

人工スイッチを使った遺伝子コントロールに成功 —治療に役立つ可能性も—

京都大学（総長：松本紘）の杉山弘物質-細胞統合システム拠点（iCeMS=アイセムス）・理学研究科教授の研究グループは、狙った DNA に結合する化合物によって細胞の遺伝子発現をコントロールすることに成功しました。このような遺伝子発現コントロールは細胞のリプログラミングや、がん・HIV のような病気の治療に役立つ可能性があります。

ヒトのゲノムはおよそ 2 万の遺伝子をコードしていると言われ、個々の細胞はこれらの遺伝子の発現をコントロールすることで機能を維持しています。エピジェネティックな変化は遺伝子発現制御の方法の一つとして知られ、この均衡が崩れると細胞は機能を維持できず、病気の原因にもなります。

同研究グループの **Namasivayam, Ganesh Pandian** iCeMS 研究者らは、こういった細胞の遺伝子ネットワークの異常を修復する新しいツールの開発に取り組んでいます。エピジェネティック変化により遺伝子の発現を“ON”にする SAHA と、狙った DNA 配列に結合する PIP を結合させることで、32 種類の SAHA-PIP と呼ばれる小分子化合物を開発してきました。PIP によって SAHA が DNA 上の特定の位置に運ばれて遺伝子を活性化すると考えられます。

今回の研究では、ヒトの皮膚の細胞に SAHA-PIP を投与し、それぞれの SAHA-PIP が設計に応じて別々に遺伝子を発現上昇させることを発見しました。発現上昇した遺伝子には、特定の組織に関連するものや病気の治療に役立つと期待されているものも含まれていました。また、SAHA-PIP は細胞毒性が低く安全であることも見出しました。この成果により、SAHA-PIP による再生医療における組織細胞の効率的な誘導や、今まで治療法のなかった病気の治療の実現が期待されます。

本成果は日本時間 2014 年 1 月 24 日（金）にネイチャーパブリッシンググループの電子ジャーナル「**Scientific Reports**（サイエンティフィック・レポート）」にて公開されました。

1. 背景

ヒトはさまざまな役割を持つ細胞が集合してできていますが、全ての細胞は核の中に共通の DNA を持っていて、共通の遺伝子のセットが生命の設計図として DNA にコードされています。この遺伝子を読み取ってたんぱく質などの分子が合成されることを遺伝子の発現といいます。どの遺伝子を発現させるかの正確なコントロールによって、個々の細胞が異なる役割を分担し、機能を維持しています。

近年では、遺伝子発現制御のメカニズムとしてヒストンのアセチル化などのエピジェネティック（※1）修飾が注目されています。ヒストンとは細胞核に存在するたんぱく質で、核内では DNA がヒストンに巻きついてあります。ヒストンアセチル基転移酵素（HAT）によってヒストンがアセチル化されると、DNA の巻きつき方が緩くなって遺伝子発現に必要な分子が DNA にアクセスしやすくなるため、

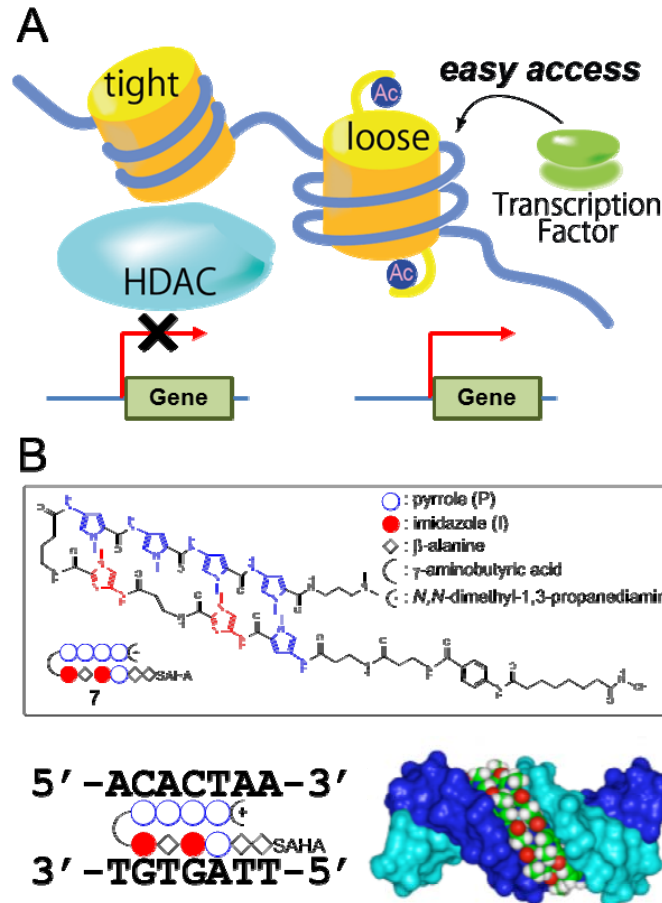


図1. A. ヒストンのアセチル化による遺伝子発現制御。HDACがアセチル基を取り除くとDNAがタイトに巻き付いて遺伝子発現は抑制される（左）が、HDACが阻害されるとアセチル化によって巻き付き方が緩くなって遺伝子発現が起こる。B. SAHA-PIPの構造（上段）とDNA配列認識の例（下段左）、およびPIPがDNAに結合する様子（右下）。ピロール（P）を赤丸、イミダゾール（I）を中抜き青丸で表している。PとIの組み合わせでDNA配列を認識し、副溝に結合する。

遺伝子の発現が促進されます。逆に、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）はヒストンのアセチル基を取り除くのでDNAがヒストンにタイトに巻きつき、分子がDNAへアクセスできなくなるので、遺伝子発現は抑制されます（図1A）。この制御機構は、iPS細胞や組織細胞の誘導といった細胞のリプログラミング、また、がんや糖尿病、神経疾患といった様々な病気にも関わっていると言われています。実際、HDACの機能を阻害して遺伝子発現を促進する分子であるSAHA（スベロイルアニリドヒドロキサム酸）は、リンパ腫の治療薬として使われたり、iPS細胞作製を促進したりすることが知られています。しかしSAHAなどの分子はDNA配列への選択性がないので、特定の遺伝子を狙って発現上昇させることはできません。

本研究グループはこの問題を解決するために、特定の遺伝子の発現上昇を可能にする“人工遺伝子スイッチ”としてSAHA-PIPとよばれる小分子化合物を開発しました（図1B）。SAHA-PIPは、配列選択的にDNAに結合するピロールイミダゾールポリアミド（PIP※2）にSAHAを結合させた化合物です。このPIPはピロール（P）とイミダゾール（I）のユニットが2列に並んだ構造をもち、PとIの組み合わせが異なったDNA配列を認識します。PとIの配置を変えることで様々なDNA配列に結合するPIPを設計することができます。このため、SAHA-PIPはDNA上の特定の位置でSAHAを機能させ、特定の遺伝子を狙って発現を上昇させることができる可能性があります。これまでの研究では、様々なDNA

配列に結合する SAHA-PIP ライブラリを合成し、生殖細胞に重要な遺伝子の特異的に上昇させる SAHA-PIP を同定しました。

2. 研究内容と成果

今回の研究ではライブラリ中のまだ機能のわかっていない SAHA-PIP が遺伝子発現にどのような効果を及ぼすかについて、32 種類の SAHA-PIP (SAHA-PIP 1~32) をそれぞれヒト皮膚繊維芽細胞 (HDF) に投与し、DNA マイクロアレイ法 (※3) によって全遺伝子の発現変化を測定しました (図 2 A、B)。その結果、SAHA-PIP によって発現上昇した遺伝子の数は多いことがわかりました (図 2 C)。また、発現変動した遺伝子を抽出してクラスタリング解析を行いました。結果、それぞれの SAHA-PIP が別々の遺伝子群を発現上昇させたことがわかりました (図 2 D)。このことは、各 SAHA-PIP の PIP が異なった DNA 配列を認識して結合することに起因すると推測されます。

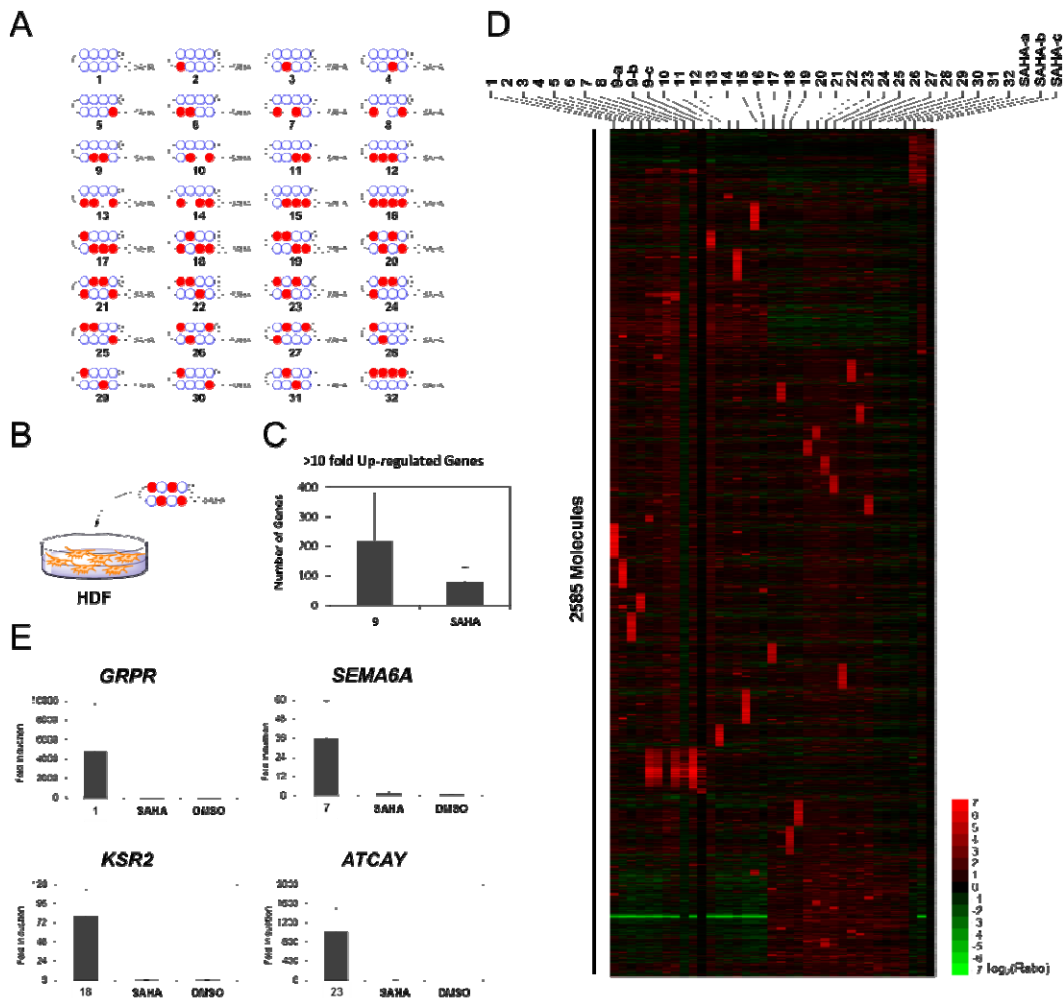


図 2. A. SAHA-PIP のライブラリ。PIP 中のピロール(中抜き青丸)とイミダゾール(赤丸)の配列が異なり、異なった DNA 配列を認識し結合する。B. 実験の模式図。ヒト皮膚繊維芽細胞 (HDF) に SAHA-PIP を投与し、遺伝子発現の変化を調べた。C. 発現上昇した遺伝子の数。PIP が結合していない SAHA 単体に対して代表的な SAHA-PIP である”9”は多くの遺伝子の発現を上昇させた。D. 遺伝子クラスタリング解析。赤は発現上昇、緑は発現減少を示している。各 SAHA-PIP (縦の列) は別々の遺伝子群 (横の行) を発現上昇させたことがわかる。E. 遺伝子の発現量の相対値。SAHA 単体や化合物非投与の細胞 (DMSO) では発現していない、組織や疾患において重要な遺伝子が、SAHA-PIP によって発現上昇したことがわかる。

次に、発現が上昇した遺伝子にどんな機能や役割があるのか調べたところ、SAHA-PIP 1 は膵臓や内分泌系、13 は神経など、それぞれの SAHA-PIP が特徴的な機能をもっていることがわかりました。また疾患などに関与している遺伝子として、インスリン分泌に関わる GRPR、網膜の形成に関わる SEMA6A、肥満に関わる KSR2、小脳に関わる ATCAY が SAHA-PIP1、13、18、23 によってそれぞれ発現が上昇することが確かめられました（図 1 E）。この他にも 7 種類の SAHA-PIP で組織形成や疾患に関わる遺伝子が発現上昇することが確認されました。一方、PIP が結合していない SAHA 単体ではこのような発現上昇は見られませんでした。このことは、PIP との結合によって SAHA が特定の遺伝子の領域で作用し、SAHA 単体では発現上昇できない遺伝子に作用していることを示唆しています（図 3）。

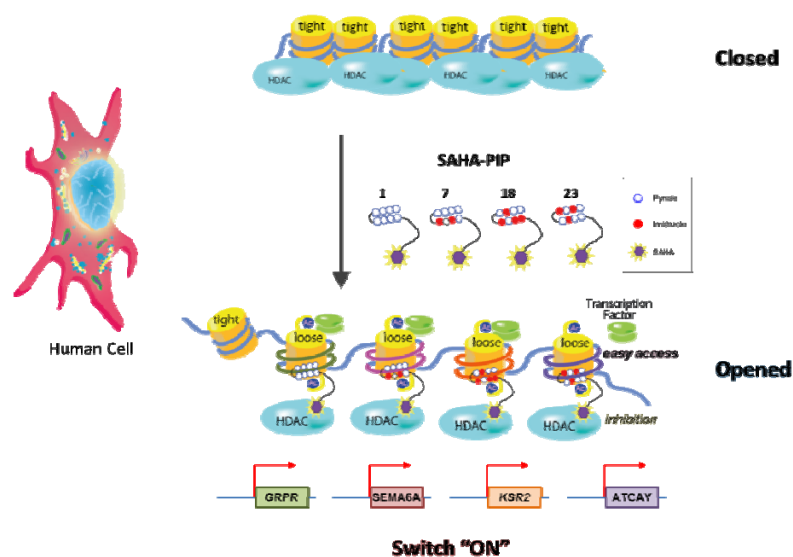


図 3. SAHA-PIP による遺伝子発現の上昇。通常では HDAC によって DNA が凝縮され、遺伝子発現が抑制されている（上部：Closed 状態）が、SAHA-PIP の投与によって部位特異的に HDAC が阻害されて DNA が弛緩し、転写因子（Transcription Factor）が遺伝子にアクセスできるようになり（下部：Opened 状態）、遺伝子の発現が上昇すると推測される（Switch “ON”）。

3. 今後の期待

遺伝子発現は生体内で緻密にコントロールされていますが、均衡が崩れて異常をきたすことで様々な病気の原因となります。このような病気に対する治療として、人為的な遺伝子発現制御の研究が注目を集めています。また、最近では iPS 細胞の登場によって再生医療の実現に期待が高まっています。再生医療ではある組織の細胞や幹細胞を別の組織の細胞へ転換させることが必要になりますが、このときエピジェネティックな修飾のコントロールが重要となってきます。

本研究では、異なった DNA 認識配列をもつ 32 の SAHA-PIP が遺伝子発現に様々な影響を与えることを示しました。SAHA-PIP は認識配列を事前にプログラム可能で、かつエピジェネティックな遺伝子発現上昇の活性をもつユニークな分子であり、“人工遺伝子スイッチ”として新しいタイプの治療薬や組織細胞の効率的な誘導などでの利用が期待されます（図 4）。

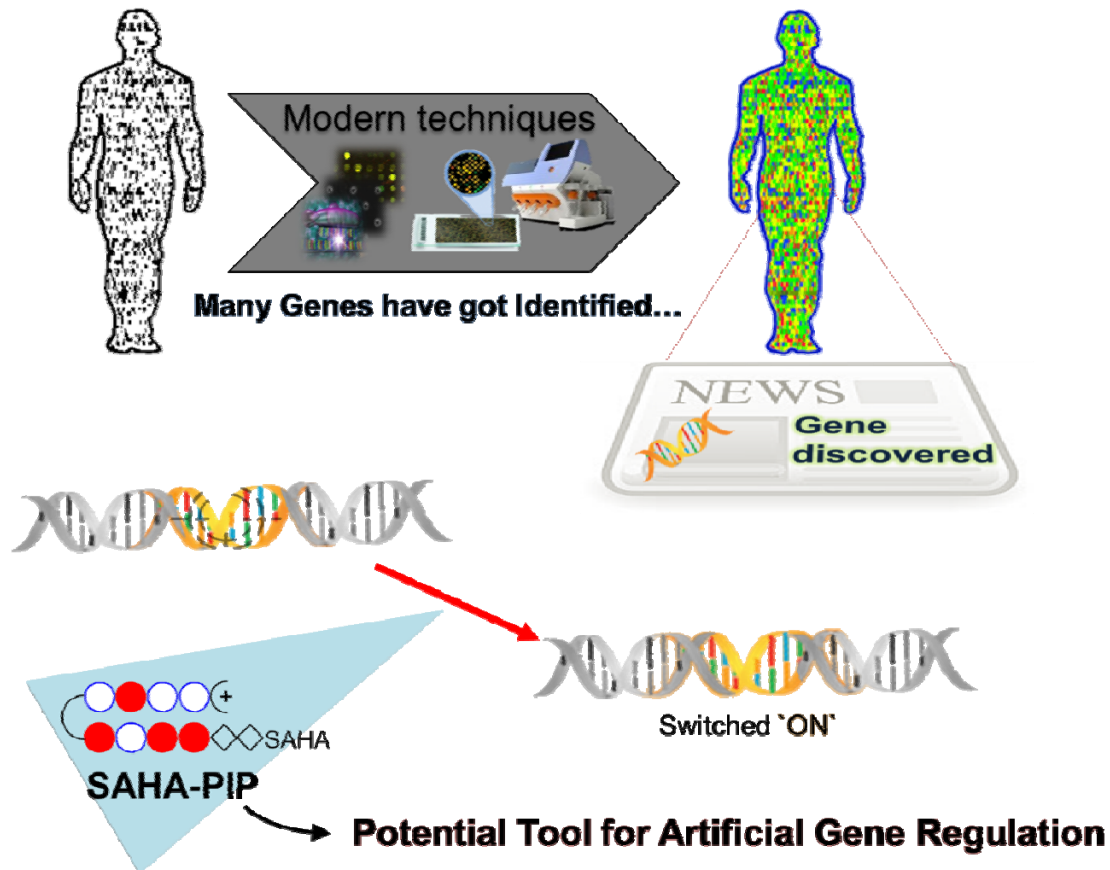


図 4. 現在、多くの遺伝子の病気や組織との関連が解明されてきた。SAHA-PIP は“人工遺伝子スイッチ”として治療薬や組織細胞の誘導などでの応用が期待される。（一部、DOI: 10.1038/nature03001 より改変）

用語解説・注釈

- ※ 1 **エピジェネティック**： エピ (epi) は「後」、ジェネティックは「遺伝子の」という意味。配列自体は変わらずに DNA がメチル化修飾されたり、ヒストンがメチル化やアセチル化などの修飾を受けたりすること。これらの修飾によって遺伝子の発現がコントロールされる。DNA の配列は変わらないが、DNA と同様に細胞分裂時に娘細胞に受け継がれていく。
- ※ 2 **PIP**： ピロールイミダゾールポリアミド。ピロール (P) とイミダゾール (I) の誘導体がアミド結合で連結して逆並行の 2 本鎖構造をもつ。P-P のペアが DNA の A-T または T-A 塩基対を認識し、I-P のペアが G-C 塩基対を認識することで、配列特異的に DNA に結合することができる。
- ※ 3 **DNA マイクロアレイ法**： 網羅的に遺伝子発現レベルを測定する実験法。チップに配置された数万種類の DNA 断片に蛍光ラベル化した遺伝子産物を結合させて、チップをスキャンすることで蛍光強度から遺伝子発現量を解析する。

論文タイトルと著者

“Distinct DNA-based Epigenetic Switches Trigger Transcriptional Activation of Silent Genes in Human Dermal Fibroblasts”

Ganesh N. Pandian, Junichi Taniguchi, Syed Junetha, Shinsuke Sato, Le Han, Abhijit Saha, Chandran AnandhaKumar, Toshikazu Bando, Hiroki Nagase, Thangavel Vijayanthi, Rhys D. Taylor & Hiroshi Sugiyama*

Scientific Reports | DOI: 10.1038/srep03843