発現した場合にのみ、完全な転写活性化因子として機能するANDゲ

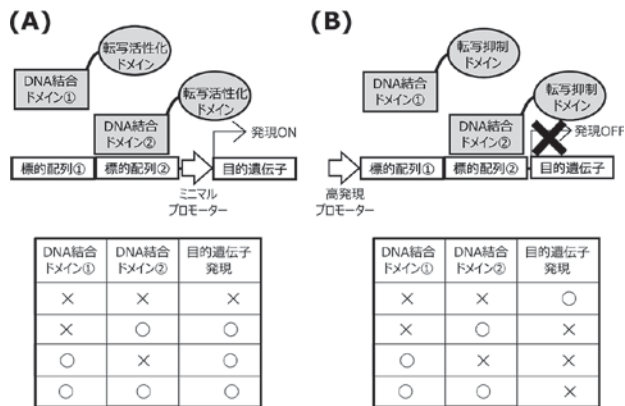


図4. 人工転写因子によるORならびにNORゲート. (A) ORゲート. 標的DNA配列が異なる複数の人工転写活性化因子のうち、何れか一つでも結合すれば目的遺伝子の発現はONになる. (B) NORゲート. 複数の人工転写抑制因子のうち何れか一つでも結合すれば目的遺伝子発現はOFFになる.

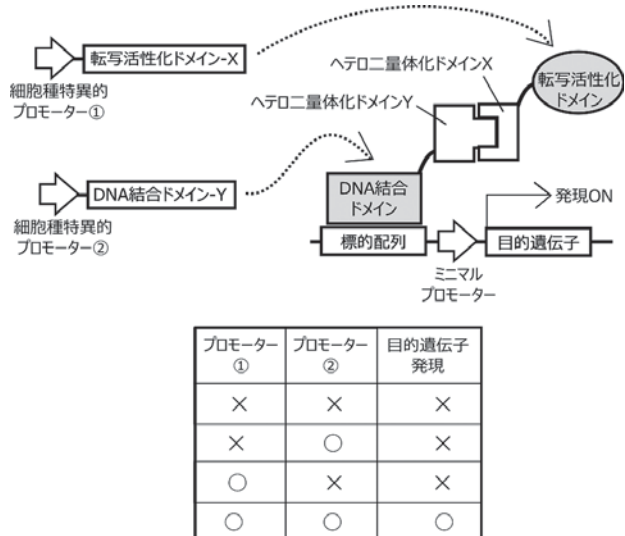


図5. 人工転写因子によるANDゲート. 転写活性化ドメインとDNA結合ドメインの両方が発現した場合にのみ、それらがヘテロ二量体化ドメインを介して完全な転写活性化因子を構成し、目的遺伝子を発現させる。

トを開発した(図5)。このANDゲートにおいて、分割した人工転写因子の両断片をそれぞれ異なるがん特異的プロモーターから発現させた場合、一つのがん特異的プロモーターから分割されていない人工転写因子を発現させた場合よりも、標的となるがん細胞とそうでない細胞の間により大きな目的遺伝子の発現差をつけることができたと彼らは報告している¹⁶⁾。

Lohmuellerらも、転写活性化因子を分割した状態で別々に発現させるANDゲートを報告している。こちらでは、分割された転写因子を一つに合わせる手法として、ヘテロ二量体化ドメインではなく、インテインの作用によるタンパク質スプライシングを利用している。また、彼らは転写活性化因子を分割して発現させることによる

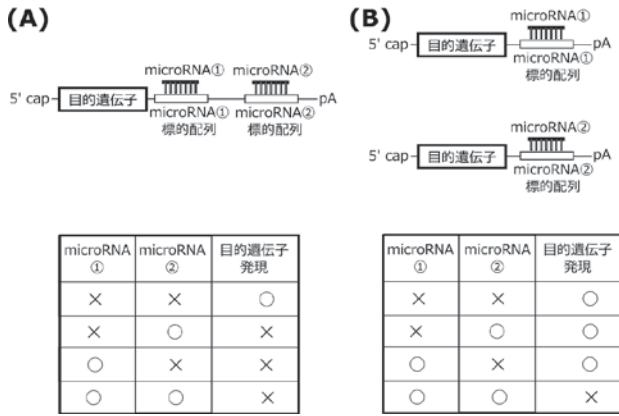


図6. microRNAによる論理ゲート。(A) microRNA ①, ②の何れか片方でもないと目的遺伝子の発現はOFFとなり, 両方がない場合にのみONとなる。(B) microRNA ①, ②の両方がある場合にのみ目的遺伝子の発現はOFFとなり, どちらか片方でもないとONとなる。

ANDゲートだけでなく, 逆に転写抑制因子を分割して発現させ, 分割された両方の断片が存在する場合にのみ目的遺伝子の発現が抑制されるNANDゲートも報告している¹⁵⁾。

microRNAの組み合わせによる論理ゲート Xieらは目的遺伝子の非翻訳領域に複数のmicroRNAの標的配列を挿入することで, これらのmicroRNAがすべて存在しない場合にのみ目的遺伝子を高発現させられることを報告している(図6A)^{17,18)}。

また逆に, 非翻訳領域に異なるmicroRNAの標的配列を有する目的遺伝子を別々に転写させ, 両方のmicroRNAが存在する場合にのみ目的遺伝子の発現がOFFになり, それ以外の場合はONになるシステムも開発している(図6B)¹⁸⁾。

さらに, 目的遺伝子の発現を転写抑制因子によりOFFにし, その転写抑制因子を異なるmicroRNA標的配列をもつ複数のmRNAから翻訳させることで, 両microRNAがある場合にのみ転写抑制因子による抑制が解除され, その結果として目的遺伝子の発現がONになるシステムも構築している(図7)¹⁷⁾。

おわりに

哺乳類細胞は合成生物学において用いられる場合が多い大腸菌と比較すると, 増殖速度やタンパク質産生量, 培養コスト, 遺伝子操作のしやすさなどの観点からは扱いやすいとは言いがたい。しかしながら, 我々自身もまた哺乳類であるが故に, 哺乳類における人工遺伝子ネットワークの構築は遺伝子治療や細胞治療, 薬物スクリーニングなどに結びつき, 我々の社会や生活に大きな影響を与える可能性を秘めている。

現在のところ, 細胞内環境に応じた発現制御の対象となる外来遺伝子として用いられるのはレポーター遺伝子

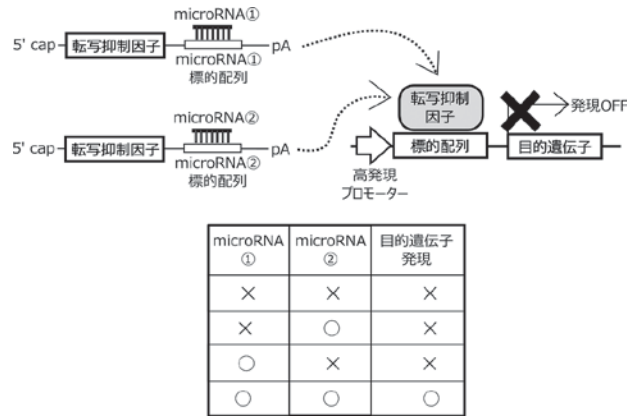


図7. microRNAと転写因子の組み合わせによる論理ゲート. microRNA ①, ②の両方がある場合にのみ転写抑制因子の発現がなくなり, その転写抑制因子によって抑制されていた目的遺伝子の発現がONになる。

や細胞死誘導遺伝子, インスリンなどの治療遺伝子などであり, これらをそれぞれ, 細胞の選別やがん細胞の除去, 遺伝子治療に用いるのが主な用途として提示されている。しかし近年, dCas9などを利用した任意のDNA配列に結合可能な人工転写因子により, 任意の内在遺伝子の発現制御が可能になっている¹⁹⁾点を鑑みると, これら細胞内環境に応じた外来遺伝子の発現制御をさらに内在遺伝子の制御へと結びつけ, 細胞・生体内環境に応じてより自在に自らの遺伝子発現パターンを変化させ, 目的に応じた機能を発揮する細胞システムが構築されるのもそう遠い未来の話ではないと考えられる。

文 献

- 1) Chen, J. S. *et al.*: *Cancer Gene Ther.*, **11**, 740 (2004).
- 2) Weeratna, R. D. *et al.*: *Gene Ther.*, **8**, 1872 (2001).
- 3) Rossger, K. *et al.*: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **110**, 18150 (2013).
- 4) Stanley, S. A. *et al.*: *Science*, **336**, 604 (2012).
- 5) Weber, W. *et al.*: *Metab. Eng.*, **8**, 273 (2006).
- 6) Weber, W. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **31**, e69 (2003).
- 7) Kemmer, C. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **28**, 355 (2010).
- 8) Stephanie, J. C. *et al.*: *Science*, **330**, 1251 (2010).
- 9) Saito, H. *et al.*: *Nat. Chem. Biol.*, **6**, 71 (2010).
- 10) Saito, H. *et al.*: *Nat. Commun.*, **2**, 160 (2011).
- 11) Endo, K. *et al.*: *Nat. Commun.*, **4**, 2393 (2013).
- 12) Kashida, S. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **40**, 9369 (2012).
- 13) Ausländer, S. *et al.*: *Nat. Methods*, **11**, 1154 (2014).
- 14) Miki, K. *et al.*: *Cell Stem Cell*, **16**, 699 (2015).
- 15) Lohmueller, J. J. *et al.*: *Nucleic Acids Res.*, **40**, 5180 (2012).
- 16) Nissim, L. and Bar-Ziv, R. H.: *Mol. Syst. Biol.*, **6**, 444 (2010).
- 17) Xie, Z. *et al.*: *Science*, **333**, 1307 (2011).
- 18) Leisner, M. *et al.*: *Nat. Nanotechnol.*, **5**, 666 (2010).
- 19) Tanenbaum, M. E. *et al.*: *Cell*, **159**, 635 (2014).