

## D207

## 部位特異的ケージドプラスミドを用いた遺伝子発現の光活性化

(東大院工<sup>1</sup>・東邦大理<sup>2</sup>) (正)山口 哲志<sup>1</sup>, 中島 聡<sup>1</sup>, 古田 寿昭<sup>2</sup>, (正)長棟 輝行<sup>1\*</sup>

【緒言】 細胞の機能は、関連遺伝子群の発現や発現抑制によって複雑に制御されている。生体内では、この遺伝子ネットワークが周辺環境からのシグナルに応じて変化し、細胞の機能を高度に調節している。従って、再生医療や細胞治療などの細胞医工学分野において、細胞の機能をより精度良く制御し、効果的且つ安全に利用するには、遺伝子発現を自由自在に外部制御する技術が必要である。近年、遺伝子発現を時空間的に制御する分子ツールとして、ケージド核酸が注目されている。ケージド核酸とは、光分解性の保護基で修飾された核酸のことであり、これまでに、ケージド mRNA、ケージド siRNA などが報告されている。これらの分子を細胞内に導入すると、そのままでは遺伝子発現やノックアウト活性が光分解性保護基によって抑制されている。しかし、細胞に光を照射すると、保護基が分解されて核酸の機能が活性化される。つまり、望みのタイミングに光照射することによって、遺伝子発現が制御できる分子ツールである。

プラスミドは RNA に比べて非常に安定で扱いやすいにも関わらず、ケージドプラスミドはこれまでにほとんど報告されていない<sup>1)</sup>。既往のケージド核酸は、光分解性保護基をランダムに修飾する手法で調製されてきたため、修飾量や修飾位置が不均一である。従って、従来法でケージドプラスミドを調製する場合、遺伝子発現に関わる位置に保護基が修飾されていないプラスミドが混入してしまい、光照射前に遺伝子発現を完全に抑制できない。また、完全に抑制するために平均修飾量を増やすと、光活性化効率が低くなり、細胞毒性のある強い光照射が必要になるという問題があった。そこで、本研究では、プラスミドのプロモーター配列上に光分解性保護基を一つだけ修飾し、弱い光で遺伝子発現を制御できる部位特異的ケージドプラスミドの開発を試みた(図1)<sup>2)</sup>。

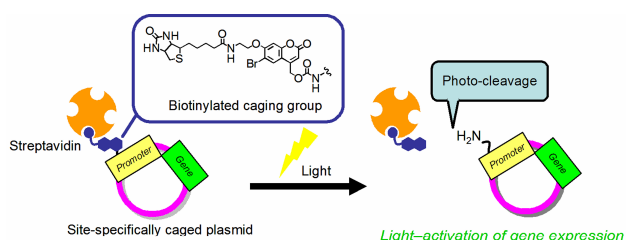


図1. 部位特異的ケージドプラスミドの概念図

【実験方法】 光分解性の6-プロモ-7-ヒドロキシクマリン(Bhc)の7位をビオチン化し、4位にp-ニトロフ

ェニルカルボネート基を導入したビオチン化ケージング試薬を設計・合成した。

緑色蛍光蛋白質発現プラスミドをモデルプラスミドとして実験を行った。プロモーターのTATAボックス近傍の配列を含むオーバーラッププライマーを設計し、順方向プライマーの5'末端をアミノ化した。このプライマーを用いてPCRを行い、TATAボックス近傍が部位特異的にアミノ化されたプラスミドを増幅した。

ケージング試薬とアミノ化プラスミドとを炭酸緩衝液(40 mM, pH8.3)中で反応させ、部位特異的にビオチン化光分解性保護基を修飾した。得られたビオチン化ケージドプラスミドにストレプトアビジンを結合後、動物細胞内に導入し、EGFP陽性細胞率を指標に遺伝子発現を評価した。また、細胞への光照射は、Xeランプ(365±5 nm, 20 mW/cm<sup>2</sup>)を用いて行った。

【結果と考察】 部位特異的ビオチン化ケージドプラスミドにストレプトアビジンを結合して細胞に導入したところ、未修飾のプラスミドを導入した場合と比較して、EGFP陽性細胞率が35%抑制された(図2)。一方、ケージドプラスミド導入細胞に光照射を施した場合、細胞毒性の低い弱い光(0.48 J/cm<sup>2</sup>)でEGFP陽性率が大きく回復した(図2)。

以上の結果より、ビオチン化光分解性保護基をプロモーター配列に修飾してストレプトアビジンを結合させることによって遺伝子発現を抑制することができ、弱い光で光活性化もできることが示された。

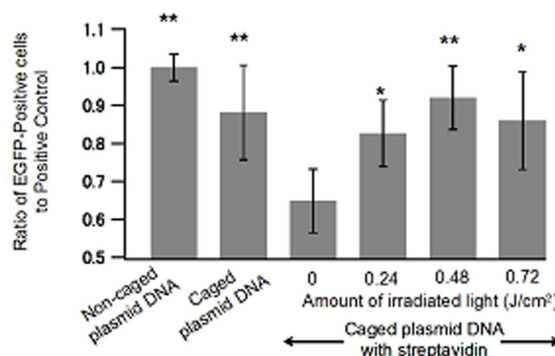


図2. ケージド核酸導入 HeLa 細胞の EGFP 陽性率

【参考文献】 (1) Monroe W. T., et al, *J. Biol. Chem.*, **274**, 20895 (1999), (2) Yamaguchi S., et al, *Chem. Comm.*, in press

\*Tel: 03-5841-7356, Fax: 03-5841-8657  
E-mail: nagamune@bio.t.u.tokyo.ac.jp