

添付2

論文	High-level transgene expression by homologous recombination-mediated gene transfer
雑誌	Nucleic Acids Research, 2011, Vol. 39, No. 15 e104
著者	Me´lanie Grandjean, Pierre-Alain Girod, David Calabrese, Kaja Kostyrko, Marianne Wicht, Florence Yerly, Christian Mazza, Jacques S. Beckmann, Danielle Martinet and Nicolas Mermod
機関	1) Laboratory of Molecular Biotechnology, Center for Biotechnology UNIL-EPFL, University of Lausanne, 2) Service of Medical Genetics, Center Hospitalier Universitaire Vaudois (CHUV), 1015 Lausanne and 3) Department of Mathematics, University of Fribourg, 1700 Fribourg, Switzerland
要旨	<p>1) 真核生物の遺伝子導入とその発現は、安定的に維持される組み込み遺伝子コピー数とエピジェネティックな遺伝子抑制効果により制限される。MARなどの調節配列の利用で、この抑制効果は緩和が可能である(訳注;付表1「抗遺伝子抑制あるいは発現増強に用いられるDNAエレメント」を参照)。</p> <p>2) MAR含有ベクターの連続的な遺伝子導入操作で相乗的な遺伝子発現亢進が起こることを示した(図1A,B,C)。この結果は、当該DNAの核内への輸送量とゲノムへの組み込み数の増加で部分的に説明可能である。</p> <p>3) FISH解析の結果、約1日間隔の2回反復導入は単一部位への組み込みを示した(図1D,E)。反復遺伝子導入操作で、導入プラスミッド間のコンカテマー形成が起こり、複数個のベクターと一緒に組み込まれる単一事象と推論した。理由は以下の通り; MAR含有プラスミッドは色々な場所に組み込まれることが知られており、1回目、2回目の導入プラスミッド間で相互作用がないなら、複数の独立事象として複数部位への組み込みが観察されるはずであるが、否定された。1回目の導入操作によるプラスミッドが既に消費され、相互作用が起こりえない2w後の2回目の導入試験では相加的な結果であったことから裏付けられた。</p> <p>4) 相同組換えが最も活発な時、当該DNAの核内への輸送が起こるため、発現性亢進効果は細胞周期と結び付けられた。非相同末端結合(NHEJ)あるいは相同組換え(HR)の関連因子を欠いた各細胞と野生株を用いた試験の結果、導入遺伝子の効率の良い組み込みとその発現には、MAR含有プラスミッド間の相同組換え(HR)およびタンデムに連なった遺伝子の遺伝子抑制が起こらないことが必要と考えられた(図5)。非相同末端結合関連因子の欠損株は野生株に比べて、2倍強のMAR効果の増幅を示し(図5B)、MAR効果発現におけるHR経路の重要性を際立たせていた。</p> <p><u>結論として、MARのHRを促進する可能性が高いこと、今後、細胞とベクターの細工によってこの性質を利用した高効率遺伝子導入・発現系の構築が可能と考えられる。</u></p>

番号: Selexis_2011_June_Nuc.Acid Res.
分野: MARs(2回反復遺伝子導入にHRが介在).

付表1 抗遺伝子抑制あるいは発現増強に用いられるDNAエレメント(Current Gene Therapy, 2008, 8, 353-366から引用)

Activity/Element *	MAR (Matrix Attachment Region)	Insulator (Barrier or Enhancer-Blocking, e.g. CHS4)	LCR (Locus Control Region)	STAR	UCOE (Ubiquitously acting Chromatin Opening Elements)
Binds to nuclear matrix	Yes	No specific association	Only if it contains a MAR	No	No
Chromatin loop formation	Yes	Yes (enhancer-blocking elements)	Yes	Unknown	No
Insulator activity	Yes (but not all)	Yes	No, but may be exceptions	Yes	No
Transcription activation	Yes	No	Yes	No	Yes
Enhancer	Generally only after integration, but some reports of increased expression in transient assays	No	Yes	No	No
Replication	Yes (pEPI)	Unknown	Unknown	Unknown	No
TF binding site	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Histone binding site	Yes	Yes	Yes	Unknown	Yes
Orientation-dependent effect on transgene	Depends on MAR	Position relative to transgene important	Yes	Unknown	Yes
Position-independent transgene expression	Majority yes	Majority yes	Yes if powerful enough	Yes	Yes
Copy number-dependent transgene expression	Majority no	No	Yes	Yes	Unknown
Tissue-specific	Tissue specificity observed for some	No/unknown	Yes	No	No

【結果】

1. 2回反復遺伝子導入(Iterative transfection) の導入遺伝子発現への効果

- 1) 導入操作の間隔を1日としたMAR(+)-GFPの2回反復導入(2X, 1dayと略)は、MAR(-)-GFPの単回導入(single transfection)に比べ20倍の発現量を示した(図1C)。これはUV励起光無しで日光下でも見えるレベルの非常に高い発現であった(次ページの補遺図S2A)。
- 2) cLysMARとMAR X-29も同様な結果を示し、MARに共通する特徴である可能性が示唆された。
- 3) 他の該プラスミドの構成配列、GFP遺伝子およびSV40プロモータの効果でなかった。
- 4) 遺伝子抑制を受ける細胞集団が0.5%レベルまで減少した(図1B)。
- 5) GAPDHのプロモータでも同じ効果でありSV40特異的なものではなかった。
- 6) Ig産生のCHO細胞で度々見られる細胞分裂時間長くなる現象は、(2X, 1day)細胞群では有意でなく、倍加時間はそのまま高い発現を示す細胞が多数存在した(次ページの補遺図S2B)。

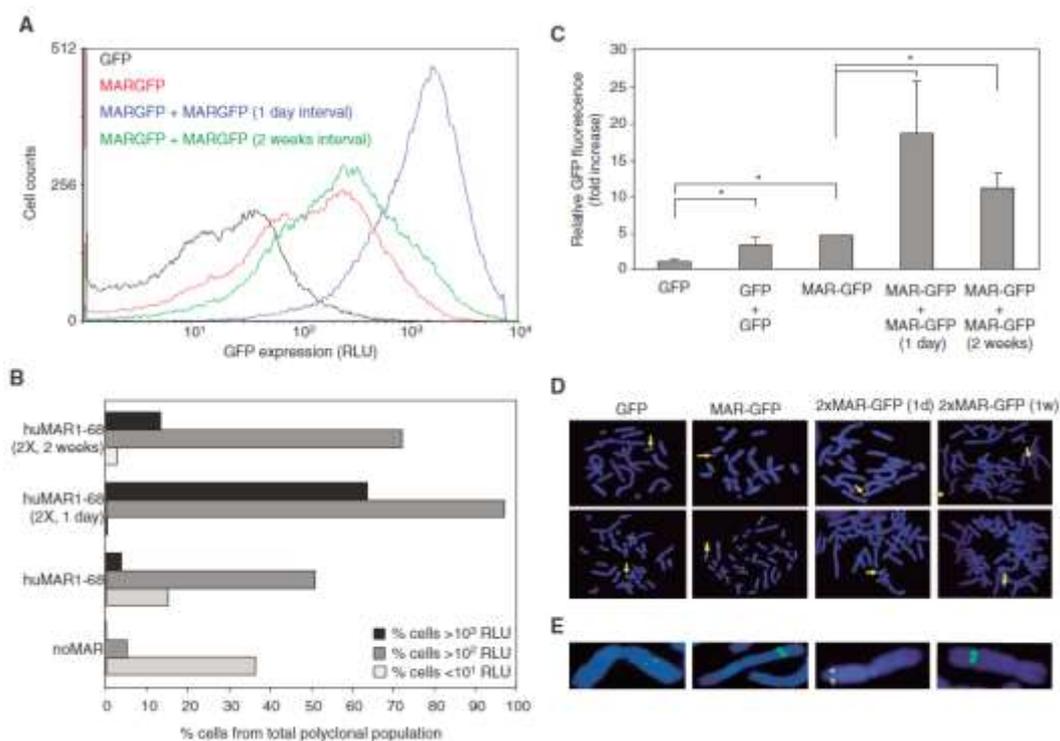


図1. MARとMAR含有ベクターによる2回反復の安定的遺伝子導入の効果

CHO DG44 細胞にGFP発現ベクター(±MAR1-68)とpSVpuroプラスミドを同時導入した(MAR-; GFP, dark line, MAR+; red line、図1A)。これらの細胞の幾つかは、同じ発現ベクターによる2回目の導入に供した(選択用プラスミドはネオマイシン耐性)。2回目の導入は、1回目の次の日(青線)と2週間のピューロマイシン選択培養後(緑線)行った。

フローサイトメトリーによるeGFP 蛍光の定量測定を次の各時点で行った、

- 1) 単回導入の場合;2週間のピューロマイシンによる選択培養後。
- 2) 2回反復導入(1日後)の場合;3週間の両薬剤による選択培養後。
- 3) 2回反復導入(2週間後)の場合;2回目の導入後の2週間のネオマイシン選択培養後。

図1A ポリクローン性細胞集団のGFP蛍光強度の分布。2回の独立した実験の結果。

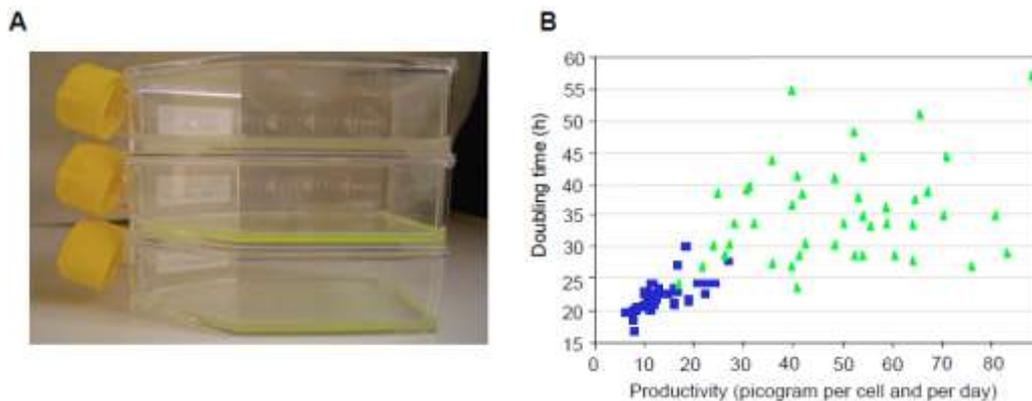
図1B 蛍光強度を3区間に分けた時(図右下)の度数分布図(1Aのデータを解析)

図1C GFP (MARなし)単回導入の値を基準に各細胞プールの相対蛍光強度を求めた。(*Studentのt検定, $P < 0.05$)。

図1D 各被験細胞集団の有糸分裂中期から取った染色体の eGFP 導入部位のFISHによる解析

図1E 蛍光強度の違いを示すための染色体拡大図

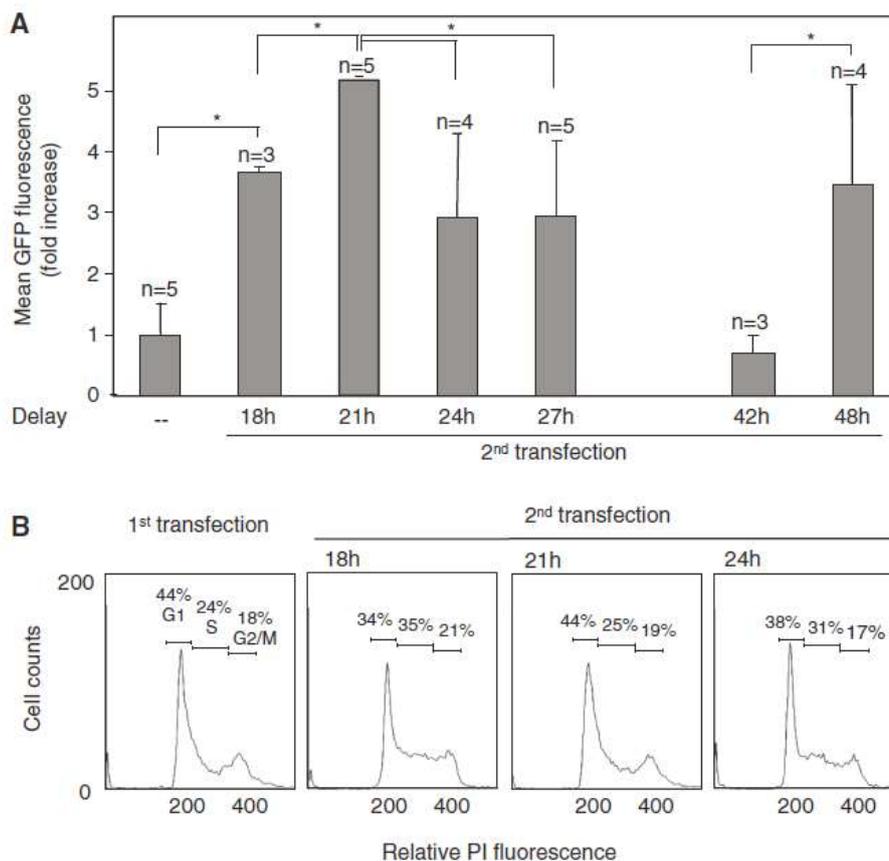
番号: Selexis_2011_June_Nuc.Acid Res.
分野: MARs(2回反復遺伝子導入にHRが介在).



補遺図S2 A; 昼光下で観察できるGFP蛍光 B; 青■は単回導入、緑▲は2回反復導入

2. 2回目の遺伝子導入までの経過時間が発現レベルに影響する一細胞周期との関連性

- 1) 最適経過時間は21時間であり(図1A)、単回導入に比べ平均して5倍の発光強度を示した。
- 2) 1回目と2回目の最適導入時点は、1回目は継代後の18時間と2回目は1回目導入後21時間経過時点であった。PI染色によるDNA量の解析の結果、両時点で、G1期細胞の占める割合が最大(44%)であることが分かった(図2Aと補遺図4B)。
- 3) 導入DNA核輸送の最適な細胞周期のStageがあるのかもしれない。



3. 外来DNA細胞内輸送に対するMARとiterative transfection(2回反復導入)の影響

- 1) 導入遺伝子の核内輸送量をqPCRで定量。MAR-GFP単回導入に比べ2回反復導入は3.8倍量(図3Aの左から2、3番目の棒グラフの比較)。二種の蛍光たんぱく質含有ベクター間で、核内輸送に差がないと仮定すると、2回反復導入の(MAR-GFP+MAR-RED)と(MAR-RED+MAR-GFP)はそれぞれ1回目導入GFP遺伝子量と2回目導入GFP遺伝子量を表すモデルと考えられる。その結果、2回目由来分が大勢を占め1回目分に比べ4.2倍であった(図3Aの左から4、5番目の棒グラフの比較)。このことはローダミン標識した1回目導入遺伝子とCy5標識した2回目導入遺伝子の共焦点イメージングが傍証となっている(図4A)
- 2) MAR(+)と(-)は、若干前者が勝るが同レベルの核内輸送量であり、MARの輸送に対する効果は、少なくとも1回目の導入では明らかではない(図3A)。
- 3) 導入プラスミドの細胞内輸送はエンドソーム/リソソームでの分解で制限される[58]。各細胞内小器官および細胞質でのプラスミドの定量を行った。2回目の導入後21時間経過時点で、MAR(+)プラスミドはリソソームから速やかに逃れ約80%のCy5標識p-DNAが核内に到達した。一方、MAR(-)プラスミドでは約40%以下に留まった(図4B)。MAR(+)の反復導入の効果(図3A、4B)を説明するものである。リソソームコンパートメントの処理能力を1回目のMAR(+)導入が飽和させているなどの可能性が考えられるが、明確な分子機構は現時点では不明である。

4. 導入遺伝子のゲノム組込み量

- 1) 反復導入は単回導入に比べ4倍のゲノム組込みを介在した。これは核内輸送量と釣り合う値である(3A、3B)。MAR(-)に比べ10倍以上のゲノム組込み量である。
- 2) 遺伝子発現量では20倍弱であり(3C)、これは単なる組込み量だけでは説明できない。この差はMARが持つ転写活性亢進能と抗遺伝子抑制効果[39]によるものと考えられる。概して、組込みコピー数と発現量は高い相関がある(図S5A)。
- 3) 高い発現量を示すクローンの培養を浮遊培養系に変えるなど最適化を図っても遺伝子抑制が起こらなかった。MARは、共導入された反復配列の性質やアンチセンス転写物の影響などの発現阻害効果に対する抵抗性を示唆している。
- 4) 総じて、反復導入の効果は、核内輸送とゲノムへの取り込みの向上そしてMARの持つ抗遺伝子抑制効果、転写活性亢進能の相乗効果といえる。

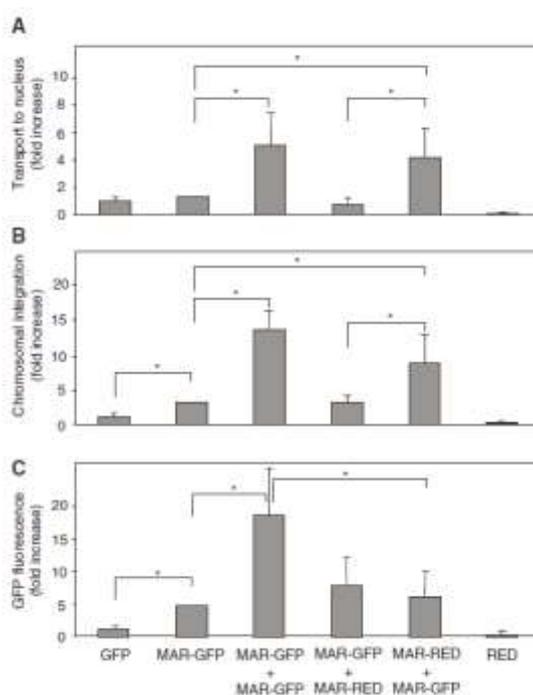


図3 反復導入におけるDNA輸送量、ゲノムへの挿入量、たんぱく質発現量

- A 導入GFP遺伝子の核内輸送量;MAR-GFP+MAR-REDは2回目の導入にMAR-REDを用いた。結果はCHO ゲノムのGAPDH量で補正。4回の独立した導入実験の平均を表している。
- B 3週間選択培養後ゲノムに挿入されたGFP遺伝子を定量。
- C Bの細胞群の発現レベルの測定

番号: Selexis_2011_June_Nuc.Acid Res.
分野: MARs(2回反復遺伝子導入にHRが介在).

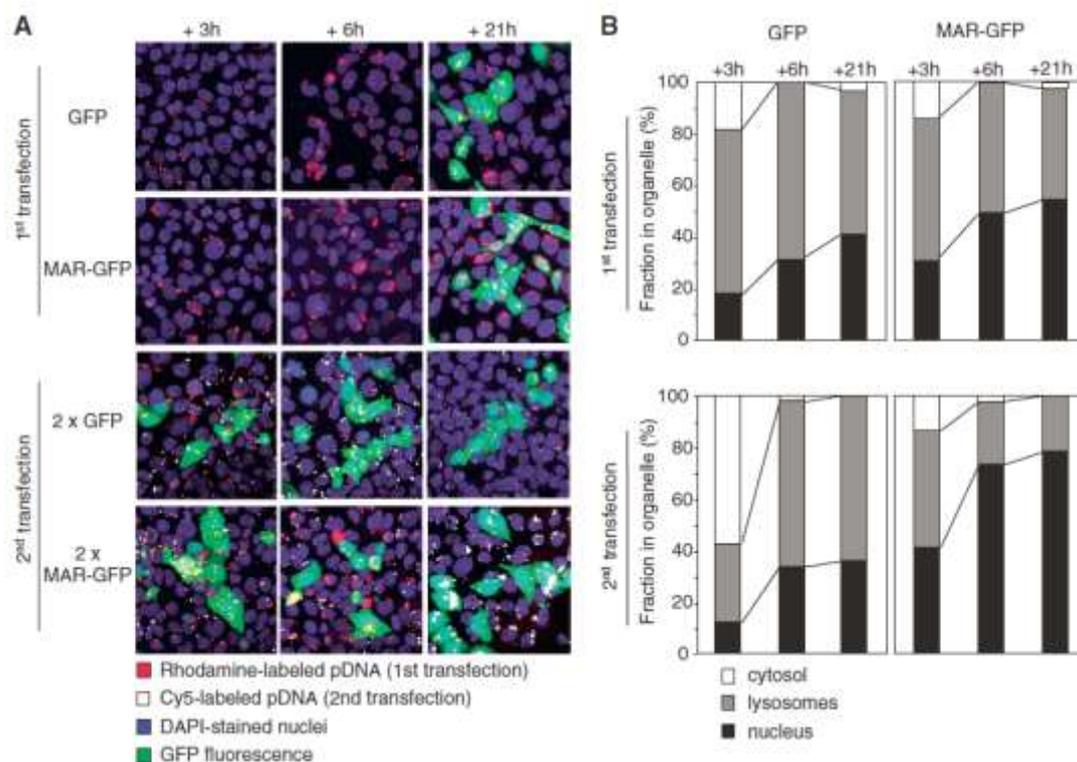


図4 導入DNAの細胞内分布.

(A) 共焦点顕微鏡解析によるDNAの細胞内輸送。CHO細胞に対してローダミン標識あるいはCy5標識のMAR含有プラスミドの単回導入あるいは2回反復導入を行った。導入細胞は導入処理3,6,21時間後に固定、DAPI(Blue)で染色した。GFPの発現細胞は緑に見える。

(B) 細胞内小器官の定量を行った(図A) エンドソーム/リソソームの染色はLysoTracker Red DND-99で行った。

5. DNA相同性のゲノム組み込みと発現への影響

反復導入の結果得られる高いGFP発現は、一部には導入遺伝子の単一の遺伝子座への組み込みの結果と考えられる。そこで、その分子的基礎を検討した。

- 1) ひとつの可能性は1回目の導入によるMAR含有プラスミドの組み込みが2回目の組み込みを促進するというものである。これはMARがクロマチンをアクセス可能な状態に維持できるという特質から期待できる効果で、相同組換えの丁度良い標的を2回目の導入遺伝子に提供している。
- 2) もうひとつの仮説は、反復導入により核内輸送された大量のプラスミドが効率的なコンカテマー化した結果組み込みコピー数が増大するというもの。実際、相同組換えが導入プラスミドのコンカテマー化を経て行われるという報告がある(60)。ゲノムDNAの組換えに際して、多数のプラスミドがコンカテマーとして同時に組み込まれることとなる。後者のモデルでは、相同組換えは、1回目と2回目に導入したプラスミド間で起こるため、組み込み効率と発現効率はDNA配列の相同性に大きく依存することになる。
- 3) そこで、この仮説を評価した。2種類の導入遺伝子(GFP, DsRed)、2つの耐性因子(ampicillin, kanamycin)さらに2種類のMAR(chicken lysozyme MAR, MAR 1-68)の組合せを構成配列とするプラスミドの反復導入を行った。MAR、導入遺伝子、そして耐性遺伝子の違い全てが、同じプラスミドの反復導入で見られた効果を損なった(図5A)。プラスミド間の配列相同性は2回反復導入の効果発揮に必須であることが示唆され、後者の仮説を支持した。

4) 相同組換え修復は、DSB(二本鎖切断)のDNA修復機構として誘起される(61,62)。そこで、環状プラスミッドと鎖状アプラスミッドの性能差を試験した。その結果、環状プラスミッドは相加的以上には反復導入効果を示したが、鎖状プラスミッドの効果より低かった(補遺図S6)。これは、相同組換え過程における鎖状DNAの組換え促進効果の報告と一致するものであった(63)。

6. HRが発現亢進を仲介する

- 1) 反復導入の効果発揮にプラスミッド相同性とDSBが必要とされることはHRの関与を示唆する。
- 2) 導入遺伝子のゲノムへの組込みに非相同性末端結合(NHEJ)と相同組換え(HR)の2種類の拮抗的経路が使われることが提唱されている。両経路は細胞周期の特定の時期に活発であり、例えば、HRはS期とG2/M期にDNA複製の結果生じた損傷の修復に用いられる(64)。古典的NHEJ経路を欠損している細胞はHRに依存したDSB修復を示し、二つの経路が通常競合して修復することを示している(65)。HRを活性化させるとNHEJが不活性化することが酵母、哺乳動物細胞で見られる(65-68)。
- 3) MARの単回あるいは反復遺伝子導入とその高い発現活性にHR関連機構が関わっているか、両経路の重要な因子に突然変異を起こした二つのCHO細胞変異株と野生株を使って検討した。51D1 CHO変異株は相同鎖検索交換反応を触媒するRAD51(strand transferase、大腸菌RecA類似活性のたんぱく質)を欠失したHR欠損株である。一方V3.3 CHOはNHEJ経路開始に重要なDNA-PKの触媒活性を損なっている(13,54,69)。
- 4) 野生株AA8でMARはMAR(-)の3倍のGFP蛍光増強を示した(図5B)。51D1細胞に遺伝子導入した細胞の極僅かが抗生物質選択培養で生き残るが、GFP発現は極めて低レベルであった。対照的に、NHEJ欠損株では単回導入でMAR(-)に比べ6倍以上のGFP発現を示し、さらに2回反復導入では、MAR(-)の35倍程度の増強発現を示した(図5B)。NHEJ経路の不活性化は、MAR(-)の発現には影響しないが、MAR(+)にはその効果を増幅した。MARと高いHR活性の両方が非常に高度な導入遺伝子の発現に必要であった。NHEJ欠損株における組み込みコピー数は2回反復導入ではMAR(-)の25倍であり、発現の35倍に比べ低い。この差は、これまで得られた結果と同じでMARの抗遺伝子抑制と転写活性亢進によると考えられる。

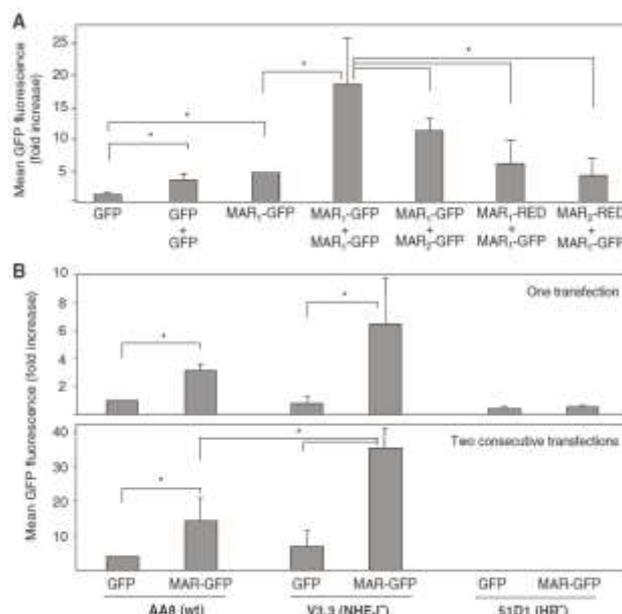


図5. MAR, プラスミッド相同性そしてHRが高い発現性能を実現する

(A) 安定的導入のポリクローン性細胞集団を異なる遺伝子、MAR、そして耐性遺伝子の組み合わせの各種プラスミッドの導入で作成した。4回の独立した導入試験で得た蛍光強度をMAR(-)の測定値の倍率として求め、その平均値、標準偏差を示した。星印は統計的有意を示す (Studentのt 検定, P<0.05)。

(B) MAR(-)GFPと MAR1-68GFPのプラスミッドの安定的導入をCHO親株、AA8、51D1(HR欠損)、そしてV3.3(非相同末端結合経路欠損株)に行った。単回導入(上段)と2回反復導入(下段)を表示した。統計処理はパネルAと同様に行った。

【考察】

省略