

## 放射線応答性人工プロモーターの構築

Construction of artificial promoters responsive to radiation

小川良平<sup>\*1</sup>、鍵谷 豪<sup>\*2,3</sup>、福田茂一<sup>\*2</sup>、畑下昌範<sup>\*4</sup>

Ryohei OGAWA, Go KAGIYA, Shigekazu FUKUDA and Masanori HATASHITA

### Abstract

DNA oligomers containing one of four cis-elements to which radiation-activated transcription factors bind were randomly ligated and linked to a TATA box sequence, constructing 11 artificial promoters. X-ray irradiation at 10 Gy was found to significantly increase activities of seven out of the 11 promoters in HeLa cells. Likewise, proton beam irradiation at 10 Gy also increased activities of three promoters. However, the degrees of activity increases were different between the radiations, presumably due to different properties between the radiations since activation of promoters was suggested causing with oxidative stress condition by radiation.

### 要約

放射線の照射によって活性化する4種類の転写因子結合配列(シスエレメント)を含む合成DNAをランダムに結合し、さらにTATAボックス配列と結合して11種類の人工プロモーターを構築した。それぞれHeLa細胞に導入し10 GyのX線を照射したところ、7種類で有意に活性が増強することが示された。同様に、10 Gyの陽子線を照射した場合も3種類で有意に活性が増強したが、プロモーターの反応性に違いが認められた。この増強は放射線照射による酸化ストレスにより引き起こされることが示唆され、プロモーター活性化の違いは放射線の線質の違いによるものと考えられた。

### 1. 緒言

がんの遺伝子治療は次世代の治療法と期待されているが、現在はまだ発展段階である。そのため放射線治療など従来の治療法との組み合わせによる改良の必要性が指摘されている<sup>1)</sup>。このような方法の一つとして、放射線照射により活性化するプロモーターを利用し、治療用の遺伝子の発現を放射線照射により制御する方法が挙げられる。ベクターを導入した後に放射線を照射することで、照射したところでのみ治療遺伝子(放射線感受性を上げる遺伝子、あるいは、細胞毒性のある遺伝子など)の発現が可能となり、両者を組み合わせた効果的ながん治療や、不必要な治療用遺伝子の発現や高線量の放射線による副作用の軽減などの効果が期待できる。

放射線の照射により、発現変化を起こすEGR-1、p21、p51遺伝子のプロモーターは、組合せ治療への利用可能性が示唆されている<sup>2)</sup>。しかし、天然のプロモーターでは極端な誘導は期待できず、実用化は困難と思われる。

真核生物のプロモーターは、下流側のTATAボックスなどの基本転写因子結合配列と上流側の活性化した転写因子が結合するシスエレメントから成る。基本転写因子は転写の位置を決定し、特定の刺激により活性化した転写因子は転写のタイミングや量を決定する。特定の刺激により活性化する転写因子やその転写因子が結合するシスエレメントの配列はよく知られているが、転写に直接影響する転写因子のシスエレメントへの結合は、DNAの構造や化学修飾更には他の転写因子との位置関係などに大きく影響される。しかしながら、プロモータ

---

\*1：富山大学大学院医学薬学研究部放射線基礎医学講座、\*2：若狭湾エネルギー研究センター粒子線医療研究室(\*3：現所属：Radiation Biology Branch, National Cancer Institute, National Institutes of Health)、\*4：若狭湾エネルギー研究センター生物資源グループ

一の塩基配列とこれらの関係についてはほとんどわかっていないため、高性能人工プロモーターの構築は困難である。

我々は、放射線照射により活性化する転写因子のシスエレメントをランダムに結合して DNA 断片を作り、これを TATA ボックスに結合することで、放射線照射により活性化する人工プロモーターの構築を試み、X線と陽子線での反応性について検討した。

## II. 材料と方法

### 1. 細胞及びバクテリア

ヒト子宮頸がん由来の HeLa 細胞を用いた。細胞は HS 細胞資源バンクから購入し、富山大学大学院医学薬学研究部放射線基礎医学講座で数年にわたって維持してきたものである。培養には RPMI1640 培地に 10% の牛胎児血清と適当な抗生物質を添加したものをいい、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下の 37 °C 培養器で培養を行った。すべての遺伝子操作には大腸菌 DH5 α 株 (TOYOBO (株) 製) を使用した。大腸菌の培養には LB 培地を使用した。

### 2. プロモーター及びベクターの構築

ホタルルシフェラーゼ遺伝子上流にマルチクローニング部位を持つプラスミド pGL3-Control (プロメガ社製) のマルチクローニング部位 (Sacl-KpnI) にヒト前立腺がん細胞 DU145 から PCR によって増幅した TATA ボックスを含む DNA 断片をクローニングし、更に、TATA ボックスの上流に単一の Sall 認識配列を導入して pGL3-TATASal を構築した<sup>2)</sup>。プロモーターの構築には Nuclear Factor-Kappa B (NF-κB)、Activating Protein-1 (AP-1)、Nuclear Factor-Y (NF-Y) 及び CArG Element Binding Factor-A (CBF-A) のシスエレメントを含む合成 DNA を 2 本鎖にして使用した。これらの DNA 断片がそれぞれ結合し易いように 5 突出の 5'-gatc-3' 配列を付加した。また結合後のクローニングのために、Sall 認識配列を含む 5 突出の 5'-gatc-3' 配列を付加した合成 DNA も他の合成断片の 1/100 (モル比) 使用した。これらの断片を T4DNA リガーゼでランダムに結合した後 Sall で処理し、アガロース電気泳動を行い約 50-200 bp の大きさの DNA 断片を回収した。回収した DNA 断片を pGL3-TATASal の Sall 部位に導入し、11 種類のベクターを構築した。構築したプロモーターの塩基配列分析は、Big Dye Termination Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステム社製) を使用し、定法であるサイクルシーケンス PCR 法で行った。

### 3. 遺伝子導入と放射線照射

約  $1.2 \times 10^6$  個の細胞を直径 60 mm の培養皿に撒き、一晚培養後に各プロモーターをクローニングしたベクター及び内部標準用のウミシイタケルシフェラーゼを単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼ遺伝子 (HSV-tk) プロモーターで発現するプラスミドベクター-phRL-TK (プロメガ社製) の遺伝子導入を行った。遺伝子導入は、エフェクテン試薬 (キアゲン社製) を使用して行い、遺伝子導入から 6 時間後に細胞を回収して 6 つの直径 35 mm 培養皿に細胞を  $2 \times 10^5$  個ずつ撒いた。更に一晚培養後に 3 つの培養皿に細胞に X 線を照射し、残りのものは陰性対照とした。X 線の照射は日立メディコ社の MBR-1520 で 5 Gy/min の照射率で 2 分間照射を行った。N-アセチルシステイン (NAC) 添加実験では、照射直前に 2 あるいは 5 mM の濃度で添加直後に照射を行い、その後もデュアルルシフェラーゼアッセイまで添加したままで培養を続けた。陽子線照射の場合は、遺伝子導入した細胞を  $2 \times 10^5$  個ずつ、35 mm 培養皿の代わりに 12.5 cm<sup>2</sup> 培養フラスコに撒いて照射を行った。若狭湾エネルギー研究センターの W-MAST の生物学実験コースで 200 MeV の陽子線を 2 Gy/min の照射率で 5 分間照射を行った。

### 4. デュアルルシフェラーゼアッセイ

プロモーター活性化の評価はデュアルルシフェラーゼアッセイキット (プロメガ社製) を使用して行った。通常、細胞は放射線照射後 6 時間培養して評価した。細胞を PBS で 1 回リンスした後、400 μl の Passive Lysis Buffer

(キットに付属)で細胞溶解液を調製した。10  $\mu$ l の細胞溶解液中の合成プロモーターにより発現するホタルルシフェラーゼの活性と、放射線照射によってもほとんど活性の変わらない HSV-tk プロモーターにより発現するウミシタケルシフェラーゼの活性を内部標準として別々に測定して比較することにより合成プロモーターの活性を評価した。

### III. 結果と考察

まず構築した11種類のプロモーターの基本活性を調べるために HeLa 細胞にそれぞれのプロモーターを含むプラスミドベクターを導入し、24 時間後にデュアルルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、6種類のプロモーターにおいて、TATA ボックスのみのプロモーターよりも高い基本活性を持つことが示された (data not shown)。以前に報告したように<sup>3)</sup>、この方法が人工プロモーターを効率よく構築できる方法であることが示された。次に 10 Gy の X 線、あるいは陽子線を照射してその反応性について調べた。X 線照射について図-1A に結果を示す。7種類のプロモーター(クローン 1, 5, 6, 7, 8, 9 及び 11) で非照射群と比較して有意に活性が増強した ( $p < 0.05$ ; unpaired Student t test)。陽子線照射の結果は、図-1B に示す。3種類のプロモーター(クローン 6, 7 及び 11) で有意な活性の増強が認められた ( $p < 0.05$ ; unpaired Student t test)。2つの放射線による増強を比較してみると、増強するプロモーターの数が異なるだけでなく、クローン 6 では X 線による増強が約 2.7 倍であるのに対して、陽子線による増強の方が 4.6 倍と高い数値を示した。クローン 7 では X 線で約 3.7 倍、陽子線で約 3.9 倍とほぼ同等であった。クローン 11 では、X 線が 5.1 倍で陽子線では 2.2 倍と X 線による増強の方が高い値を示した。X 線は電磁波であり、粒子線である陽子線とは

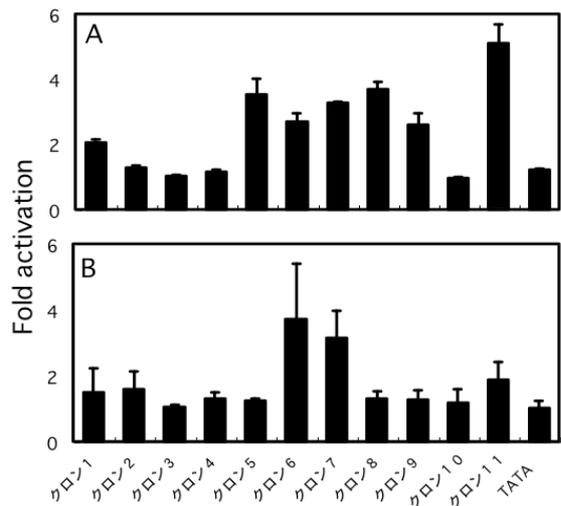


図-1 X線 (A) 陽子線 (B) による人工プロモーターの活性化構築した 11 種類のプロモーター (クローン 1~クローン 11) と TATA ボックスのみから成るプロモーター (TATA) を導入した細胞にそれぞれの放射線を 10 Gy 照射後 6 時間培養してルシフェラーゼの発現変化をもとに活性化の度合いを決定した。

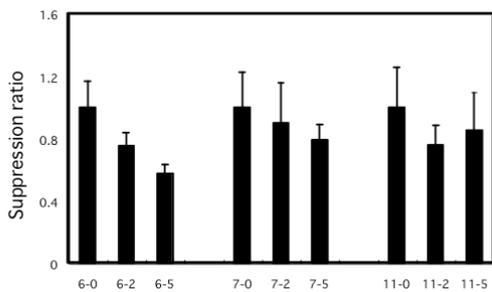


図-2 放射線によるプロモーター活性化に対する NAC の添加効果

クローン 6, 7, 11 プロモーターを含むルシフェラーゼ発現ベクターを導入した HeLa 細胞に、0, 2, 5 mM の NAC を添加した後に 10 Gy の X 線を照射し、6 時間培養した後にルシフェラーゼ発現の変化を調べた。NAC を添加しないプロモーターの誘導率を 1 とし、それに対する割合をプロットした。6-0: クローン 6 - 0 mM NAC, 6-2: クローン 6 - 2 mM NAC, 6-5: クローン 6 - 5 mM NAC, 7-0: クローン 7 - 0 mM NAC, 7-2: クローン 7 - 2 mM NAC, 7-5: クローン 7 - 5 mM NAC, 11-0: クローン 11 - 0 mM NAC, 11-2: クローン 11 - 2 mM NAC, 11-5: クローン 11 - 5 mM NAC。

多くの点でその性質が異なると考えられる。しかし、その照射が生物に及ぼす影響については、RBE などに近い数値を示すことなどから<sup>4)</sup>、比較的似ているとも考えられている。RBE を調べるための放射線照射後の細胞のコロニー形成能の減少やラットの小腸上皮細胞の脱落などの指標ではほとんど認められなかった両放射線の違いであるが、今回の結果は、分子レベルで観察すると両放射線による生物影響において大きな違いあることを示唆する。

次に、クローン 6, 7, 11 の 3 つのプロモーターの X 線による活性化において、抗酸化剤である NAC の添加効果について調べてみた。結果を図-2 に示す。程度は異なるが、NAC の添加によりすべてのプロモーターで放射線による増強の抑制傾向が認められた。これらの結果によ

り、構築した人工プロモーターの活性化は、放射線により引き起こされる酸化ストレスを介していることが示唆される。我々は以前に、同じ線量の X 線と陽子線を DMPO の水溶液に照射した場合、水酸化ラジカルの発生量が大きく異なることを示した<sup>5)</sup>。このことは、X 線と陽子線の性質の違いにより、照射によって発生する活性酸素の種類や量に違いが生じることを示している。これにより、細胞に異なる酸化ストレス状態を引き起こし、分子レベルでの細胞の反応が異なると考えられる。最終的な細胞死の程度は似ていてもその経過や機序が異なる可能性が示唆される。

最後に、塩基配列分析により、これら3つのプロモーターの構造を調べた。図 - 3 にそれぞれのプロモーターの TATA ボックス上流に導入されたシスエレメントの種類と方向を示す。クローン6は、3つの NF-κB のシスエレメントが反対向きにタンデムに並んだ構造をしていた。またクローン7は14のシスエレメントから成り、クローン11は16のシスエレメントから成ることが判明した。現在、これらのプロモーターの構造と放射線反応性を始めとする性質との関連については不明である。ただ、クローン6が NF-κB のみから構成されていることから、X 線よりも陽子線の方が NF-κB を効率よく活性化させると言えるかも知れない。いずれにせよ、構造と性質の関連についての詳細な解析は今後の課題である。

これまで、強力な活性を持つ原核生物の人工プロモーターが、プロモーター活性のない DNA 断片に点変異をランダムに導入するという、比較的簡単な方法で構築が可能であることを見出した<sup>6)</sup>。しかし、より複雑な構造を持つ真核生物のプロモーターは同様の方法で構築することができず、シスエレメントをランダムに組み合わせたものを TATA ボックスに結合することで可能となることを報告した<sup>3)</sup>。今回、目的に応じたシスエレメントを選択してプロモーターを構築することで、目的の性質を持った人工プロモーターを構築できることが示唆された。今後は、今回構築したプロモーターをもとに、治療用遺伝子の発現を放射線照射によって制御可能なベクターを作成し動物モデルでの治療試験に進んでいきたいと考えている。また、多くの種類の細胞で放射線やその他の刺激に应答して活性化するプロモーターを構築するためのより簡便なシステムの作製を試みる予定である。

## 参考文献

- 1) D. H. Gorski, H. J. Mauceri *et al.*, Strategies for combining gene therapy with ionizing radiation to improve antitumor efficacy. In *Gene Therapy of Cancer*. 2nd Ed., E. C. Lattime and S. L. Gerson., eds., pp. 435-448. Academic Press, London, UK. (2002).
- 2) D. E. Hallahan, H. J. Mauceri *et al.*, Spatial and temporal control of gene therapy using ionizing radiation. *Nat. Med.*, **1**, 786, (1995)
- 3) R. Ogawa, G. Kagiya *et al.*, Construction of strong mammalian promoters by random cis acting element elongation. *BioTechniques*, **42**, (5) 682, (2007)
- 4) H.P. Paganetti, A. Niemierko *et al.*, Relative Biological Effectiveness (RBE) Values for Proton Beam Therapy, *Int J. Radiation Oncology Biol. Phys.*, **53**, (2)407, (2002)

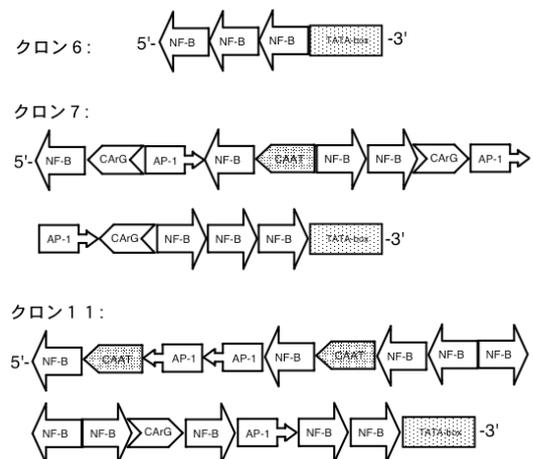


図-3 塩基配列分析により再構成した各プロモーターの構造  
各シスエレメントは矢印で方向を形と名前でその種類を表している。NF-B: NF-Bシスエレメント、AP-1: AP-1シスエレメント、CArG: CBF-Aシスエレメント、CAAT: NF-Yシスエレメント、一番下流(3')側のボックスはTATAボックスを示す。

- 5) S. Fukuda, N. Endo, G. Kagiya, T. Kondo: Free Radical Formation by Protons. *J. J. Medical Physcs*, **24**, (2) 85,(2004)
- 6) G. Kagiya, R. Ogawa et al.: Generation of a strong promoter for *Escherichia coli* from eukaryotic genome DNA. *J. Biotechnol.*, **115**, 239, (2005)