

遺伝子を細胞内に運び、 数秒の光照射で発現させる金ナノ粒子

京都大学 高等研究院 物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) の見学美根子(けんがく・みねこ)教授、村上達也(むらかみ・たつや)准教授(現 富山県立大学工学部 教授)らは、金の微粒子を用いて細胞内に遺伝子を運び込み、数秒の光刺激で狙った細胞に好きなタイミングで遺伝子発現を誘導する方法を開発しました。

遺伝子発現とは、遺伝子が持つ情報に基づいてタンパク質分子が合成されることで、いわば「情報」を実際の「生命現象」に変える現象です。遺伝子発現を操作することは生命現象の分子メカニズムを理解するために非常に重要で、複雑に構成された生体組織の中で、任意の細胞に任意のタイミングで、特定の遺伝子発現を誘導する技術が求められています。

遺伝子発現を誘導する一つの方法として、生体が熱ストレスに反応する機構を利用し、42°C前後の高温刺激を与えて誘導する方法は、以前より確立されていました。狙った細胞でのみ温度を上げる方法として、従来細胞内の水分子をレーザー照射で直接加熱する手法が考案されていましたが、適切な温度で安定的な熱刺激を与えることが困難でした。

この問題を解消するため、今回研究グループは、金ナノロッドという約 50 nm(ナノメートル: 1nm は 1mm の 100 万分の 1) のナノ粒子を用いました。金ナノロッドは光を吸収して熱を発生させることや、生体適合性が高いことで知られています。

まず、グループは、熱に反応して発現する蛍光タンパク質遺伝子を作成しました。そして、金ナノロッドに特殊なコーティングを施すことでこの遺伝子を吸着させた上で、細胞内に導入しました。そこで、細胞に近赤外レーザー光を照射すると、照射した細胞内の温度が上昇し、照射中は一定の温度に保たれることがわかりました。また、レーザー光の密度を調整することで細胞内の温度を調整することが可能で、遺伝子発現の誘導に必要な照射時間も大きく短縮されました。

この手法を用いることにより、わずか数秒のレーザー光照射で、1細胞単位で任意の細胞だけに、任意のタイミングで、目的の遺伝子発現を誘導することができました。また、応用的な試みとして、「TRAIL 分子」という、がん細胞と結びつくことでそのがん細胞を殺す機能を持つタンパク質を、光照射による熱刺激で発現させ、周囲のヒトがん細胞が細胞死する現象も確認しました。

組織や生体における遺伝子の機能解析に有用な技術であり、将来的には遺伝子治療への応用が期待される成果です。

本研究成果は英国時間 2017 年 7 月 5 日午前 10 時(日本時間 5 日午後 6 時)に英科学誌 Scientific Reports で公開されました。

1. 背景

遺伝子発現の操作は、生命現象の分子機構の理解に欠かせない技術です。生体は複雑な細胞社会であり、それは様々な遺伝子の発現が時間的、空間的に制御されることで成り立っています。その中から特定の遺伝子機能を操作・解析するためには、組織の一部の細胞で遺伝子発現を任意のタイミングで誘導する技術が求められています。

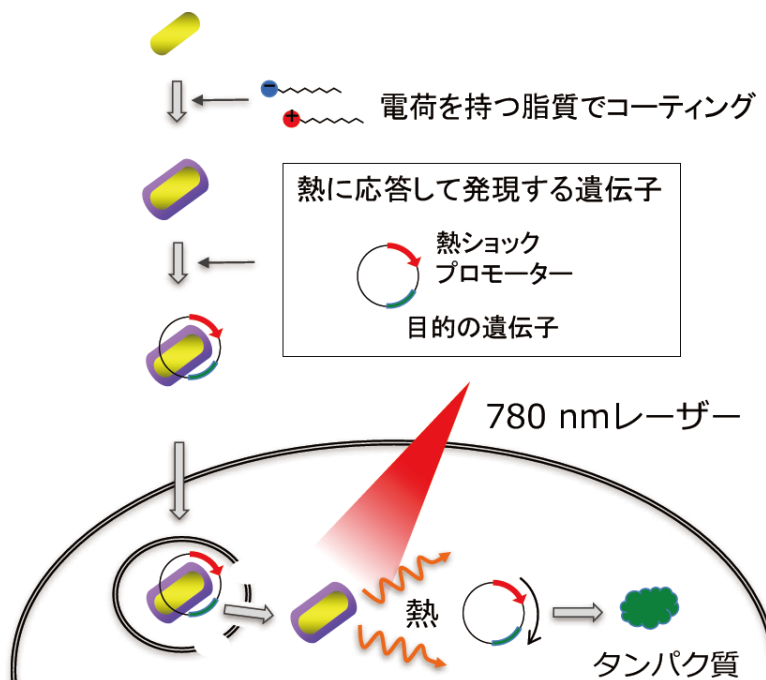
多くの生物は、高温にさらされると熱ショックタンパク質^{※1}を発現し、ストレスに応答します。この機構を利用して、42度前後の高温刺激で遺伝子発現を誘導する実験系が古くから確立されていました。近年、少数の細胞(変温動物および植物由来)を選択的に近赤外レーザー^{※2}で照射し、そこに含まれる水を直接加熱することで熱ショック応答を誘導する手法が開発されていました。しかし、水分子を温めて42度に安定させるのは容易でないため、正常な細胞温度と熱ショック誘導温度が近く、かつ43度で死に始める哺乳動物細胞への応用は限定的でした。

一方、金ナノロッド粒子^{※3}は近赤外光を効率良く吸収して発熱します。このため、細胞に導入すると水分子を直接温めるより弱い照射で安定的に細胞温度を操作できることがわかっていました。また細胞毒性が低く、様々な官能基で自由に表面を修飾することができ、体内における薬物輸送のツールとしても注目されています。そこで本研究では、金ナノロッド粒子を遺伝子キャリアーとして用い、同時に熱ショック誘導のための細胞内ヒーターとして利用することで、遺伝子発現を安全に光誘導する実験系を開発しました。

2. 研究内容と成果

本研究成果のポイント

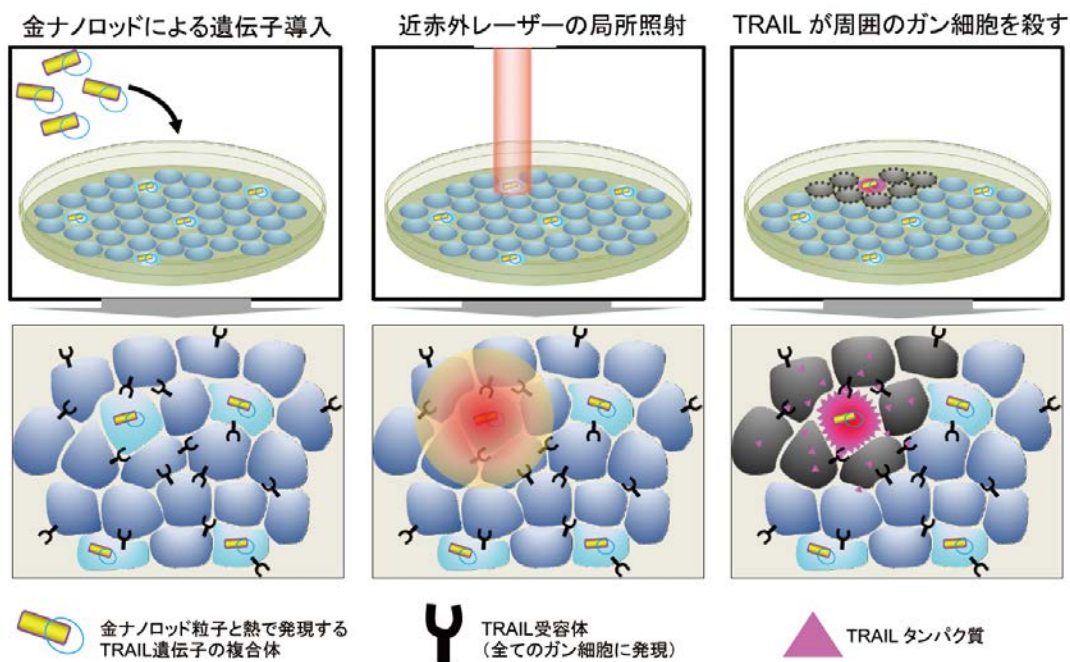
- ✓ 金ナノロッド粒子を用いた高効率で安全な遺伝子導入法の確立
- ✓ 金ナノロッド粒子を用いて数秒の近赤外光照射で遺伝子発現を誘導する技術の確立
- ✓ 一度の細胞導入操作で狙った細胞に任意のタイミングで遺伝子発現させることができる



生理的条件下でDNAは負に帯電しています。DNAが金ナノロッドに吸着しやすくなるよう、金ナノロッド粒子表面が正電荷を帯びるように様々な表面修飾方法を試みました。得られた金ナノロッド粒子のDNA細胞導入効率を比較したところ、オレイン酸^{※4}とDOTAP^{※5}というそれぞれ負と正の電荷を持った脂質で表面修飾した金ナノロッド粒子が最も優れており、細胞生物学実験で汎用される市販の専用脂質を用いて行うリポフェクション法という遺伝子導入法と同等の効率を得られることが明らかになりました。オレイン酸が金ナノロッドの表面に吸着すると、金ナノロッド同士の凝集を防ぐことを我々は以前に報告しており^{※6}、同じ脂質のDOTAPとの親和性が高かったことが成功の原因の1つと考えられます。一方で、このDNA/金ナノロッド複合体粒子はトータルで負に帯電しており、一般的には細胞内に取り込まれにくいと考えられるが、実際には、陽電荷を帯びる他のDNA/金ナノロッド複合体に比べて細胞取込量が低くなることはありませんでした。

次に熱ショックで発現する蛍光タンパク質遺伝子を独自に作製して、上記の金ナノロッド粒子をキャリアーとして細胞に導入したのち、蛍光顕微鏡観察下、細胞に780 nmレーザーを照射しました。この時、培養液温度が37度に保たれている一方で、レーザー照射した細胞内の温度は照射開始直後に上昇し、照射中一定値で保たれました。この到達温度はレーザーパワー密度に比例し、1平方mm当たり6ワットの照射で42度に達することがわかりました。このとき、同じ視野内でもレーザースポット内にある細胞からのみ発光が検出され、蛍光タンパク質遺伝子の発現が確認されました。この遺伝子の発現誘導には、培養皿全体を温める場合30分以上かかりましたが、我々の手法では、驚いたことにわずか10秒のレーザー照射で十分で、細胞死が誘導されることもありませんでした。レーザースポットを絞ることで、1細胞から遺伝子発現を誘導することもできました。

本手法を応用する試みとして、死の基質と呼ばれる「TRAIL分子」というタンパク質の発現誘導を行いました。TRAIL分子は、がん細胞だけに特異的に発現する「TRAIL受容体」と結合すると、その細胞を細胞死させます。そのため、TRAILをある細胞で発現させると周囲のがん細胞を選択的に殺すことができます。今回我々は、開発した金ナノロッド粒子を用い、熱ショックでTRAIL分子を発現するよう設計した遺伝子をヒトのがん細胞(HeLa細胞)に導入しました。レーザー照射しない場合、がん細胞は安定して増殖し、TRAIL分子の発現は誘導されないことを確認しました。次にライブ観察下、一部の細胞に780 nmレーザー照射すると、周りのHeLa細胞が次々と細胞死を起こす様子が観察されました。以上の実験から、本手法の有為性が証明されました。



3. 今後の展開

本研究により、金ナノロッド粒子を遺伝子キャリアーおよび細胞内ヒーターとして兼務させることができる表面修飾法が明らかになり、光刺激による遺伝子発現誘導が迅速かつ安全に行えるようになりました。これまでにUV光などの短波長光刺激で遺伝子発現誘導する系が開発されていましたが、光毒性が低く、より生体深部まで届く長波長光を用いた本実験系は、組織などの細胞集団における遺伝子操作と機能解析により適していると言えます。金ナノロッド粒子を生体の標的器官で細胞導入する手法も開発されており、将来的にはがんなど様々な難病の安全な遺伝子治療への応用が期待されます。

4. 用語解説

- ※1 **熱ショックタンパク質**: 熱や炎症などのストレスにさらされると発現し、ストレスにより変性した他のタンパク質を除去するなどして細胞の保護を担う。熱ショックタンパク質の発現のスイッチとなる熱ショックプロモーターを別の遺伝子と繋ぐと、熱ショックにより任意の遺伝子の発現を誘導できる。
- ※2 **近赤外レーザー**: 赤色の可視光と赤外線との波長(0.75~1.4 μm)の電磁波で、散乱しにくく水や生体分子を透過しやすい性質をもつため、生体にダメージが少なくより深部まで照射できる。
- ※3 **金ナノロッド粒子**: 棒状の金粒子。長さは約50 nm。近赤外領域の光を最もよく吸収する。
- ※4 **オレイン酸**: 天然の脂質。ヒト細胞にも含まれる。
- ※5 **DOTAP**: 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propaneの略。カチオン性脂質の一種。
- ※6 文献: T. Murakami, H. Nakatsuji et al. ACS Nano 8, 7370-7376 (2014)

5. 研究プロジェクトについて

本研究は新学術領域研究「脳構築における発生時計と場の連携」および「分子ロボティクス」、JSPS特別研究員奨励費、iCeMS最重要融合研究課題加速研究助成の支援により行われました。

6. 論文タイトル・著者

Surface chemistry for cytosolic gene delivery and photothermal transgene expression by gold nanorods (参考訳: 金ナノロッドの界面化学による細胞内への遺伝子導入と光熱変換による遺伝子発現)

著者: Hiroataka Nakatsuji, Kelly Kawabata Galbraith, Junko Kurisu, Hiroshi Imahori, Tatsuya Murakami and Mineko Kengaku

Scientific Reports | DOI: 10.1038/s41598-017-04912-1

7. iCeMS について

京都大学 高等研究院 物質-細胞統合システム拠点 (iCeMS=アイセムス) は、文部科学省「世界トップレベル研究拠点 (WPI) プログラム」に平成 19 年度に採択され、平成 29 年にはその研究水準および運営が世界トップレベルであるとして、「WPI アカデミー拠点」に認定された研究拠点です。iCeMS では、生物学、物理学、化学の分野を超えて新しい学問を作り、その学問を社会に還元することを目標に活動している日本で唯一の研究所です。その新しい学問からは、汚水や空気の浄化といった環境問題の解決、脳の若返りといった医療に役立つ可能性を秘めたとてつもないアイデアが次々と生まれています。

詳しくはウェブサイトをご覧ください。 <http://www.icems.kyoto-u.ac.jp/>