

200820050A

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

エイズ感染細胞での配列特異的遺伝子組換えによる
効率的な HIV 遺伝子除去法の開発

平成20年度 総括研究報告書

主任研究者 野村 渉

平成21年(2009)年 4月

厚生労働科学研究費補助金

エイズ対策研究事業

エイズ感染細胞での配列特異的遺伝子組換えによる
効率的な HIV 遺伝子除去法の開発

平成 20 年度 総括研究報告書

主任研究者 野村 渉

平成 21 年 (2009) 年 4 月

目次

I. 総括研究報告	
エイズ感染細胞での配列特異的遺伝子組換えによる 効率的な HIV 遺伝子除去法の開発	----- 1
野村 渉	
II. 研究成果の観光に関する一覧表	----- 17
III. 研究成果の刊行物・印刷	----- 21

エイズ感染細胞での配列特異的遺伝子組換えによる 効率的な HIV 遺伝子除去法の開発

主任研究者 野村渉 東京医科歯科大学生体材料工学研究所 助教

研究要旨

HIV 感染細胞中に組み込まれた HIV プロウイルス遺伝子を組換え酵素によって切除し、ウイルス産生を抑制することを目的とし、標的とする遺伝子配列に対してプログラムされた DNA 組換え酵素の構築とその反応性に対する詳細な解析をいった。構築した DNA 組換え酵素は標的配列において高い反応効率で反応を行い、目的とする遺伝子の切除が可能であることが示された。

A. 研究目的

本研究では、HIV プロウイルス遺伝子の *gag* 配列に特異的に働く亜鉛フィンガータンパク質（ZFP）融合型 DNA 組換え酵素の開発を行う。現在行われている HIV 治療法で高い実績を持つ HAART 療法は、副作用や高額な医療費、長期にわたる投薬などの問題点がある。また、現在確立されている HIV 治療法は HIV の増殖を抑えるもので、ウイルスを完全に駆逐するものではない。

そこで、HIV の新たな治療法として、HIV 感染細胞に取り込まれた HIV ゲノム遺伝子の切除という方法を提案する。DNA 組換え酵素の DNA 結合ドメインを ZFP に置換した融合型酵素(図 1.5)にすることにより、配列特異的な DNA 組み換え反応による HIV の *gag* 遺伝子除去が可能となる。この酵素を用いた場合、標的とする配列に対する能動的な DNA 組換えが可能であり、目的遺伝子の組み込みや確実なノックアウトができるという利点が挙げられる。このような酵素の構築により、感染細胞のゲノム遺伝子中に組み込まれた HIV プロウイルス遺伝子の除去を細胞への毒性なく行うことが可能になると考えられる。

HIV プロウイルス遺伝子を標的とする場合に問題となるのが RNA ウイルスの特徴である遺伝子配列の高い変異率である。従って、比較的保存度の高い *gag* 遺伝子を標的配列とし、標的配列に結合する ZFP の遺伝子を作製することにした。高親和 DNA 結合を示した ZFP を選択して用い、DNA 組換え酵素 Tn3 の DNA 結合ドメインを作製した ZFP に置き換えた ZFP 融合型 DNA 組換え酵素を構築し、標的配列に対する機能評価を行う。

本研究では、HIV プロウイルス遺伝子の *gag* 配列から、スパーサー配列を 20 塩基対に設定した標的配列を 6 種選択した。これらの標的配列に結合する ZFP 遺伝子を作製し、DNA への結合親和性の評価を行った。高親和 DNA 結合を示した配列を用いて、Tn3 の DNA 結合ドメインを ZFP に置き換えた Tn3-ZFP 融合体を構築し、ZFP 融合型 DNA 組換え酵素の標的配列に対する機能評価を行うためのプラスミド DNA による酵素反応モデルの設計と構築を行った。

B. 研究方法

(1) 標的 DNA 配列の選択

本研究では、HIV プロウイルスの *gag* 遺伝子をターゲットとした DNA 組換え酵素の構築を行う。*gag* 遺伝子はマトリックスやキャプシドといったウイルスの構造タンパクをコードしており、ウイルスの増殖に重要な遺伝子である。HIV では多くの変異株が存在するが、*gag* 遺伝子は保存性が高く、汎用性が高いため、遺伝子治療のターゲットとして有効であると考えられる。これまでに構築されている ZFP モジュールの組み合わせにより、標的配列にできる部分を HIV プロウイルス株の HIV NL-4.3 M19921 の *gag* 遺伝子を用いて ZF Tools (下記 URL)

(http://www.scripps.edu/mb/barbas/zfdesign/zfdesign_home.php) によって検索を行った¹⁾。そこから HIVNL4-3 と 4 種の変異株(JRCSF, JRFL, LAI19、HXB2)の *gag* 遺伝子配列において相同性の高い配列から以下の 6 箇所の配列を選択した。この時、配列の条件指定として中心に AT のあるスパーサー配列 20 塩基対に限定し、スパーサー配列側から 4~6 コドン を ZFP の標的配列とした。DNA の塩基配列は 9 塩基対 (3 コドン) 以上で配列特異性を確保出来るが、ある程度の変異が予測される HIV プロウイルス遺伝子に対する配列特異性を確保するため、標的配列を 12 塩基対 (4 コドン) 以上に設定した。

(2) ZFP の標的 DNA 配列に対する結合親和性評価

(2-1) Zinc Finger プラスミドの作製

選択した 6 種の標的配列に結合する ZFP をコードする配列を持つプラスミドを作製し、ZFP 発現に利用する。ZFP のモジュール数は 4~6 個とする。1 個の Zinc Finger モチーフ遺伝子が組み込まれた pc3XB ベクター (Addgene) を用いて、4~6 個の Zinc Finger モジュールを持つプラスミドを作製した。ベクターは Addgene の pc3XB-ZF58-106 (Barbas modules) を使用した (表 1)。まず、F1 の配列を持つプラスミドを制限酵素 *AgeI* および *BamHI* で切断し、さらに Alkaline phosphatase (CIP) により切断面を脱リン酸化した。また、F2 の配列

を持つプラスミドを制限酵素 *XmaI* および *BamHI* で切断し、F2 をコードするフラグメントを得た。F1 をコードする配列を持つベクター骨格と F2 をコードするフラグメントを T4 ligase によりライゲーションを行い、F1-F2 をコードする配列を持つプラスミドを得た。このプラスミドを再び *AgeI/BamHI* による制限酵素処理と CIP 処理を行っ

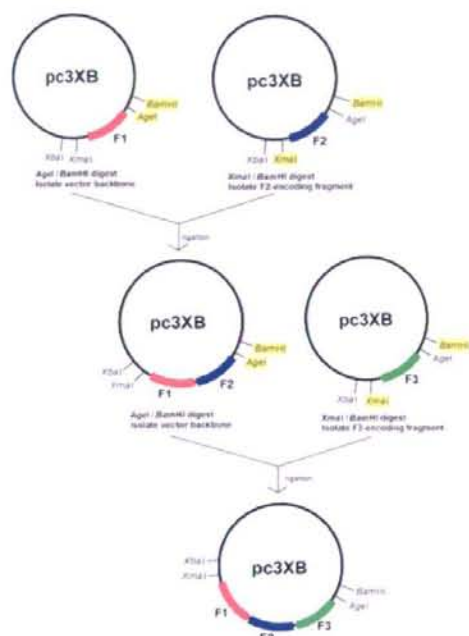


図 1. ZFP 遺伝子の作製方法について

て得たベクター骨格と、*XmaI/BamHI* による制限酵素処理により得た F3 をコードするフラグメントを用いてライゲーションを行い、F1-F2-F3 の 3F をコードする配列を持つプラスミドを作製した。同様に F4-F6 をライゲーションし、4~6 個の ZFP モジュールを連結した配列を持つプラスミドを作製した (図 1)²⁾。作製したプラスミドは chemical transformation によりコンピテントセルに形質転換した。コンピテントセルには大腸菌 XL-1 Blue を用いた。

プレートよりコロニーをピックアップし、プラスミドを精製した。アガロースゲル電気泳動およびシーケンス解析により配列を確認し、ライゲーションが正しく行われたことを確認した。

		F1	F2	F3	F4	F5	F6
site1	targetDNA	CAA	GAA	CAG	CTT	ACC	AGT
	plasmid	pc3XB-ZF89	pc3XB-ZF63	pc3XB-ZF91	pc3XB-ZF103	pc3XB-ZF79	pc3XB-ZF85
site2	targetDNA	GGA	GGT	ATA	GGG	ACT	CCT
	plasmid	pc3XB-ZF59	pc3XB-ZF60	pc3XB-ZF86	pc3XB-ZF58	pc3XB-ZF81	pc3XB-ZF96
site3	targetDNA	AGA	CTG	GTA	ATT	AAG	TGA
	plasmid	pc3XB-ZF82	pc3XB-ZF102	pc3XB-ZF67	pc3XB-ZF88	pc3XB-ZF76	pc3XB-ZF105
site4	targetDNA	CTT	GAT	CCA	AGG	GGA	GTG
	plasmid	pc3XB-ZF103	pc3XB-ZF64	pc3XB-ZF93	pc3XB-ZF84	pc3XB-ZF59	pc3XB-ZF66
site5	targetDNA	GGA	TGA	CAA	CAT	GAC	AGA
	plasmid	pc3XB-ZF59	pc3XB-ZF105	pc3XB-ZF89	pc3XB-ZF92	pc3XB-ZF65	pc3XB-ZF82
site6	targetDNA	GCA	GAT	CTG	GCA	CAT	CTG
	plasmid	pc3XB-ZF71	pc3XB-ZF64	pc3XB-ZF102	pc3XB-ZF71	pc3XB-ZF92	pc3XB-ZF102

表 1. ZFP のモジュール番号

(2-2) Maltose Binding Protein (MBP) 融合型 ZFP の発現

ZFP と標的配列の結合活性を ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) 法を用いて評価するために、構築した ZFP をマルトース結合タンパク質 (Maltose Binding Protein; MBP) とし

て発現させることにした。ベクターは pMAL-p4x を用いて行った。この時、pMAL-p4x のマルチクローニングサイト (Multi-cloning Site; MCS) にある BamHI と XbaI の制限酵素サイトを便宜上、入れ替えたものを使用した。また、入れ替えた後の BamHI サイトの直後にストップコドンを入れ、翻訳が終わるように設定した。

ZFP の配列を持つ pc3XB のプラスミドを制限酵素 XbaI および BamHI で切断し、ZFP のフラグメントを得た。また、MCS の BamHI と XbaI の制限酵素サイトを入れ替えた pMAL-p4x を制限酵素 XbaI および BamHI で切断し、MBP をコードする *malE* を持つベクター骨格を得た。これらをライゲーションして MBP-ZFP をコードするプラスミドを得た。このプラスミドをコンピテントセルに形質転換し、Isopropyl-b-D-thiogalactopyranoside (IPTG) により発現を誘導した (図 2)。発現誘導は 37°C、3 時間で行い、その後遠心によって大腸菌を改宗した。大腸菌を破碎し、遠心分離後に得られた夾雑タンパク質溶液を用いて MBPTrap™ HP 1mL (GE Healthcare) カラムにより MBP が融合した ZFP を精製した。タンパク質の精製度は SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) により確認した。MBP-ZFP 融合タンパクの分子量は表 2 に示す通りである。精製したタンパクは Bradford 法により濃度測定を行った。

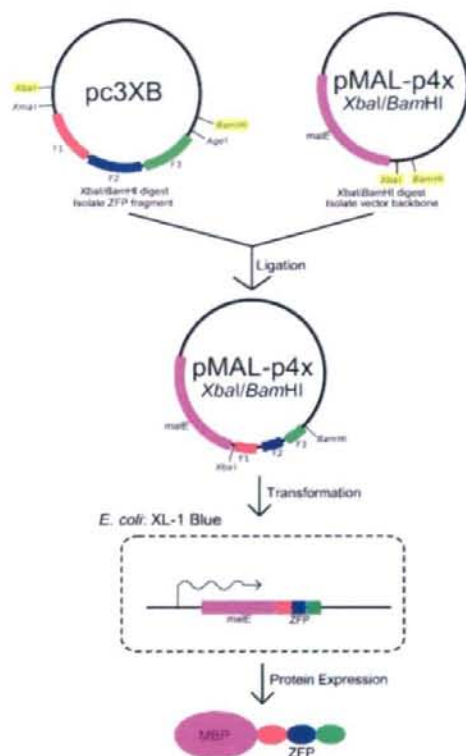


図 2. MBP 融合型 ZFP プラスミドの作製、および発現について

protein	size
MBP-ZFP4F	53kD
MBP-ZFP5F	56kD
MBP-ZFP6F	59kD

表 2. MBP-ZFP 融合タンパクの分子量

(2-3) サンドウィッチ ELISA による DNA 結合親和性の評価

得られた ZFP-MBP 融合タンパクを用いて、ZFP と標的配列の結合親和性をサンドウィッチ ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) により評価した。ZFP のモジュール数は 4F, 5F, 6F とした。96 穴マイクロプレートにストレプトアビジンをコーティングした。標的配列は、ヘアピン構造をとった DNA の 5' 末端をビオチン化することで、アビジン・ビオチンシステムを利用してプレート上に固定した。また、一次抗体に Monoclonal Anti-Maltose Binding Protein (MBP) (SIGMA) を、二次抗体に Anti-Mouse IgG(γ -chain specific)-Alkaline Phosphatase (SIGMA) を使用した。検出は基質を加え、酵素反応による基質の発光を分光光度計で測定した。4-Nitrophenyl phosphate disodium salt hexahydrate (SIGMA) を基質とし、反応 30 分後にプレートリーダーを用いて 405nm の吸光度により検出した (図 3)。

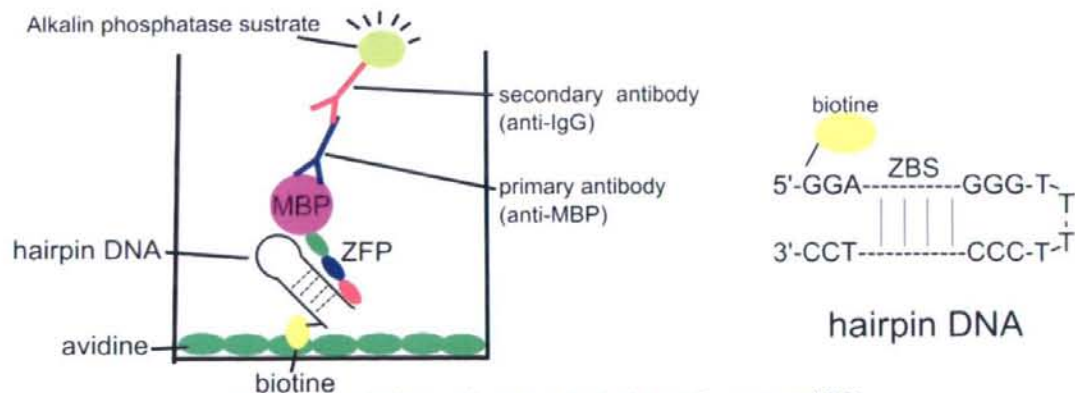


図 3. サンドウィッチ ELISA およびヘアピン DNA の構造

(3) モデルプラスミドを用いた DNA 組換え反応の評価

(3-1) 組換え反応モデルとするプラスミド DNA の設計

スペーサー配列に対する高活性 DNA 組換え酵素ドメインを得るために、分子進化法による酵素ドメインの最適化を行うことが可能である。そこで、分子進化法のための反応モデルとしてのプラスミド DNA を設計した。ZFP を用いた配列特異的 DNA 組換え反応を行うために、原核細胞由来の DNA 組換え酵素 Tn3 resolvase の酵素ドメインとの融合体を構築し、反応モデルとしてのプラスミド遺伝子の検討を行った。Tn3 resolvase は Tn3 トランスポゾンにコードされているタンパク質で、転移による Tn3 複製を行う際に配列特異的に組換え反応を起こす。Tn3 resolvase は N 末端側に約 140 アミノ酸の酵素ドメインと約 40 アミノ酸の DNA 結合ドメインを持ち、二つのドメインは短いリンカーで繋がれている。この酵素ドメインは二量体を形成することにより組換え反応を起こすことが知られている。反応モデルとして、EGFP (Enhanced Green Fluorescence Protein; 増幅緑色蛍光タンパク質) 遺伝子の両端に標的配列 (Zinc finger Binding Site; ZBS) をコードしたプラスミドを設計し、Tn3 の酵素ドメインを標的配列と同じベクター上に導入することで、組換え反応の効率を PCR およびフローサイトメーターにより確認できるように設計した (図 4 および 5)。

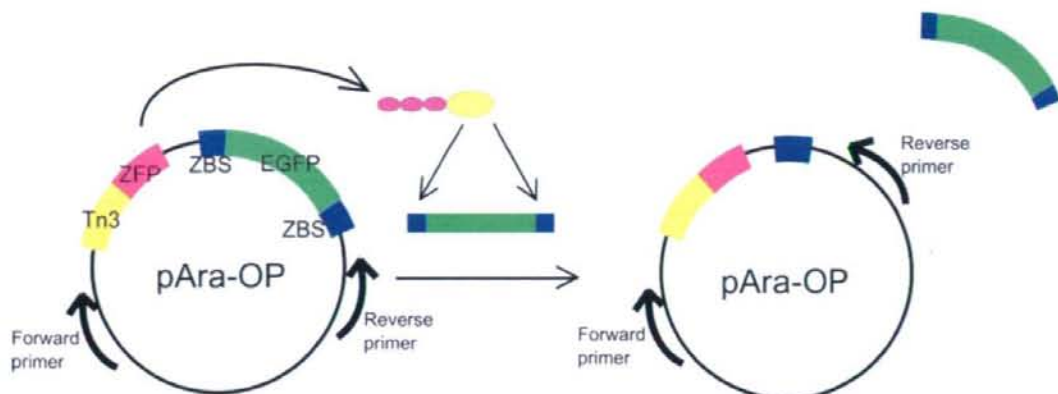


図 4. 反応モデルとしてのプラスミド DNA

ベクターに pAra-OP を用いて、酵素ドメイン Tn3 resolvase と ZFP の間にリンカーとして Gly-Ser-Gly-Arg-Ser-Gly-Glu-Lys-Pro というアミノ酸配列を入れた。作製手順は、まず ZBS-EGFP-ZBS-fragment (a) (図 5) を PCR により作製し、XbaI および SpeI により制限酵素処理を行った。同じく XbaI および SpeI で制限酵素処理し、CIP で脱リン酸化した pAra-OP とライゲーションした。このプラスミドは形質転換した大腸菌より精製して得た。

また、ZFP-fragment (b) を PCR により作製した。この時、ZFP をコードするプラスミド (ZF-pc3XB) を鋳型にし、ZFP の両端に pc3XB の配列を含むプライマーを設計して PCR を行った。また、ZFP の後ろにストップコドンを入れたものと、入れないものの 2 種を作製した。これは、pAra-OP の SacI

の後ろにある His6 タグを融合させた Tn3-ZFP 融合タンパクを発現させることで、タンパクの発現を確認できるようにするためである (図 6)。作製した ZFP フラグメントを BglII および SacI で制限酵素処理し、同じく BglII および SacI で制限酵素処理した fragment-(a) を含む pAra-OP とライゲーションした。このプラスミドを形質転換した大腸菌より精製して得た。さらに、Tn3 酵素ドメイン: fragment (c) を PCR により作製し、EcoRI および BglII で制限酵素処理した。この時、ライゲーション後に Tn3 と ZFP の間にリンカーの配列が入るようにプライマーを設計した。このプラスミドを形質転換した大腸菌のコロニーを SOB 液体培地で振とう培養することで、Tn3-ZFP 融合タンパクが発現され、ZFP が ZBS に結合することで Tn3 がスペーサー配列に近づき、酵素活性のある Tn3 を持

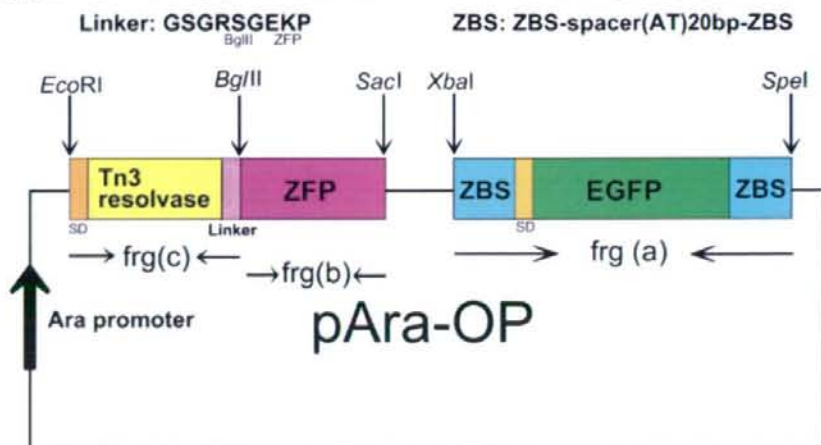


図 5. 反応モデルプラスミド DNA の設計

つプラスミドでは DNA 組換えが行われることが予想された (図 7)。

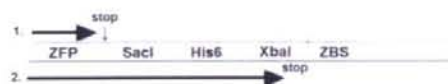


図 6. stop codon を導入した場合 (矢印 1) としなかった場合 (矢印 2) の発現の様子

(3-2) 酵素ドメイン wild type Tn3 resolvase および NM-resolvase を用いた反応

設計したプラスミド DNA の反応モデルとしての検討を行った。ZFP および ZBS には ELISA により結合活性の高いことが判明した site6 の DNA 配列を用いた。ZBS 内のスペーサー配列には野生型 Tn3 resolvase の標的配列 (*res*) の一つである *site1* の配列 (図 8a) より中央の 13 塩基対; AATATTATAAATT を取り出し、前方に 3 塩基対 (ACG)、後方に 4 塩基対 (GCAT) の 7 塩基対を加えた 20 塩基対 (Z+4)³を用いた (図 8b)。Tn3 resolvase は wild type と、すでに報告されている高活性な Tn3 resolvase; NM-resolvase を用いた。NM-resolvase は wild type よりアミノ酸 6 か所に変

異が入っている: R2A、E56K、G101S、D102Y、M103I、Q105L^{19,20}。NM-resolvase はプライマーを設計し、PCR により作製した。

ZBS-EGFP-ZBS のフラグメント: fragment (a) を PCR により作製し、XbaI/SpeI で切断した。XbaI/SpeI/CIP 処理した pAra-OP とライゲーションし、大腸菌に形質転換してプラスミドを精製した。さらに、ZFP フラグメント: fragment (b) を同じく PCR で作製し、BglII/SacI で切断した。BglII/SpeI/CIP 処理した ZBS-EGFP-ZBS/pAra-OP とライゲーションし、大腸菌に形質転換してプラスミドを精製した。

PCR により作製した wild type Tn3 resolvase および NM-resolvase: fragment (c) を EcoRI/BglII で切断し、EcoRI/BglII/CIP 処理した ZFP-ZBS-EGFP-ZBS/pAra-OP とライゲーションし、大腸菌 TOP10 にエレクトロポレーションにより形質転換した。コロニーをいくつか選択してプラスミドを精製し、PCR で増幅し、アガロース電気泳動により組換え反応を確認した。NM-resolvase を用いた組換え反応について PCR によって生成するバンドをアガロースゲル電気泳動により確認したのちに、シーケンス解析によって、詳細に組換え反応による配列の変化を確認した。

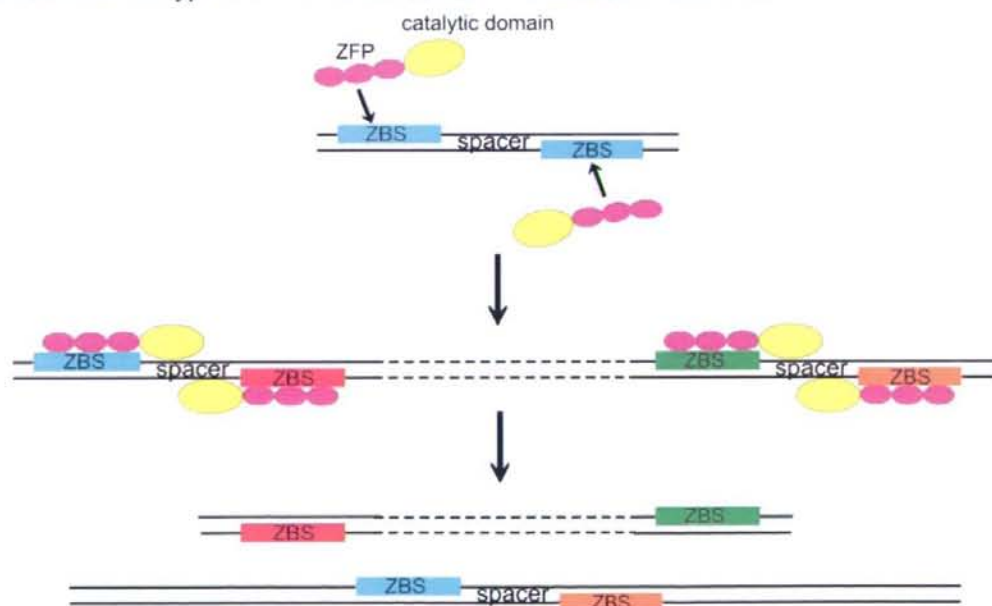


図 7. ZFP 融合型酵素による DNA 組換え反応

(a) 5' -CGTTCGAAATATTATAAAATTATCAGACA-3'

(b)

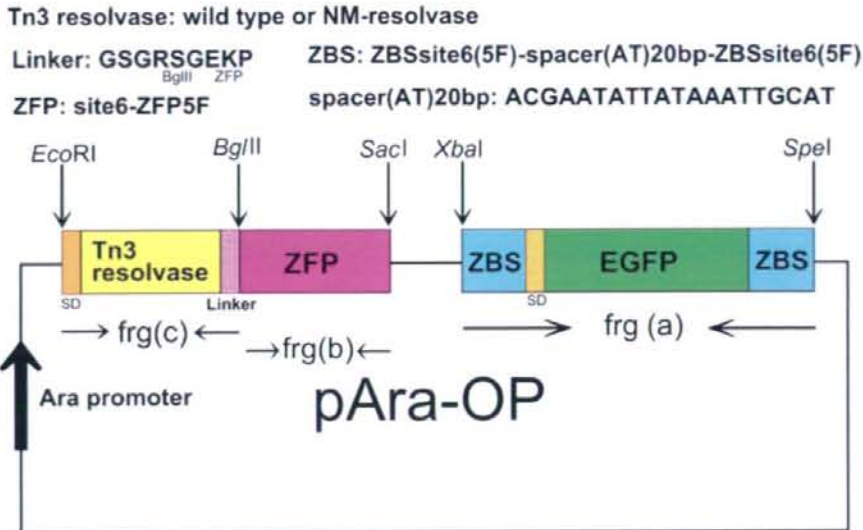


図 8. (a) Tn3 transposon SiteI (28 bp) の配列 (b) 反応モデルプラスミド DNA の検討

(3-3) ランダム化した Tn3 resolvase によるアミノ酸配列が及ぼす組換え反応効率への影響

前項で用いた反応モデルプラスミドを利用して、エラーブローンで変異を入れた NM-resolvase; randomized NM-resolvase の酵素活性評価を行えるかの検討を行った。エラーブローン PCR は GeneMorph[®] II Random Mutagenesis Kit を用いて行った。エラーブローン PCR により得た randomized NM-resolvase fragment を 1% アガロースゲル電気泳動により精製し、SacI および BamHI で制限酵素処理した。これを、fragment (a)、(b) まで導入し、SacI/BamHI で制限酵素処理した pAra-OP とライゲーションした。このプラスミドはエレクトロコンピテントセル (TOP10) にエレクトロポレーションし、LB 寒天培地に塗布した。培地に生えたコロニーをいくつか選択してプラスミドを精製し、PCR 後にアガロースゲル電気泳動による分析を行った。これらの中から酵素活性があるクローンを 9 個選択してアガロースゲル電気泳動およびシーケンス解析を行った。

ELISA

Prepare: 20 mL ZBA/3% BSA per plate (0.6 g BSA), filtered 0.45 μ m. 3 mL 2x dilution solution: 2 mL ZBA/3% BSA, 1 mL ZBA, 15 μ L 1M DTT, 72 μ L 10 μ g/ μ L Salmon Sperm DNA; s.sp.DNA (Bio Dynamics Laboratory Inc.). 40 mL ZBA/1% BSA (0.4 g BSA), filtered 0.45 μ m (9 mL per plate). Well solution: 20 mL ZBA/1% BSA, 100 μ L 1M DTT, 239 μ L 10 μ g/ μ L s.sp.DNA.

1. Coating: 96 well micro plate (Costar EIA/RIA polystyrene 1/2 area flat bottom, high binding, no lid, non sterile #3690) に 25 μ L 8ng/ μ L streptavidin を添加し、37°C 1h または 4°C 一晩インキュベートし、イオン交換水で 2 回洗う。**2. Coupling:** 各ウェルに 25 μ L 1 ng/ μ L biotinylated oligo (5'-GGA-target DNA-GGGTTTTCCC- target DNA-CCT-3', hairpin DNA) を添加して (no oligo in control column)、37°C, 1h インキュベートし、イオン交換水で 2 回洗う。**3. Blocking:** 各ウェルに 175 μ L ZBA/3% BSA を添加して 37°C, 1h インキュベートし、液を捨てる。イオン交換水による洗いは行わない。**4. Binding:** 25 μ L ZFP-MBP 融合タンパクと 25 μ L 2x dilution solution を最大濃度のウェルに添加する。

Well solution を用いて希釈系列を作製する。室温で 1 時間インキュベートし、イオン交換水で 10 回洗う。5. **Antibody binding**: 一次抗体 ; primary mouse monoclonal anti-MBP(clone MBP-17)(Sigma M-6295, 0.5 mL), 1:1000 in ZBA/1%BSA を 25 μ L 添加して室温で 30 分間インキュベートする。イオン交換水で 10 回洗う。二次抗体 ; secondary goat mouse IgG/Alk phosphatase(Sigma A-1047), 1:1000 in ZBA/1%BSA を 25 μ L 添加し、室温で 30 分間イン

キュベートする。イオン交換水で 10 回洗う。6. **Developping**: Alkaline phosphatase substrate tablet (Sigma 104, p-nitrophenylphosphate, disodium, 5 mg/tablet plus filling) を 5 mL developping buffer に溶かし、25 μ L ずつウェルに添加する。暗所で 30 分間インキュベート後、プレートリーダーを用いて 405 nm の吸光度で検出する。測定した吸光度から、GraphPad Prism 5 を用いて結合飽和曲線を作成し、その傾きから結合親和性を導きだした。



図 9. HIV NL-4.3 M19921 gag 遺伝子と選択した標的配列

	Site1	Site2	Site3	Site4	Site5	Site6
HIVJRCF M38429	100	100	94.4	94.4	94.4	100
HIVJRF U63632	100	100	100	94.4	100	100
HIVLAJ19 A04321	100	100	100	94.4	100	100
HXB2 AF033819	100	100	100	94.4	100	100

表 3. HIV NL-4.3 M19921 遺伝子と他の株間での相同性の比較(%)

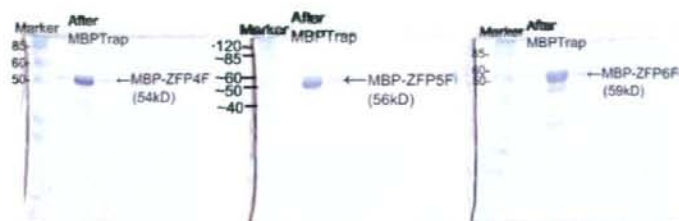


図 10. SDS-PAGE による精製亜鉛フィンガータンパク質の確認

		4F	5F	6F
site1	Kd (nM)	745.1	441.4	146.9
	R ²	0.9808	0.9935	0.9853
site2	Kd (nM)	655	279.2	175.4
	R ²	0.9770	0.9843	0.9720
site3	Kd (nM)	715.4	305.1	444
	R ²	0.9735	0.9889	0.9810
site4	Kd (nM)	15084	365.6	186.7
	R ²	0.9801	0.9607	0.9854
site5	Kd (nM)	1498	263.6	25.25
	R ²	0.9876	0.9766	0.9527
site6	Kd (nM)	159.1	124.8	14.68
	R ²	0.9602	0.9817	0.9632

表 4. ELISA 法を用いた亜鉛フィンガータンパク質の結合親和性の算出

Protein extract and Purifying pMAL Protein

ZFP を導入した pMAL-p4x のコロニーをピックアップし、3 mL SOB/amp で 37°C で一晩振とう培養した。培養液を 100 mL SOB/amp にスケールアップして 37°C で振とう培養し、OD=0.6 になったら 1mM IPTG/9 μM ZnCl₂ を加え、37°C で 3 時間振とう培養する。3000 rpm、室温で 10 分間遠心して菌体を回収し、PBS で洗ってもう一度 3000 rpm、室温で 10 分間遠心し、菌体を回収する。20 mL ZBA/1 mM DTT に懸濁し、ソニケーションにより菌体を破碎する。14000 rpm、4°C で 30 分間遠心し、タンパクの溶けている上清を回収する。MBPTrapTM HP 1mL (GE Healthcare) で MBP が融合した ZFP を精製し、各分画液 10 μL を用いて SDS-PAGE によりタンパクの存在を確認する。この時、MBPTrap の溶出液として 10 mM D-(+)-Maltose in ZBA/1 mM DTT を用いた。MBP-ZFP を含む分画を Amicon Ultra-4 Ultracel-10k (Millipore) を用いて ZBA/1 mM DTT へのバッファ交換と濃縮を行う。フィルター上層にサンプルと ZBA/1 mM DTT を加え、3500 rpm、4°C で 10 分間遠心する。フィルターの下層に落ちた溶液を

捨て、液量の減ったフィルターの上層に新たに ZBA/1 mM DTT を加え、もう一度 3500 rpm、4°C で 10 分間遠心する。この操作をさらに 3-4 回繰り返し行い、最終的に液量を 250-500 μL 程になるようにして、フィルター上層の溶液を回収する。

Bradford 法

色素 Coomassie brilliant blue G-250 が塩基性および芳香族アミノ酸の側鎖と結合し、その結果吸収のピークが 465 nm から 595 nm へシフトすることを利用した方法である。染色液(Bio-Rad Assay)を ZBA/1 mM DTT で 5 倍希釈したものの 200 μL に対してタンパク 10 μL を加え、595 nm の吸光度を測定する。Bovine serum albumin; BSA をスタンダードとして検量線を引き、濃度不明なタンパクの濃度を計算する。

C. 研究結果

(1) 標的 DNA 配列の選択

ZF Tools を用いた gag 遺伝子配列における標的候補配列として 3 箇所の配列を見出した (6 箇所の ZFP 結合配列、図 9)。これらについてモジュールプラスミドを用いて亜鉛フィンガー遺伝子の構



L, 1kb DNA Marker; C, Control (no Tn3); W, wild type Tn3 resolvase; Ms, NM-resolvase+stop codon; MH, NM-resolvase+His6 tag (no stop codon).

図 11. DNA 組換え反応の PCR による検出

築を行った。また、それぞれの標的候補配列について NL4-3 株以外のウイルス株における相同性を確認した結果、選択した候補配列においては 1 塩基の変異が確認されたが、全体としては高い相同性が確認された (表 3)。

(2) ZFP の標的 DNA 配列に対する結合親和性評価

構築した亜鉛フィンガー遺伝子は MBP 融合タンパク質として発現するために pMAL-p4x プラスミドに導入した。このプラスミドを大腸菌 XL-1 Blue に形質転換し、定法に従ってタンパク質を発現した。発現、精製を行った亜鉛フィンガータンパク質は精製を行い、その精製度を SDS-PAGE で確認した (図 10)。その結果、これらのタンパク質は 90%以上の純度で精製されたことが示された。

次に、この精製タンパク質を用いて ELISA 法を行い、それぞれの標的配列に対する結合定数を算出した (図 11、及び表 4)。

これらの結果より、site1-6 に対してモジュール数 4-6 個の ZFP は 15-15000 nM で結合することが判明した。ZFP のモジュール数が増えるに従って DNA への結合親和性も高くなっていく様子が見られる。特に、ZFP のモジュール数が 5-6 個のときは 15-440nM という低濃度で結合することが判明した。また、site6 (5'-配列-3') に対する ZFP は特に高い結合親和性を示した。

(3) モデルプラスミドを用いた DNA 組換え反応の評価

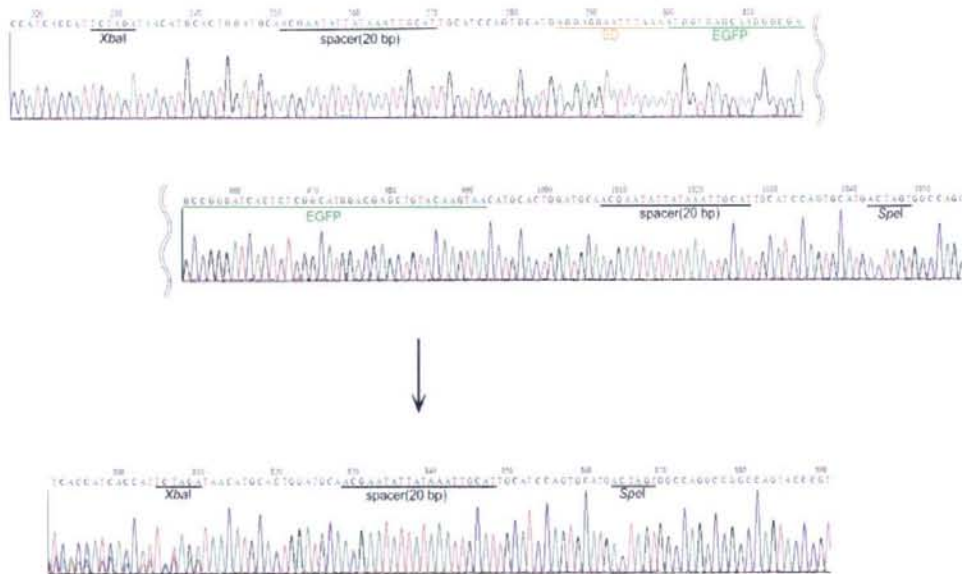
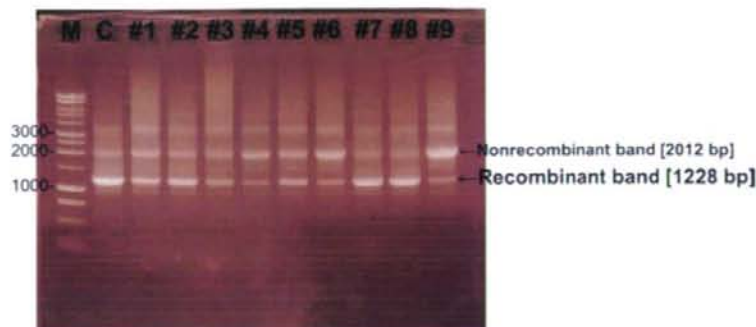


図 12. DNA 配列シーケンス解析による組換え反応の詳細について NM-resolvase+ZFP(His6 tag)-ZBS-EGFP-ZBS/pAra のシーケンス解析結果



M: 1kbp DNA Ladder. C: Control(NM-resolvase-ZFP(His6)-ZBS-EGFP-ZBS).
Clone#: randomized NM-resolvase+ZFP(His6)-ZBS-EGFP-ZBS

図 13. Randomized NM-resolvase(active) PCR



図 14. ランダム化した NM-resolvase active domain のシーケンス解析結果

作製した亜鉛フィンガータンパク質が DNA 組換え反応において DNA 結合ドメインとして機能することを確かめるためにモデルプラスミドを用

いた反応系を構築し、それを用いて組換え反応効率を検討した (図 11)。亜鉛フィンガードメインとして Site6 に結合する 5 フィンガードメインを用

いた ($K_d=125$ nM)。図 11 の実験においては組換え酵素ドメインと亜鉛フィンガータンパク質の融合タンパクの C 末端に Hisx6 タグが融合されているものとされていないものを用意して、その反応性をみた。結果として、Hisx6 タグの有無による反応効率への影響は確認されなかった。これらの結果より、設計したプラスミドはスペーサー配列に対する酵素ドメインの最適化を行う反応モデルとして適していることが判明した。また、His6 タグ融合体による組換え酵素反応に影響はないが、タンパク質発現へ影響している可能性があるため、今後は Hisx6 タグを融合したものと融合していないものとでタンパク質発現量を比較し、影響がないかどうかを検討する必要がある。

モデルプラスミドで得られた組換え反応について詳細に検討を行うために、反応前、および反応後のプラスミドのシーケンス解析を行った (図 12)。このプラスミドにおいては EGFP の遺伝子配列の両端に ZFP 結合サイトが配置されているため、組換え反応によって EGFP 遺伝子が切除される。実際のシーケンス解析の結果を確認するとそのように正確に ZFP 結合サイト (ZBS) において DNA 組換え反応が行われていることが確かめられた。

本研究においては標的配列に対してより高い反応効率を有する酵素ドメインを分子進化法を用いて選択することを予定している。このアプローチが有効であることを確かめるために酵素ドメインに対してエラーブローン PCR により変異を導入し、それによって生成する酵素ドメインの反応効率の変化を確認した。得られたクローンを 9 個ピックアップし、それぞれの反応効率を PCR によって確認した。この結果、元の酵素ドメインとは異なる反応性を有することが示された (図 13)。この結果を詳細に解析するためにそれぞれのクローンについてシーケンス解析を行い、酵素ドメインのアミノ酸配列に変換して配列の変化と反応効率の関係を解析した (図 14)。この結果を見ると、それぞれのクローンの変異は 1-2 箇所であるのに対して、反応効率では大きな違いが見られることが明らかになった。

D. 考察

HIV プロウイルス遺伝子、特に本研究では比較的変異が導入されにくい gag 遺伝子配列を標的とする亜鉛フィンガータンパク質の構築を行い、その結合親和性が最大のもので約 15 nM という高親和性のものが得られた。最終的な目標としては感染細胞における組換え反応を行うことを掲げているため、ここで示した *in vitro* での結合親和性はあくまで指標に過ぎないが、経験的に数 10~数 100 nM の親和性を有することによって哺乳類細胞内においても十分に DNA 結合機能を有することが明かにされているため、これらの亜鉛フィンガータンパク質は哺乳類細胞内においても十分に機能することが可能であると考えられる。また、構築した亜鉛フィンガードメインと組換え酵素ドメインの融合体によってモデルプラスミドに対する反応が示されたことは研究の進展に大きな一歩となったと言える。図 12 で示したように、このような組換え酵素を用いた反応は標的とした配列間に存在する遺伝子配列を切除することが的確に、かつ効率よく行うことが可能な非常に強力な手法である。研究者が意図した遺伝子配列において、意図した遺伝子配列の変換を行うという技術はこれまでに示されていない。また、この酵素反応の的確さは、哺乳類細胞内においての使用上重要となる毒性においても大きな有効性を有すると考えられる。これは、他の研究において示されている DNA 切断反応によって自発的な DNA 組換えを誘発する方法においては標的配列以外においての反応も起こるという問題をみても明かである⁴⁾。的確な反応は他の遺伝子配列を傷付ける事無く、プログラムされた配列の変換を可能にする。現時点では、大腸菌内における反応での確認であるが、今後哺乳類細胞内での反応性を確認することによってその有効性がさらに示されると期待される。

E. 結論

本研究では、AIDS の新規治療法として、ZFP を利用した遺伝子治療法を提案した。HIV 感染細胞のゲノムに取り込まれている HIV プロウイルス

遺伝子を、ZFP 融合型 DNA 組換え酵素により切除する方法に取り組んだ。ZFP 融合型酵素を用いて標的配列に対する能動的な組換えを行うことで、確実なノックアウトが可能になると考えた。また、ZFP の高い標的配列選択性により細胞への毒性も低く抑えられると考えられた。

本論では、HIV プロウイルス遺伝子の中で比較的保存度の高い gag 遺伝子を標的とし、スペーサー配列を 20 塩基対に設定した標的配列を、HIV プロウイルス株の HIV NL-4.3 M19921 および 4 種の変異株 (HIVJRCFS M38429, HIVJRFL U63632, HIVLAIJ19 A04321, HXB2 AF033819) より相同性の高い配列から 6 種選択した。これらの標的配列に結合する ZFP の遺伝子を 4-6 個のモジュールを組み合わせて作製した。これらの ZFP と標的配列との結合親和性をサンドウィッチ ELISA により評価を行うために、構築した ZFP を MBP との融合体として発現・精製し、プレート上に固定した 5' 末端をビオチン化した標的 DNA 配列に対する結合を検討した。その結果、構築した ZFP は 15~15000nM で結合することが判明した。ZFP のモジュール数が増えるに従って DNA への結合親和性も高くなり、ZFP のモジュール数が 5-6 個のときは 15~440nM という低濃度で結合することが判明した。また、標的配列別に見ると、site6(HIV NL-4.3 gag 698-)に対する ZFP は高い結合親和性を示すことが判明した。

これらの ZFP を用いた配列特異的 DNA 組換え反応を行うために、原核細胞由来の DNA 組換え酵素 Tn3 の活性ドメインとの融合体を構築し、反応モデルとしてのプラスミド遺伝子の検討を行った。反応モデルとして、緑色蛍光タンパク質; EGFP 遺伝子の両端に標的配列をコードしたプラスミドを設計し、Tn3 の酵素ドメインを標的配列と同様ベクター上に導入することで、組換え反応の効率を PCR およびフローサイトメーターにより確認できるように設計した。この時、Tn3 は野生型と既に報告されている高活性 Tn3 変異体; NM-resolvase を用いて検討を行った。その結果、今回設計したプラスミドは、Tn3 組換え酵素の活性評価を行う

のに有効であることが判明した。このプラスミドを用いて、NM-resolvase をエラーブローン PCR により変異を導入した Tn3 クローンの DNA 組換え活性の評価をおこなったところ、いくつかの高活性な Tn3 クローンを見出すことができた。

今後は、これらのクローンを用いて分子進化法によってスペーサー配列に対する酵素ドメインの最適化を行うことで、より高活性なクローンを見出すことが期待できる。さらに、分子進化法によって得られた DNA 組換え酵素の哺乳類細胞内での標的配列に対する機能評価を行い、そこから得られた高活性な酵素を用いて、感染細胞からのプロウイルスの除去について検討していくことで、ZFP 融合型 DNA 組換え酵素を用いた新たな HIV 遺伝子治療法の確立が期待できる。さらに、HIV の遺伝子治療における更なる発展に貢献できると考えられる。

[参考文献]

- 1) Mandell, J. G., Barbas, C. F., III *Nucleic Acids Res.* **2006**, *34*, W516-23.
- 2) Wright, D. A., Thibodeau-Beganny, S., Sander, J. D., and Joung, J. K.. *Nat. Protocols* **2003**, *1*, 1637-1652.
- 3) Akopian, A., He, J., Boocock, M. R., and Stark, W. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 8688-8691.
- 4) Miller, J. C., et al. *Nat. Biotech.* **2007**, *35*, 4453-4463.

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nomura W, Tanabe Y, Tsutsumi H, Tanaka T, Ohba K, Yamamoto N & Tamamura H. Fluorophore Labeling Enables Imaging and Evaluation of Specific CXCR4-Ligand Interaction at the Cell Membrane for Fluorescence-Based Screening. *Bioconjugate Chem.* **19**: 1917-1920, 2008.
- 2) Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Tanabe Y, Ohashi N, Esaka A, Ochiai C, Sato J, Itotani K, Murakami T, Ohba K, Yamamoto N, Fujii N & Tamamura H Structure-activity Relationship

- Study of CXCR4 Antagonists Bearing the Cyclic Pentapeptide Scaffold: Identification of the New Pharmacophore. *Org. Biomol. Chem.* 6: 4374-4377, 2008.
- 3) Tamamura H, Tsutsumi H, Nomura W, Tanaka T & Fujii N. A Future Perspective on the Development of Chemokine Receptor CXCR4 Antagonists. *Expert Opin. Drug Discovery* 3(10): 1155-1166, 2008.
 - 4) Tamamura H, Tsutsumi H, Nomura W & Fujii N. Exploratory Studies on Development of the Chemokine Receptor CXCR4 Antagonists toward Downsizing. *Perspectives in Medicinal Chemistry* 2: 1-9, 2008.
 - 5) Ohashi N, Nomura W, Kato M, Tsutsumi H, Itotani K, Ikura T, Ito N, Yoshida K, Lewin NE, Blumberg PM & Tamamura H. Fluorescent labeling for PKC delta C1b domain and its application to sensing biology. *Peptide Science* 2008, Motoyoshi Nomizu (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 61-62, 2009.
 - 6) Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Tanabe Y, Ohashi N, Esaka A, Ochiai C, Sato J, Itotani K, Murakami T, Ohba K, Yamamoto N, Fujii N & Tamamura H. Structure-activity relationship study of CXCR4 antagonists on the cyclic pentapeptide scaffold: identification of new pharmacophore moieties. *Peptide Science* 2008, Motoyoshi Nomizu (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 273-276, 2009.
 - 7) Ochiai C, Yamada Y, Yoshimura K, Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Masuno H, Itotani K, Shibata J, Hatada M, Matsushita S & Tamamura H. Small-sized CD4 mimics targeted for dynamic supramolecular mechanism of HIV-1 entry. *Peptide Science* 2008, Motoyoshi Nomizu (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 297-298, 2009
 - 8) Nakanishi Y, Komano A, Tsutsumi H, Nakahara T, Yanagisawa T, Suzuki S, Ohashi N, Tanaka T, Nomura W, Urano E, Han Y, Fuji H, Hamatake M, Miyauchi K, Morikawa Y, Hashino T, Sugiura W, Yamamoto N & Tamamura H. Development of inhibitory peptides against HIV-1 integrase. *Peptide Science* 2008, Motoyoshi Nomizu (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 315-316, 2009.
 - 9) Tanaka T, Nomura W, Tanabe Y, Tsutsumi H, Ochiai C, Sato J, Itotani K, Ohba K, Yamamoto N & Tamamura H. Development of fluorescent labeled CXCR4 specific ligand for imaging and fluorescence-based screening. *Peptide Science* 2008, Motoyoshi Nomizu (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 419-422, 2009.
 - 10) Abe S, Tsutsumi H, Mino T, Haseyama M, Ohashi N, Tanaka T, Nomura W & Tamamura H. Development of a novel tag-probe system for fluorescent imaging of proteins in living cells. *Peptide Science* 2008, Motoyoshi Nomizu (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 443-444, 2009.
 - 11) Serizawa Y, Nomura W, Ohashi N, Okuda Y, Matsumoto H, Tsutsumi H, Furuta T & Tamamura H. Development of caged diacylglycerol-lactone derivatives and their applications. *Peptide Science* 2008, Motoyoshi Nomizu (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 479-480, 2009.
 - 12) Nomura W, Tamamura H & Barbas CF, III. Site-selective cytosine methylation by a split DNA methylase. *Peptide Science* 2008, Motoyoshi Nomizu (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 491-492, 2009.
2. 学会発表
- 1) 野村渉, 玉村啓和, Carlos F. Barbas, III. 標的遺伝子を特異的にメチル化する分割型酵素の開発. 日本ケミカルバイオロジー研究会第3回年会抄録集, 67, 2008.
 - 2) 大橋南美, 堤浩, 野村渉, 加藤舞, 松本洋典, 田中智博, 増野弘幸, 吉田清嗣, 伊倉貞吉, 伊

- 藤暢聡, 玉村啓和. 蛍光標識した PKC C1B ドメインの化学合成とその応用. 日本ケミカルバイオロジー研究会第 3 回年会抄録集, 76, 2008.
- 3) 落合千裕, 山田裕子, 吉村和久, 田中智博, 堤浩, 野村 涉, 増野弘幸, 糸谷恭子, 柴田潤二, 畑田万紀子, 松下修三, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構をターゲットとした CD4 mimic 小分子の創製. 日本ケミカルバイオロジー研究会第 3 回年会抄録集, 77, 2008.
- 4) 田中智博, 野村涉, 堤 浩, 田部泰章, 大橋南美, 糸谷恭子, 大石真也, 藤井信孝, Barry Evans, Zi-xuan Wng, Stephen C peiper, 玉村啓和. 新規ファルマコフォアを有するケモカインレセプターCXCR4 アンタゴニストの構造活性相関研究. 日本ケミカルバイオロジー研究会第 3 回年会抄録集, 93, 2008.
- 5) 芹澤雄樹, 野村涉, 大橋南美, 奥田善章, 松本洋典, 堤浩, 玉村啓和. ケージドジアシルグリセロール-ラクトンの合成と機能評価. 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム講演要旨集, 130, 2008.
- 6) 野村涉, 加藤舞, 増田朱美, 堤浩, 玉村啓和. 分子進化法による配列特異的 DNA 組換え酵素の機能最適化. 第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム講演要旨集, 340, 2008.
- 7) 大橋南美, 野村涉, 加藤舞, 堤浩, 糸谷恭子, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 吉田清嗣, Nancy E. Lewin, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. Fluorescent labeling for PKC delta C1b domain and its application to sensing biology. 第 45 回ペプチド討論会講演要旨集, 24, 2008.
- 8) 田中智博, 堤 浩, 野村 涉, 田部泰章, 大橋南美, 江坂 藍, 落合千裕, 佐藤 淳, 糸谷恭子, 村上 努, 大庭賢二, 山本直樹, 藤井信孝, 玉村啓和. Structure-activity relationship study of CXCR4 antagonists based on the cyclic pentapeptide scaffold: identification of new pharmacophore moieties. 第 45 回ペプチド討論会講演要旨集, 112, 2008.
- 9) 落合千裕, 山田裕子, 吉村和久, 田中智博, 堤浩, 野村涉, 増野弘幸, 糸谷恭子, 柴田潤二, 畑田万紀子, 松下修三, 玉村啓和. Small-sized CD4 mimics targeted for dynamic supramolecular mechanism of HIV-1 entry. 第45回ペプチド討論会講演要旨集, 123, 2008.
- 10) 中西勇太, 駒野淳, 堤浩, 中原徹, 柳澤貴之, 鈴木慎太郎, 大橋南美, 田中智博, 野村涉, 浦野恵美子, 敵馬華, 藤秀義, 濱武牧子, 宮内浩典, 森川裕子, 星野忠次, 杉浦 互, 山本直樹, 玉村啓和. Development of inhibitory peptides against HIV-1 integrase. 第 45 回ペプチド討論会講演要旨集, 128, 2008.
- 11) 田中智博, 野村涉, 田部泰章, 堤浩, 落合千裕, 佐藤淳, 糸谷恭子, 大庭賢二, 山本直樹, 玉村啓和. Development of fluorescent labeled CXCR4 specific ligand for imaging and fluorescence-based screening. 第45回ペプチド討論会講演要旨集, 173, 2008.
- 12) 阿部清一郎, 堤浩, 養友明, 長谷山正樹, 大橋南美, 田中智博, 野村涉, 玉村啓和. Development of a novel tag-probe system for fluorescent imaging of proteins in living cells. 第 45 回ペプチド討論会講演要旨集, 184, 2008.
- 13) 芹澤雄樹, 野村涉, 大橋南美, 奥田善章, 松本洋典, 堤浩, 古田寿昭, 玉村啓和. Development of caged diacylglycerol-lactone derivatives and their applications. 第 45 回ペプチド討論会講演要旨集, 198, 2008.
- 14) 野村涉, 玉村啓和, Carlos F. Barbas, III. Site Selective Cytosine Methylation by a Split DNA Methylase. 第 45 回ペプチド討論会講演要旨集, 202, 2008.
- 15) 山田裕子, 吉村和久, 落合千裕, 田中智博, 柴田潤二, 畑田真紀子, 堤浩, 野村涉, 松下修三, 玉村啓和. HIV 侵入の動的超分子機構を標的とした CD4 mimic. 第 27 回メディシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集, 58, 2008.
- 16) 野村涉, 芹澤雄樹, 大橋南美, Nancy E. Lewin, 堤浩, 吉田清嗣, Peter M. Blumberg, 古田寿昭,

玉村啓和. ケージドDAG-ラクトンによるプロテインキナーゼCの活性化制御. 日本薬学会第129年会要旨集, vol. 2, 80, 2009.

- 17) 大橋南美, 野村渉, 加藤舞, 堤浩, 糸谷恭子, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 吉田清嗣, Nancy E. Lewin, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. PKC C1bドメインの合成およびその蛍光性誘導体を用いた新規スクリーニング法の開発. 日本薬学会第129年会要旨集, vol. 2, 80, 2009.
- 18) 田中智博, 野村渉, 田部泰章, 堤浩, 糸谷恭子, 大庭賢二, 村上努, 山本直樹, 玉村啓和. 蛍光性CXCR4特異的リガンドの開発: スクリーニングおよびイメージングへの展開. 日本薬学会第129年会要旨集, vol. 2, 153, 2009.
- 19) 橋本知恵, 堤浩, 田中智博, 中原徹, 野村渉, 大庭賢二, 村上努, 山本直樹, 玉村啓和. HIV-1 コレセプターCXCR4を基にした人工設計型抗原分子の開発. 日本薬学会第129年会要旨集, vol. 2, 153, 2009.
- 20) 野村渉, 増田朱美, 加藤舞, 大庭賢二, Carlos F. Barbas, III, 山本直樹, 玉村啓和. 配列特異的DNA組換え酵素におけるDNA結合親和性及び組換え反応効率への影響. 日本薬学会第129年会要旨集, vol. 3, 110, 2009.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

別添5

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
1) Nomura W, Tanabe Y, Tsutsumi H, Tanaka T, Ohba K, Yamamoto N & Tamamura H.	Fluorophore Labeling Enables Imaging and Evaluation of Specific CXCR4-Ligand Interaction at the Cell Membrane for Fluorescence-Based Screening.	Bioconjugate Chemistry	19	1917-1920	2008
2) Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Tanabe Y, Ohashi N, Esaka A, Ochiai C, Sato J, Itotani K, Murakami T, Ohba K, Yamamoto N, Fujii N & Tamamura H.	Structure-activity Relationship Study of CXCR4 Antagonists Bearing the Cyclic Pentapeptide Scaffold: Identification of the New Pharmacophore.	Organic & Biomolecular Chemistry	6	4374-4377	2008
3) Tamamura H, Tsutsumi H, Nomura W, Tanaka T & Fujii N.	A Future Perspective on the Development of Chemokine Receptor CXCR4 Antagonists.	Expert opinion in drug discovery	3(10)	1155-1166	2008
4) Tamamura H, Tsutsumi H, Nomura W & Fujii N.	Exploratory Studies on Development of the Chemokine Receptor CXCR4 Antagonists toward Downsizing.	Perspectives in Medicinal Chemistry	2	1-9	2008
5) Ohashi N, Nomura W, Kato M, Tsutsumi H, Itotani K, Ikura T, Ito N, Yoshida K, Lewin NE, Blumberg PM & Tamamura H.	Fluorescent labeling for PKC delta C1b domain and its application to sensing biology.	Peptide Science 2008	Motoyoshi Nomizu (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka	61-62	2009
6) Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Tanabe Y, Ohashi N, Esaka A, Ochiai C, Sato J, Itotani K, Murakami T, Ohba K, Yamamoto N, Fujii N & Tamamura H.	Structure-activity relationship study of CXCR4 antagonists on the cyclic pentapeptide scaffold: identification of new pharmacophore moieties.	Peptide Science 2008	Motoyoshi Nomizu (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka	273-276	2009
7) Ochiai C, Yamada Y, Yoshimura K, Tanaka T, Tsutsumi H, Nomura W, Masuno H, Itotani K, Shibata J, Hatada M, Matsushita S & Tamamura H.	Small-sized CD4 mimics targeted for dynamic supramolecular mechanism of HIV-1 entry.	Peptide Science 2008	Motoyoshi Nomizu (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka	297-298	2009