

刺激応答性プロモーターの構築

富山大学大学院医学薬学研究部

放射線基礎医学講座 小川 良平

< 緒言 >

癌の遺伝子治療において、治療用遺伝子の発現を放射線照射刺激により制御できれば、空間的、時間的な治療用遺伝子の発現制御による副作用の軽減や、放射線の治療の効果との相乗性も期待できる。遺伝子発現は、プロモーター上の TATA box などへの基本転写因子の結合に加え、刺激により活性化する転写因子の転写因子結合配列への結合を介して亢進する。そこで、放射線照射刺激により増強する細胞内酸化ストレスにより活性化する転写因子の結合配列をランダムに連結し、TATA box 配列に結合することで放射線照射に敏感に反応するプロモーターの構築を試みた。さらに、その DNA 配列にランダムに変異を導入することで、プロモーターの放射線に対する反応性の改良について検討した。

< 実験 >

放射線の照射により増大する細胞内酸化ストレスにより活性化する代表的な転写因子、AP-1(activated protein-1)、NF- κ B(nuclear factor-kappa B)、NF-Y(nuclear factor-Y)、CBF-A(CArG binding factor-A)の結合配列を含む DNA を合成してランダムに結合し、ルシフェラーゼ遺伝子上流に位置する TATA box 配列上流に導入し、11 種類のベクターを構築した。

それぞれのベクターをカチオン性ポリマーにより癌細胞に導入後 18-24 時間後に X 線を照射した。照射一定時間後に回収した細胞の溶解液の一部をデュアルルシフェラーゼアッセイに供し、照射してないものと比較して、ルシフェラーゼ活性の増強の度合いを測定しプロモーターの評価をおこなった。

プロモーター断片中へのランダムな変異の導入は、通常の PCR 反応液に 0.75 mM の MnCl₂ を加えて PCR 反応を行うことにより約 1% の変異が導入される、変異導入型 PCR (epPCR) で行った。

アポトーシスの検出は、細胞を FITC 標識アネキシン V と臭化プロピジウムの二重染色の後にフローサイトメトリーにより行った。

遺伝子操作、塩基配列分析、イムノブロットングなどは常法で行った。

< 結果と考察 >

構築した 11 種類のベクターのうち、クローン#1 およびクローン#11 を含むベクターを導入した DU145 前立腺癌細胞で、10 Gy の X 線照射後 6 時間にルシフェラーゼ活性が有意に増強し、それぞれ、1.7 倍、1.9 倍になることが判明した。次に、最も増強が大きかったクローン#11 を含むベクターを 13 種類の癌細胞に導入して、X 線照射に対する反応性について調べたところ、10 Gy の X 線照射後 6 時間で約 5.1 倍と HeLa 細胞

で最も強い増強が観察された。HeLa 細胞での照射 6 時間後の増強は、20 Gy まで X 線の線量に依存的で、10 Gy の X 線照射後 72 時間でも約 4 倍と増強が長時間に及ぶことが示された。そこで、クロン#11 を含むプロモーター（クロン#11+TATA box）下流にルシフェラーゼ遺伝子の代わりに BAX 遺伝子の cDNA をクローニングし、発現ベクターを構築した。このベクターを導入した細胞では、X 線の照射に应答して BAX タンパクの発現を増強した。放射線誘導アポトーシスの割合も増大したが、放射線を誘導しない場合でもアポトーシスの割合が増大した。

そこで、epPCR 法によりクロン#11 を含むプロモーターの塩基配列にランダムに変異を導入することにより、放射線照射に対する反応性の改良を試みた。クロン#11 を含むプラスミドを鋳型に、MnCl₂ を含む PCR 反応液で PCR 反応を行った。増幅された断片から、5 つの断片をルシフェラーゼ遺伝子の上流にクローニングし、プラスミドベクターを構築した。これらをそれぞれ HeLa 細胞に導入後、5 Gy の X 線を照射し 6 時間後のルシフェラーゼの活性変化を調べた。その結果、クロン#11-9 と命名したプロモーターが、クロン#11 プロモーターの約 2.5 倍に対して、3.5 倍に増強することが示された。さらに、このクロン#11-9 を鋳型に epPCR を行い、42 断片をクローニングした。同様のアッセイを行い、5 Gy の X 線を照射し 6 時間後の活性が約 6.7 倍に増強し、5 Gy の X 線照射によるクロン#11 プロモーターの増強よりも約 2.7 倍の増強度を示すクロン#11-9-37 プロモーターを得た。このプロモーターは、癌の放射線治療において実施される分割照射の線量と同等の 2 Gy の X 線の照射でも照射後 6 時間で非照射のものと比較して約 2.1 倍と有意な増強を示した。

それぞれのプロモーターの構造を調べるために、塩基配列分析を行った。その結果、クロン#11 は、214 塩基からなる DNA 断片で、10 コピーの NF-κB 結合配列、3 コピーの AP-1 結合配列、2 コピーの NF-Y 結合配列さらに 1 コピーの CBF-A 結合配列からなることがわかった。epPCR により導入された変異に関しては、クロン#11-9 で 4 カ所の点変異、クロン#11-9-37 でさらに 2 カ所（計 6 カ所）の点変異が同定された。

<まとめおよび今後の展開>

今回の検討で、適切な転写因子結合配列を選ぶことにより、効率的に放射線照射に应答するプロモーターを構築することができ、さらに、プロモーターの放射線反応性は、ランダムな点変異の導入により改良可能であることが示された。

今後は、使用する転写因子結合配列の選択、多くの断片の構築、徹底した epPCR によるクローンの調製などを通して、さらに放射線照射に反応性の高いプロモーター断片の構築を目指し、放射線治療と遺伝子治療の融合による効率的な癌治療の実現に結びつけたい。

<謝辞>

本研究の一部は文部科学省の科学研究費補助金、および、富山第一銀行財団などの援助により実施した。

略 歴

小川 良平

昭和 61 年 九州大学農学部卒業。

平成 7 年 京都工芸繊維大学博士（学術）。

日本ゼオン（株）生化学研究所、米国農務省 ADOL 研究所、米国国立衛生研究所、
（財）若狭湾エネルギー研究センターを経て平 13 より現職。