

200932045A

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 21 年度 総括研究報告書

主任研究者 野村 渉

平成 22 年 (2010) 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 21 年度 総括研究報告書

主任研究者 野村 渉

平成 22 年 (2010) 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 | ----- | 1 5 |
|--------------------|-------|-----|

| | | |
|------------------|-------|-----|
| III. 研究成果の刊行物・印刷 | ----- | 1 9 |
|------------------|-------|-----|

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 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行った。構築した DNA 組換え酵素は哺乳類細胞のゲノム遺伝子に存在する標的配列において組換え反応を行い、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

[研究の背景]

これまでの研究から、ほぼ全てのコドン配列に対応する亜鉛フィンガータンパク質 (Zinc Finger Protein; ZFP) のモジュールが作成されているため標的とする遺伝子配列に対して特異的に結合するドメインをデザインすることが可能である。DNA 修飾酵素の DNA 結合ドメインを ZFP に置換することで配列特異的に働く酵素の作製が注目されている。例として、Type IIS 制限酵素 *FokI* の DNA 結合ドメインを ZFP とした融合型酵素 (Zinc Finger Nuclease; ZFN) はこれまでに盛んに研究が行われている。ZFN はゲノム配列中のターゲット部位で二量体を形成後に二本鎖切断を起こす。切断後は短い挿入や欠損によって修復が行われる NHEJ (Non-Homologous End Joining)、または donor template を基に修復が行われる HR (Homologous Recombination) がある。ZFN による遺伝子ターゲティングは部位特異的に、また永久に植物や哺乳類細胞のゲノム上で二本鎖切断を介したゲノム修飾がなされる。X 連鎖重症複合免疫不全症の原因となる IL2R γ 遺伝子上に生じた変異部位を ZFN

の標的とした研究では、変異ヒト細胞において 18% という反応効率 DNA の相同組換えを起こし、遺伝子修復されたヒト細胞が選択条件なしに得られ、そのうちの約 3 分の 1 では 2 対の染色体の両方で組換えを起こした。また、HIV-1 侵入の主要なコレセプターである CCR5 の 32 塩基の欠損 ($\Delta 32$) が HIV-1 に対する耐性を獲得するという知見から ZFN で CCR5 の標的部位に変異を起こすことによる HIV-1 耐性の CD4 陽性 T 細胞を構築する研究も行われている。しかし、ZFN によるゲノム修飾においては触媒ドメインが非特異的に二量体を形成すると切断によって DNA 配列へ欠損や挿入などの変異が起こることから、細胞毒性や二本鎖切断後に細胞内の遺伝子修復機構の働きによって生じる配列の予測が困難である点が問題となっている。

そこで DNA 組換え酵素の働きに着目し、組換え酵素の DNA 結合ドメインを ZFP とした融合型酵素 (RecZFP) による特異的組換え反応を評価することを構想した。DNA 組換え酵素である Tn3 resolvase をはじめ部位特異的 DNA 組換え反応を行う酵素には tyrosine recombinase family と serine

recombinase family がある。これら2つのファミリーは反応中間体としてタンパク質と DNA の共有結合を形成するアミノ酸残基にちなんで命名されている。tyrosine recombinase は Holiday 結合中間体を形成するペア中で一本鎖切断と再結合を行うのに対して serine recombinase はストランド交換と再結合に先立って二本鎖切断を行う。Tyrosine recombinase family には Cre や Flp などがある。Serine recombinase family には Tn3 や $\gamma\delta$ のようなト

ランスポゾンにコードされている cointegrate-resolving recombinase の resolvase と、*Salmonella* の鞭毛の状態変化の役割をする Hin invertase や phage Mu が感染する際に働く Gin invertase などが存在する。これら4種類は触媒に直接関わる部位の配列や活性部位の構造などに関わる配列の保存性が高いことが明らかにされている。

Tn3 や $\gamma\delta$ は最初に resolvase の部位特異的組換えシステムが発見され、これまでに最も研究が行わ

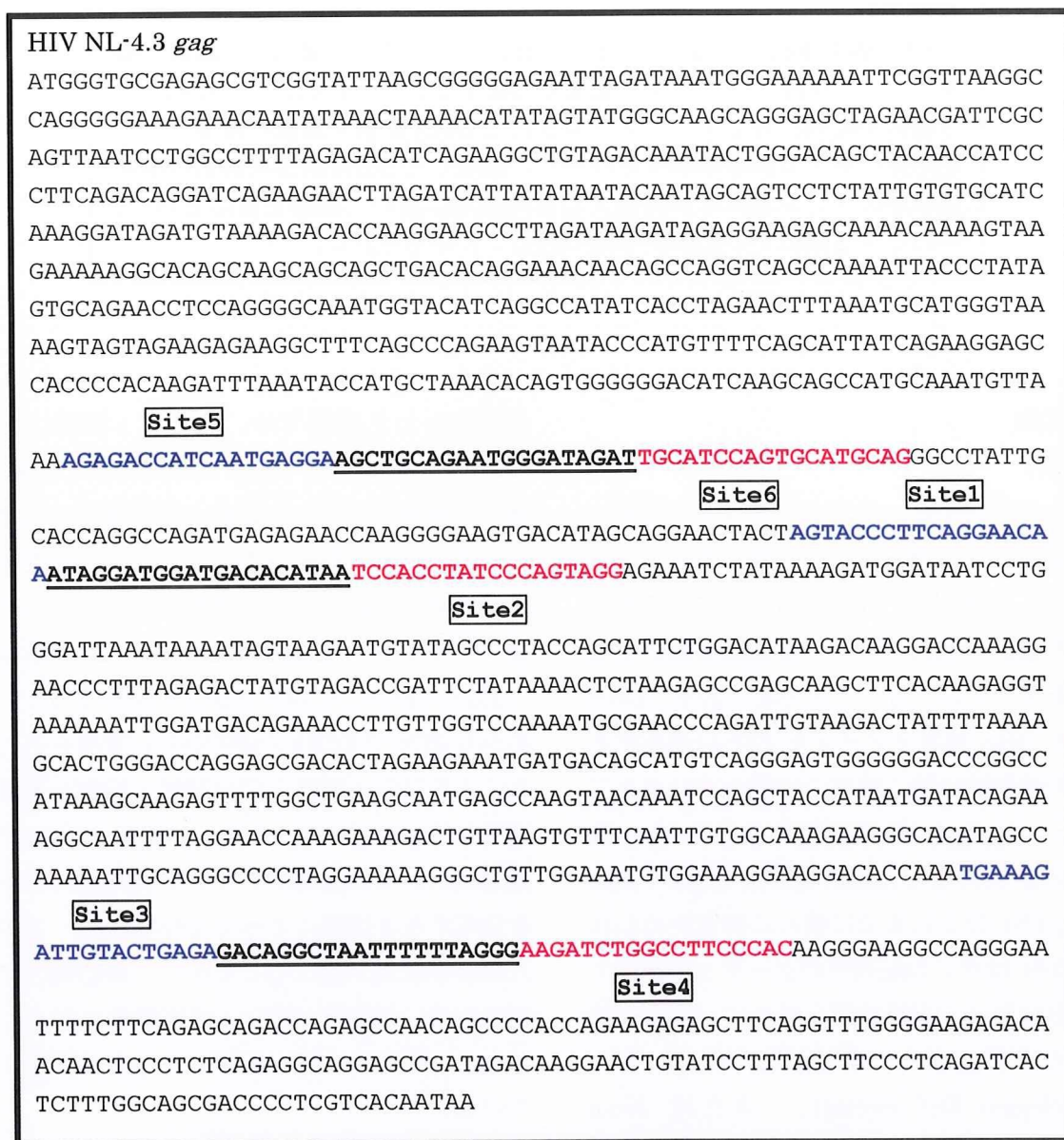


図 1. HIV NL-4.3 M19921 gag 遺伝子と選択した標的配列

| | Site1 | Site2 | Site3 | Site4 | Site5 | Site6 |
|---------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| JRCSF M38429 | 100 | 100 | 94.4 | 94.4 | 94.4 | 100 |
| JRFL U63632 | 100 | 100 | 100 | 94.4 | 100 | 100 |
| LAIJ19 A04321 | 100 | 100 | 100 | 94.4 | 100 | 100 |
| HXB2 AF033819 | 100 | 100 | 100 | 94.4 | 100 | 100 |

表 1. HIV NL-4.3 M19921 遺伝子と他の株間での相同性の比較(%)

れてきた。 $\gamma\delta$ resolvase は X 線結晶構造解析がなされており、アミノ酸一次配列の相同性が非常に高い Tn3 においても同様の反応機構であると考えられている。resolvase が反応するためには、組換え部位の複合体と基質がネガティブスーパーコイル構造をとっている必要がある。resolvase の典型的な反応では、繰り返しの 114 bp の *res sites* を含むスーパーコイル状態のプラスミドが 2 つの環状分子に分解され、それぞれが一カ所の *res site* を含む構造になる。次にアクセサリ結合部位の site II と site III が絡み合ったシナプス状の中間体の構造が 2 つの部位を近接させて 2 つの site I での鎖交換反応を進行させることにより分解が起こる。この反応機構では組換えに先立って 2 コピーの *res* を会合させて保持することが重要であり、結果としてシナプス状の複合体を形成する。アクセサリ部位の特異的な絡みつきは組換え中間体の選択に関与しており、その構造は resolvase が site I に結合することを活性化するために必要であると考えられる。この活性化が構造的なものであるか、もしくは site I に結合するとともに site II と site III への resolvase の接触がサブユニットを直接的に活性化するかについては明らかになっていない。

Tn3 resolvase の変異体解析により、反応条件を選択することで 2 つの *res sites* の必要性がなくなることが示され、28 bp のみの site I の切断で組換えを起こす変異体の単離に成功している。さらに野生型の resolvase と異なりこれらの変異体の活性は site への結合や基質 DNA のネガティブスーパーコイル状態に依存しないことが示された。このような特徴をもつ Tn3 変異体は遺伝子マニピュレーション、人為的な遺伝子編集のためのツールとしての応用が期待されている。

その応用例の一つとして HIV-1 プロウイルス遺伝子が挙げられる。HIV-1 の LTR 配列を標的として Cre 変異体を用いてプロウイルス遺伝子の除去を行った研究が報告されているが、この例では Cre の認識配列が標的配列に含まれているモデル遺伝子を使用しているため、本来のプロウイルス遺伝子を標的にはできない。HIV はレトロウイルス科

レトロウイルスに属しており、宿主細胞に対して感染をした場合に逆転写酵素によってウイルス RNA から遺伝子が合成され、それが宿主のゲノム遺伝子に挿入される。このようなレトロウイルスの特性に対して、標的とする遺伝子配列を切除できる組換え酵素技術を用いることでウイルス活性の抑制が期待できる。

[本研究の目的]

本研究では、RecZFP の標的配列に特異的な組換え反応をゲノム遺伝子に対して応用することで新たな遺伝子抑制方法を開発することを目的として最適な活性を有する組換え酵素デザインを行うための基礎研究を目的とした。

応用例として挙げている HIV-1 感染症における治療法として現在では薬剤を用いた HAART 療法が成果を上げているが、耐性ウイルスの出現や、体内からウイルスを完全に除去することが困難であり根本的な治療法が未だに開発されていないことが問題とされる。RecZFP を用いたプロウイルス遺伝子を標的とする遺伝子抑制法ではこれらの問題の解決につながると考えられる。RecZFP による反応では、反応後の遺伝子配列が制御可能な点、また能動的組換え反応が可能で宿主細胞内の HIV-1 プロウイルスの除去に適していると考えられるため、体内ウイルス量を減少させることが期待される。

本研究ではまず、HIV-1 プロウイルス遺伝子の中で比較的保存性の高い gag 遺伝子を標的配列として、標的配列に結合する ZFP の遺伝子の作製を行い、それらの融合酵素として RecZFP を構築する。RecZFP の活性に対して影響を与える要素として、特に ZFP の DNA 結合親和性、および酵素ドメインと ZFP をつなぐリンカー配列が重要であると考えられるため、さまざまな変異体を構築し、大腸菌内、および哺乳類細胞内での反応効率を評価することを計画した。最終目標としてゲノム遺伝子に対して高い反応効率で働く融合酵素を理論的かつ容易に設計するに足る組み立てだった知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

RecZFP の標的配列について ZFP モジュールを組み合わせた標的配列候補の探索を HIV-1 プロウイルス株の HIV NL4-3 M19921 の *gag* 遺伝子領域内において行った (図 1)。標的配列候補のうち HIV NL4-3 M19921 と他 4 種の変異株 (JRCSF M38429, JRFL U63632, LAI19 A04321, HXB2 AF033819) の *gag* 遺伝子配列において高い相同性が確認できた (表 1)。本研究で構築した組換え反応系では Site 6 を ZFP 結合部位とし、組換え酵素 Tn3 が活性を示すことが明らかにされている既知配列をスペーサー配列とした (図 1)。標的配列に結合する ZFP の作製は各コドン配列に対応する ZFP モジュールをコードした pc3 XB プラスミドベクターを基にして 2~6 個の ZFP モジュール遺伝子を連結したプラスミドを作製した。pc3XB ベクターは Addgene の pc3 XB ZF58-106 (Barbas modules) を使用した。まず、F1 遺伝子をコードするプラスミド pc3 XB-F1 を *AgeI/BamHI* で制限酵素切断した後に脱リン酸化処理を行った。これに pc3 XB-F2 より *XmaI/BamHI* フラグメントとして切り出した F2 遺伝子を T4 ligase により挿入し、F1 遺伝子の 3' 側に F2 遺

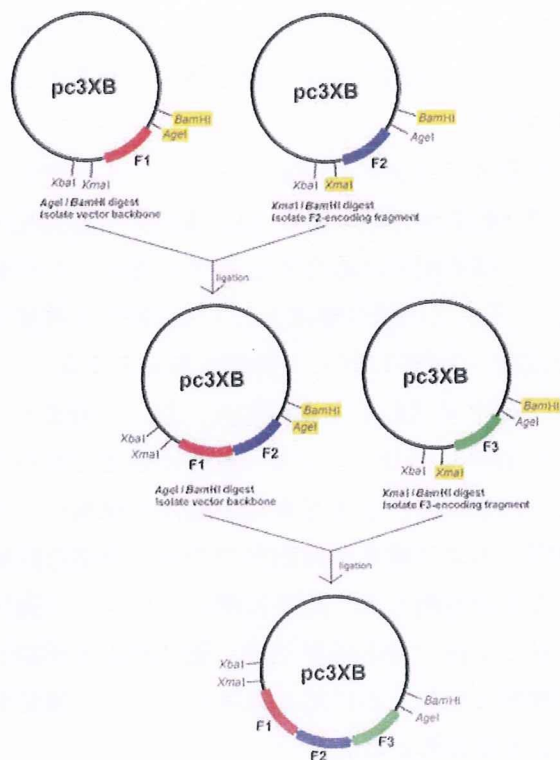


図 2. ZFP 遺伝子の作製方法について

子を持つ pc3 XB F1/F2 を得た。同様の操作を繰り返して、2F~6F の配列を持つプラスミドを作製した (図 2)。

ZFP と標的配列の結合親和性を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法により評価するためにマルトース結合タンパク質 (Maltose binding protein: MBP) と ZFP の融合タンパク質 (MBP-ZFP) の発現と精製を行った。タンパク質発現用の pMAL-p4x プラスミドベクターに ZFP 遺伝子配列を導入するために、マルチクローニングサイト (Multi cloning site; MCS) を改変して ZFP 遺伝子配列が N 末端側から挿入可能にした (図 3)。目的とする MBP-ZFP を発現後に大腸菌を破碎して抽出したタンパク質溶液から MBPTrap™ HP 1 mL (GE Healthcare) により MBP-ZFP を精製し、SDS-PAGE によりタンパク質の精製度を確認した。精製したタンパク質の濃度測定は Bradford 法で行った。得られた MBP-ZFP を用いて、2F~6F の ZFP と標的 DNA 配列との結合親和性をサンドウィッチ

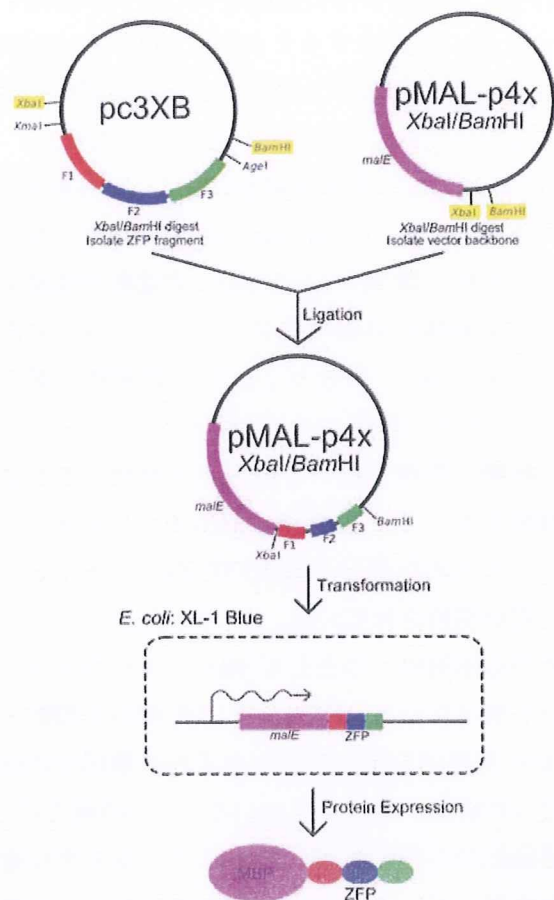


図 3. MBP 融合型 ZFP プラスミドの作製、および発現について

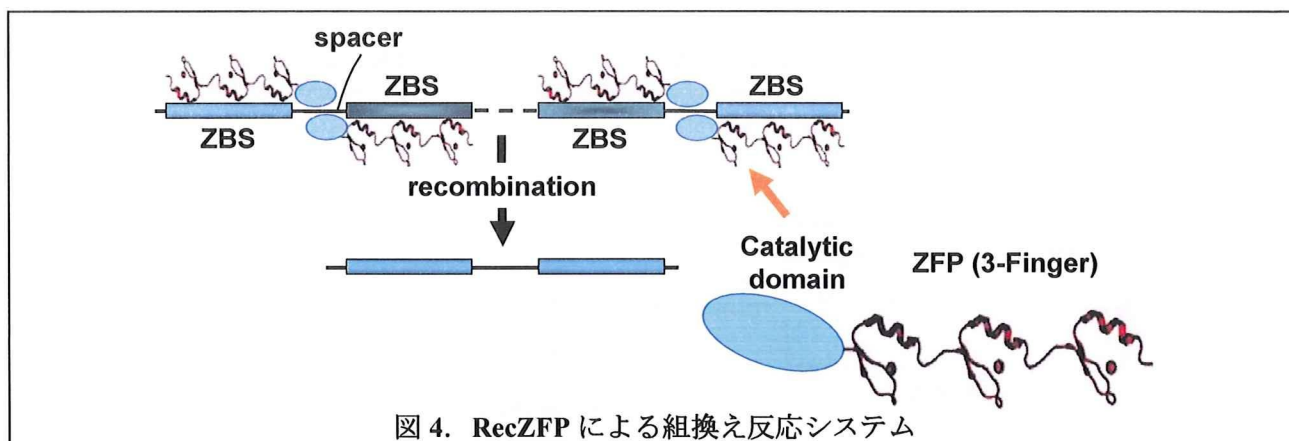


図 4. RecZFP による組換え反応システム

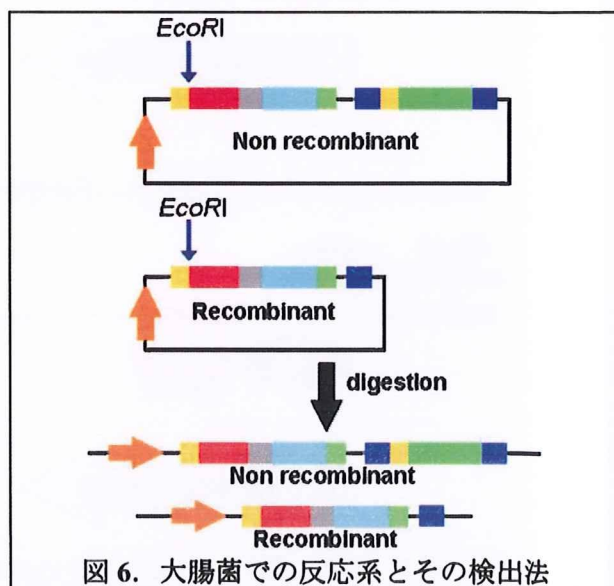
チ ELISA 法により評価した。ストレプトアビジンをコーティングした 96 穴プレート上に、ヘアピン構造によって二重らせん構造をとる標的配列 (Zinc finger Binding Site: ZBS) を 5' 末端に導入したビオチンで固定した。標的配列に結合した MBP-ZFP を一次抗体の anti-MBP 抗体で検出し、さらに二次抗体の anti-IgG 抗体で検出する。二次抗体には alkaline phosphatase が付加されているので、基質の *p*-nitrophenyl phosphate を添加してその発光を分光光度計によって検出した。測定は反応 30 分後にプレートリーダーを用いて 405 nm の吸光度を測定した。また、それを基に各 MBP-ZFP の DNA 結合親和性を定量的に求めた。

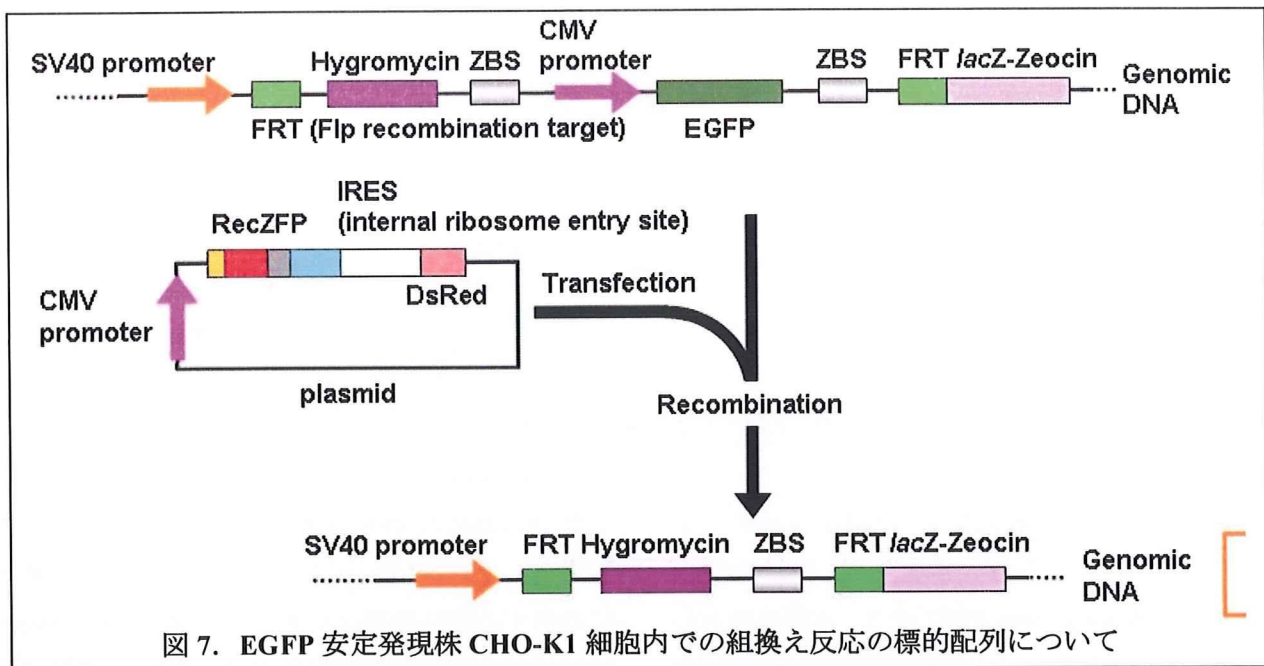
ELISA 法によって標的配列に対する結合親和性が確認された ZFP を用いて大腸菌内での組換え反応系を構築し、反応効率の評価を行った。RecZFP は組換え酵素 Tn3 resolvase の触媒ドメインと ZFP を融合した。Tn3 は 2 つのドメインに機能が独立している。N 末端の 140 アミノ酸の触媒ドメインに短いリンカー配列によって 40 アミノ酸から構成される DNA 結合ドメインが付加されている。触媒ドメインと DNA 結合ドメインの機能が独立しているため、DNA 結合ドメインを ZFP に置換して新たな標的配列特異性を有する融合型酵素を創製で

| | |
|---|---------------|
| -6 a.a linker | RRSNGPSRPGEKP |
| -3 a.a linker IKF | RRSNGPSRPGEKP |
| 0 a.a linker IKF GRRR | |
| 3 a.a linker IKF GRRR EKP | |
| 6 a.a linker IKF GRRR RPGEKP | |
| 9 a.a linker IKF GRRR GPSRPGEKP | |
| 12 a.a linker IKF GRRR RSNGPSRPGEKP | |
| 15 a.a linker IKF GRRR GSNGPSRPGEKP | |
| 18 a.a linker IKF GRRR GSGGSRNSGSRPGEKP | |
| 21 a.a linker IKF GRRR GSGGSGGSRNSGSRPGEKP | |
| 24 a.a linker IKF GRRR GSGGSGGSGGSRNSGSRPGEKP | |
| 27 a.a linker IKF GRRR GSGGSGGSGGSGGSRNSGSRPGEKP | |
| 30 a.a linker IKF GRRR GSGGSGGSGGSGGSGGSRNSGSRPGEKP | |

図 5. 構築したリンカー長の違う変異体のそれぞれのリンカー配列について

きる。RecZFP による組換え反応の概略は図 2 に示した。RecZFP の ZFP が標的配列に結合することで、触媒ドメインが spacer で二量体を形成し、四量体に会合する際に組換えが起こった結果 zinc finger binding site (ZBS) の間に存在する配列が切除される。構築した組換え反応システムでは、作製したプラスミドを大腸菌に導入し、シングルコロニーを一定時間培養することでプラスミドの上流にコードされている RecZFP が発現し、下流の標的配列で組換えが起きて生成した短いプラスミドを PCR と制限酵素処理によって評価した。Tn3 resolvase の触媒ドメインは R2A, E56K, G101S, D102Y, M103I, Q105L という 6 箇所の変異が導入された NM-resolvase を用いており、3 アミノ酸 (GSG) から成るリンカー配列を介して ZFP を融合させた。作製したプラスミドは大腸菌 Top10 にエレクトロポレーションにより形質転換し、得られたシングルコロニーを一定時間培養後、精製したプラスミドを RecZFP ドメインと標的配列の外側のプライ



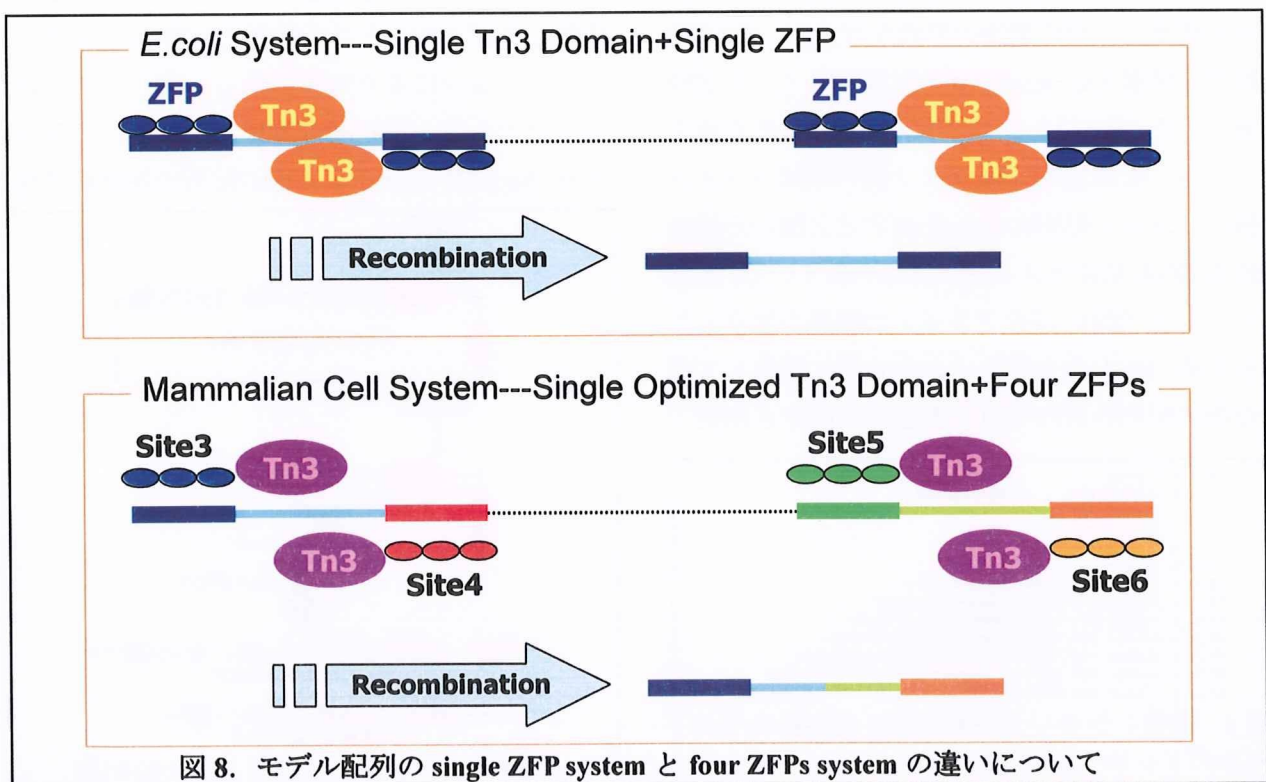


マーを用いて PCR を行った。PCR 産物の長さの違いにより組換え反応の進行を判断できる。また、定量的な検出として制限酵素による切断で生成するフラグメント量で検討を行った (図6)。

6F の RecZFP において、リンカー長を変化させた変異体の組換え効率について検討を行った。検討した長さは、-6, 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18 アミノ酸で構成される 8 種類のリンカーを用意した。-3, -6 アミノ酸リンカーは酵素の触媒ドメイン配列から欠損させている。組換え反応効率の評価は同様に PCR

と制限酵素切断を用いて行った。

哺乳類細胞細胞内での組換え反応評価では、Invitrogen 社の Flp-In システムを用いてゲノム遺伝子に標的配列 (KS6 サイトのみで構成される配列と KS34+56 の組み合わせ配列) と蛍光タンパク質 (EGFP) のコード配列を有する CHO-K1 細胞株を樹立した (図7)。樹立した細胞株へ RecZFP をコードするプラスミド DNA をトランスフェクションすると細胞内で発現した RecZFP が標的配列で組換え反応を起こし、EGFP 遺伝子が除去され、蛍



光タンパク質の発現が失われる。細胞内ゲノムには 1 コピーの標的配列と蛍光タンパク質のみが存在するため、蛍光タンパク質遺伝子がノックアウトされて蛍光が消失している細胞数をカウントすることで組換え効率を定量できる。この解析にはフローサイトメトリー (Flow Cytometry; FACS) を用いた。モデル配列としては KS6 の結合サイトのみで構成される標的配列と KS34+56 の結合サイトから構成されるものを構築した (図 8)。KS6 サイトのみの配列では RecZFP の ZFP 部分が 1 種類で反応が行えるため、組換え酵素の反応効率の定量性に優れている。一方で KS34+56 のサイトではよりゲノム遺伝子に近いモデル配列として KS3~6 のサイトにそれぞれ結合する ZFP を用いる必要がある。そのため、HIV-1 感染細胞を用いた組換え反応を検討する前段階のモデルとして最適であると考えられた。

アデノウイルスベクターを用いた DNA 組換え酵素の細胞内導入

標的細胞内での酵素発現量を上昇させる、また酵素遺伝子の導入された細胞の割合を上昇させることを目的としてアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入法について系を構築した。アデノウイ

ルスベクターは invitrogen 社の pAd/CMV/V5-DEST ベクターを使用した。E1 protein 安定発現株である 293A 細胞に制限酵素処理によってリニア化したアデノウイルスベクターをトランスフェクションし、その上清をさらに新たな 293A 細胞に加えることでアデノウイルスを増殖した。その後、KS34+56 の標的配列を有する EGFP 安定発現株に対して感染させ、組換え反応効率をフローサイトメトリーにて定量した。また、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入によって細胞核内に発現している DNA 組換え酵素は Anti-Flag-Alexa568 抗体によって共焦点レーザー顕微鏡により観察した。

C. 研究結果

構築した MBP 融合 ZFP を発現、精製し、SDS-PAGE によって目的サイズのタンパク質を得たことを確認した (図 9)。ELISA 法によって DNA 結合親和性を確認したところ、ZFP モジュール数によって違いがあり、6 フィンガーモジュールでは KS1~6 に結合する ZFP の全てで 15~400 nM と高い結合活性を有することが明らかになった (表 2)。また ZFP モジュール数の増加に従って DNA の結合親和性が上昇する傾向が示された。



図 9. 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 2. 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

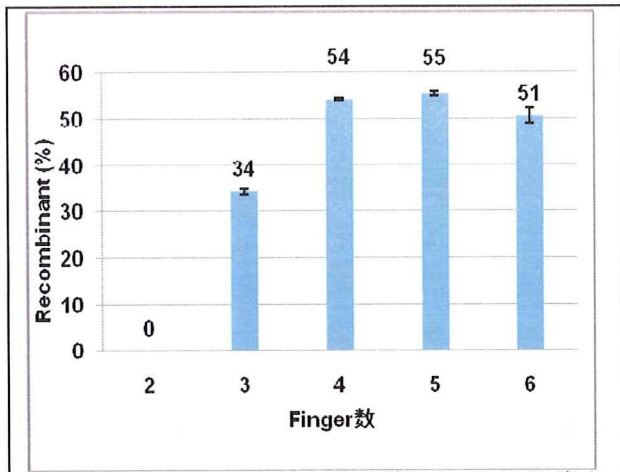


図 10. 亜鉛フィンガー数の違いによる組換え反応効率の変化について (KS6 サイトに結合する ZFP シリーズ)

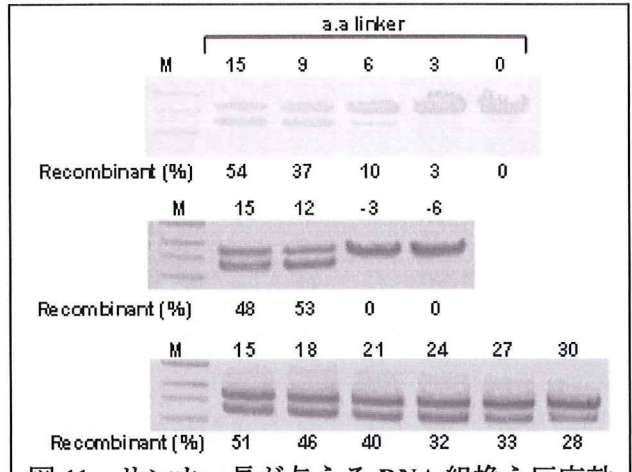
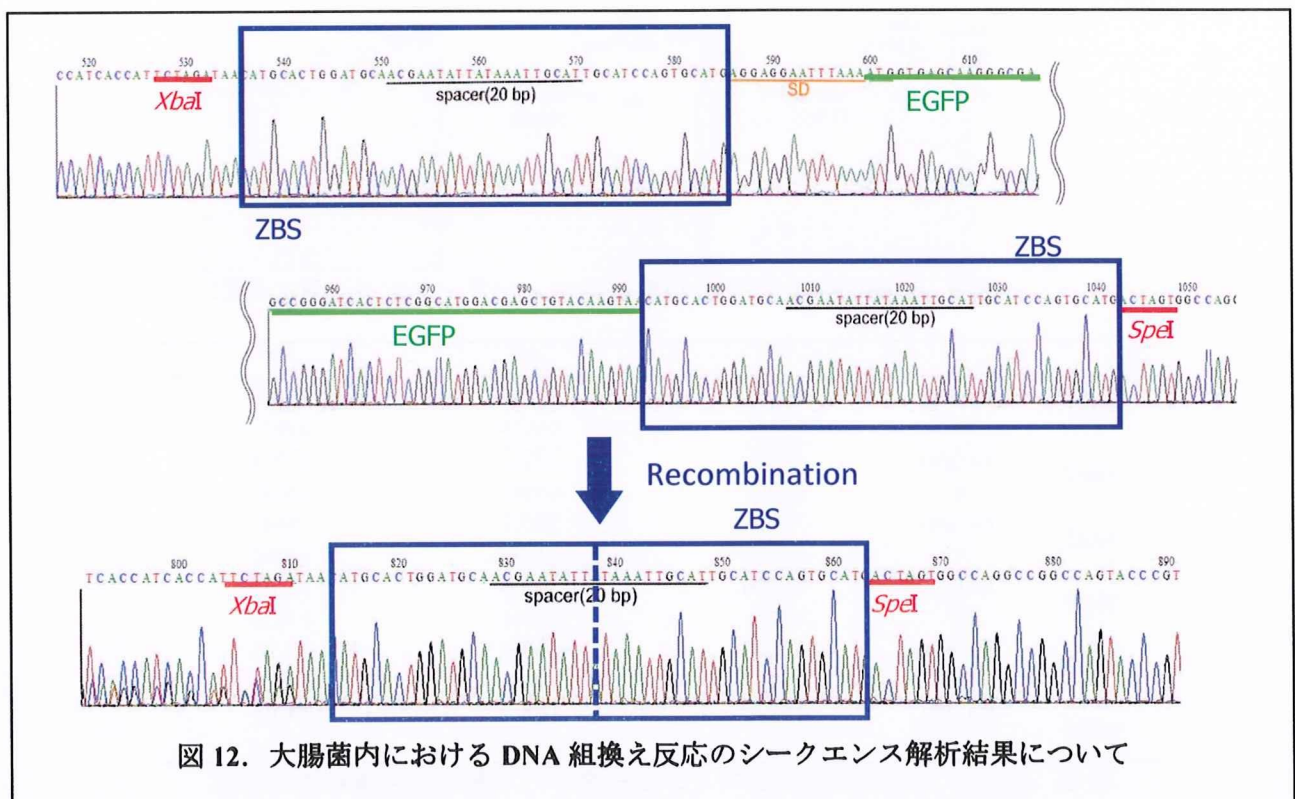


図 11. リンカー長が与える DNA 組換え反応効率への影響

これらの ZFP と Tn3 酵素ドメインの融合体を構築した後に大腸菌にプラスミド遺伝子を導入して組換え効率の定量を行った結果、2F 以外では組換え反応が確認できた。特に 4F~6F では 50%前後の組換え効率が示された。この結果から組換え反応効率と DNA 結合親和性と間に正の相関があることが考えられた (図 10)。組換え反応を確認するために反応後に回収したプラスミド遺伝子のシーケンス解析を行った結果、ZBS 間の遺伝子が組換えによって除去されていることがわかった。

リンカー長を変化させた RecZFP についても同様の反応を行い、シーケンス解析によって-3, -6 アミノ酸リンカー以外の変異体で組換え反応が確認された。Restriction enzyme assay の結果から 0 アミノ酸リンカーの時に組換え効率が最大になることが明らかになった (図 11)。

哺乳類細胞内への RecZFP の導入は核移行シグナル (NLS) 配列と FLAG タグ配列を C 末端に付与したコード遺伝子を哺乳類細胞発現ベクターに導入したものをトランスフェクションにて細胞内



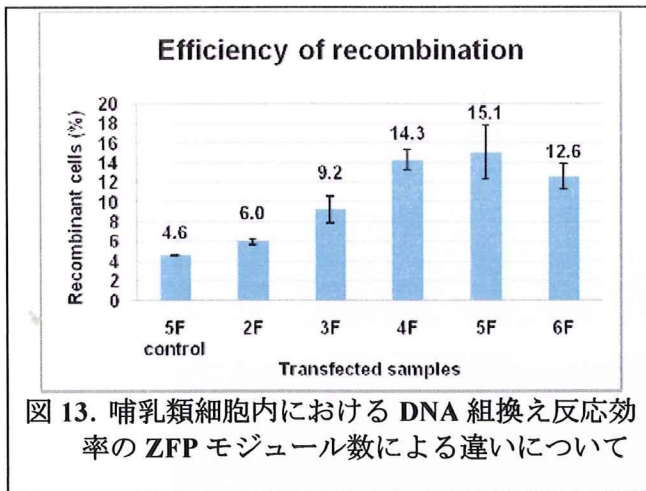


図 13. 哺乳類細胞内における DNA 組換え反応効率の ZFP モジュール数による違いについて

へと導入した。CHO-K1 細胞内での RecZFP の発現はウエスタンブロッティング法で anti-FLAG 抗体によって検出した。

RecZFP の細胞内導入効率はプラスミドベクターに IRES 配列を介して DsRed monomer 遺伝子を導入しているため、DsRed の発現にて確認できる。プラスミド遺伝子導入後、48 時間後にフローサイトメーターにて EGFP および DsRed の発現を定量し、EGFP の発現量を標準化することで定量した。RecZFP にはコントロールとして標的配列に結合しない RecZFP を用い、また標的配列に結合する 2F~6F の RecZFP を用いた。その結果、大腸菌での反応と同様、DNA 結合親和性の向上に従って、組換え反応効率も向上することが示された(図 7)。しかし、6 フィンガーモジュールを有する RecZFP では組換え効率の若干の低下が確認された。

次にアデノウイルスベクターによる遺伝子導入

法を用いて KS34+56 のサイトを有する CHO-K1 細胞における標的配列に対する作用を検討した。コントロールとして RecZFP を含まない lacZ empty ベクターを用いる系と KS5 および 6 に結合する 2 種類の ZFP のみを用いる系を用意した。コントロールの系においてはほぼバックグラウンドに等しい数%程度の組換え効率であったのに対して、KS3~6 の 4 種類の ZFP を用いた系では 24%という組換え効率を得ることができた。アデノウイルスベクターによって遺伝子導入を受けた細胞内における RecZFP の発現を Anti-Flag 抗体を用いて共焦点レーザー顕微鏡によって観察を行ったところ、通常、アデノウイルスベクターを用いた場合に期待される遺伝子導入効率(90%以上)に比べて低い可能性が示唆された。

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

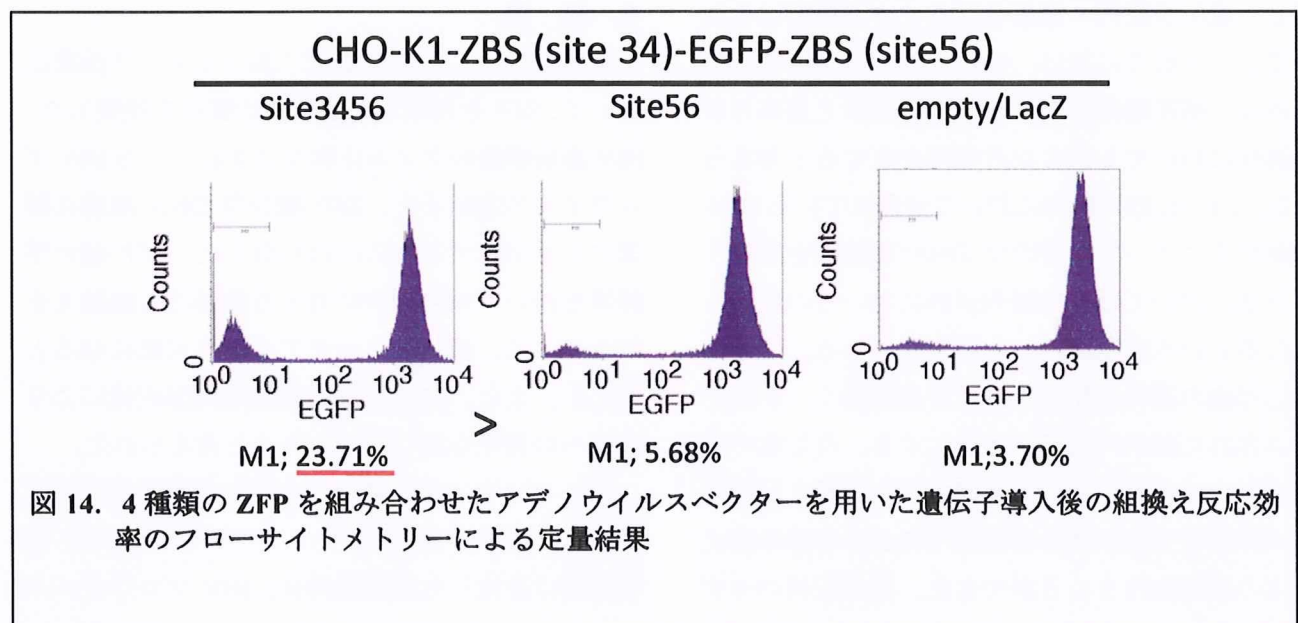
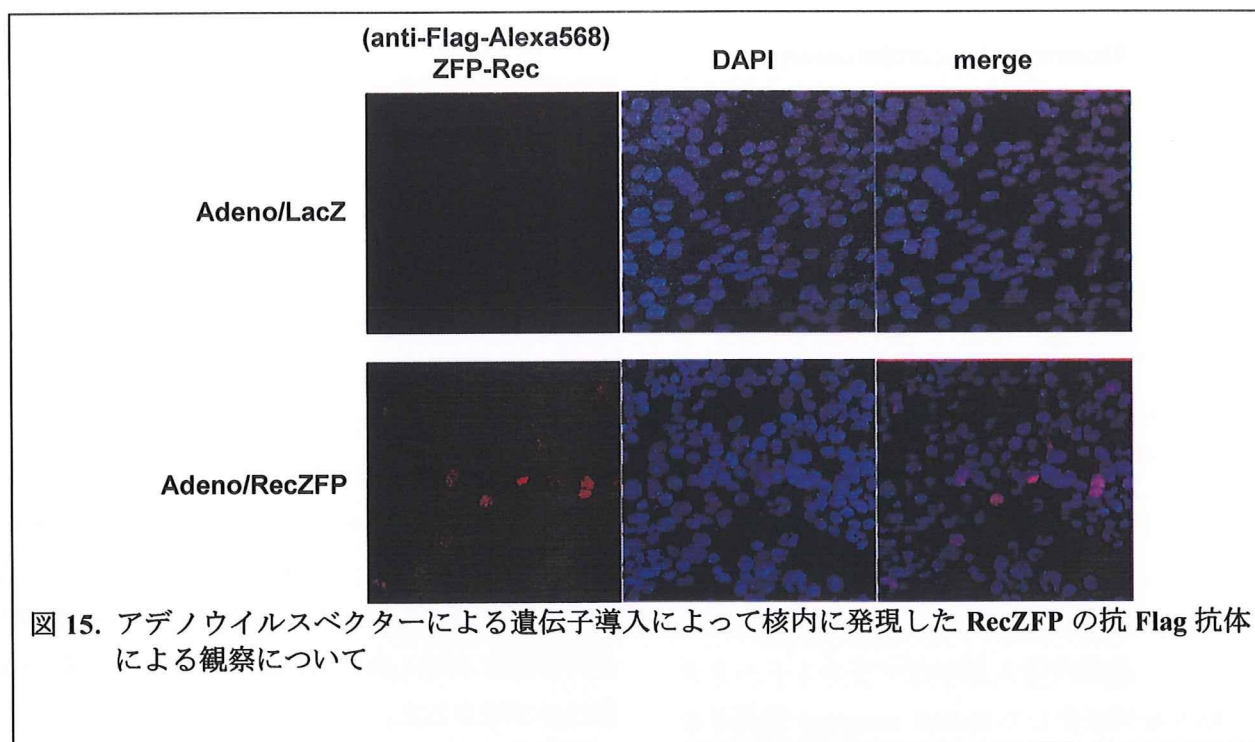


図 14. 4 種類の ZFP を組み合わせたアデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入後の組換え反応効率のフローサイトメトリーによる定量結果



明ら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 4 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、哺乳類細胞内における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ける反応も起こるといった問題をもみても明らかである。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。今年度の研究においては前年度の大腸菌内での組換え反応効率の評価系を基に哺乳類細胞内における組み換え反応の評価を行うことができた。標的配列のモデ

ルとなる遺伝子を有する安定発現株を構築して EGFP による迅速な組換え反応の検出、定量を行う系を確立され、さらにアデノウイルスベクターを用いた効率的な遺伝子導入法によって 4 種類の ZFP を用いたゲノム遺伝子に近いモデル標的配列において 20%以上の組換え効率を得ることが示された。しかし、遺伝子導入効率に関してはそれほど高くないことが示唆されたため、ウイルス力価の最適化によって更に高い組換え効率を得られると期待される。

E. 結論

本研究では、新規な概念に基づくエイズ治療法として、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。

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、スパーサー配列を 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 (JRCSF M38429, JRFL U63632, LAI19 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、site 6 (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。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。哺乳類細胞を用いた組換え酵素反応の評価についてはモデル配列を有する EGFP 安定発現株を樹立し、EGFP の蛍光量によって組換え反応を評価できる系が構築された。また、トランスフェクション効率を DsRed の発現量で評価することで正確な DNA 組換え効率を算出することが可能になった。この系を用いて、リンカー配列やフィンガーモジュール数の異なる様々な組換え酵素変異体の反応効率を評価し、最も反応効率の良いものを見出す

ことができた。さらにアデノウイルスベクターを遺伝子導入に用いた系ではゲノム遺伝子中に存在するプロウイルス配列に最も近いモデル配列で 20%以上の組換え効率を得ることができた。また、この結果はバックグラウンド反応に比べて有意に高いものであった。

今後は、遺伝子導入効率を最適化し、細胞内での組換え酵素の発現量を増大させることによりさらに高い反応効率が示されると期待できる。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 p24 アッセイを中心に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。また、これまでに用いられている抗 HIV 薬剤との併用に関しても検討することでの遺伝子治療を組み合わせた HIV 治療に関する知見について貢献できると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Yamada Y, Ochiai C, Yoshimura K, Tanaka T, Ohashi N, Narumi T, Nomura W, Harada S, Matsushita S, Tamamura H: CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 354-358, 2010.
- 2) Tsutsumi H, Nomura W, Abe S, Mino T, Masuda A, Ohashi N, Tanaka T, Ohba K, Yamamoto N, Akiyoshi K, Tamamura H: Fluorogenically Active leucine zipper peptides as new tag-probe pairs for protein imaging in living cells. *Angew Chem., Int. Ed.* 48: 9164 -9166, 2009.
- 3) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Esaka A, Oishi S, Ohashi N, Itotani K, Evans BJ, Wang Z, Peiper SC, Fujii N, Tamamura H: Structure-activity relationship study on artificial CXCR4 ligands possessing the cyclic pentapeptide scaffold: the exploration of amino acid residues of pentapeptides by substitutions of several aromatic amino acids. *Org. Biomol. Chem.* 7: 3805-3809,

- 2009.
- 4) Ohashi N, Nomura W, Kato M, Narumi T, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H: Synthesis of protein kinase C δ C1b domain by native chemical ligation methodology and characterization of its folding and ligand binding. *J. Pept. Sci.* 15: 642-646, 2009.
 - 5) Ohya A, Nakahara T, Nomura W, Ohba K, Tanaka T, Hashimoto C, Narumi T, Murakami T, Yamamoto N & Tamamura H. Synthesis and evaluation of artificial antigen peptide based on the trimeric form of HIV fusion protein. *Peptide Science 2009*, Kouji Okamoto (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 29-32, 2010.
 - 6) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Yoshimura K, Matsushita S, Murakami T, Komano J, Yamamoto N & Tamamura H. From reverse to forward chemical genomics: development of anti-HIV agents. *Peptide Science 2009*, Kouji Okamoto (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 105-106, 2010.
 - 7) Nomura W, Serizawa Y, Ohashi N, Okuda Y, Narumi T, Yoshida K, Furuta T & Tamamura H. Caged DAG-lactones for study of cellular signaling in a spatial- and temporal-specific manner. *Peptide Science 2009*, Kouji Okamoto (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 347-348, 2010.
 - 8) Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Okuda Y, Ikura T, Ito N, Yoshida K, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H. Fluorescent-based orthogonal sensing methods for double evaluation in PKC ligands screening. *Peptide Science 2009*, Kouji Okamoto (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka, 353-354, 2010.
2. 学会発表
- 1) 野村 渉, 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, 事務局 光機能性リガンドを用いたプロテインキナーゼ C の活性化制御. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 4 回年会. 神戸, 2009 年 5 月 18 - 19 日.
 - 2) 中西勇太, 堤 浩, 駒野 淳, 田中智博, 中原徹, 大橋南美, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. フォワードケミカルジェネティクスを応用した HIV インテグラーゼ阻害剤. 日本ケミカルバイオロジー学会 第4回年会. 神戸, 2009 年 5 月 18 - 19 日.
 - 3) 堤 浩, 阿部清一郎, 蓑 友明, 野村 渉, 玉村啓和. 新規タグプローブシステムの開発とタンパク質蛍光イメージングへの応用. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 4 回年会. 神戸, 2009 年 5 月 18 - 19 日.
 - 4) 大橋南美, 奥田善章, 野村 渉, 堤 浩, 芹澤雄樹, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 吉田清嗣, Nancy E. Lewin, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. 蛍光性 diacylglycerol-lactone 誘導体の合成と機能評価. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 4 回年会. 神戸, 2009 年 5 月 18 - 19 日.
 - 5) 野村 渉, 増田朱美, 奥田 毅, Carlos F. Barbas, III, 玉村 啓和. 遺伝子機能制御に向けたプログラム可能な DNA メチル化酵素の創製. エピジェネティクス研究会年会. 東京, 2009 年 5 月 22 - 23 日.
 - 6) 野村 渉, 芹澤雄樹, 大橋南美, Nancy E. Lewin, 奥田善章, 鳴海哲夫, 吉田清嗣, Peter M. Blumberg, 古田寿昭, 玉村啓和. キナーゼの細胞内局在機構解明のためのツールとしてのケージド化合物. 第 24 回生体機能関連化学シンポジウム, 第 12 回バイオテクノロジー部会シンポジウム. 福岡, 2009 年 9 月 13-15 日.
 - 7) Ochiai C, Yoshimura K, Yamada Y, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, Shibata J, Hatada M, Matsushita S, Tamamura H. Development of CD4 mimic small molecules targeted for dynamic supramolecular mechanism of HIV entry. 第 10 回熊本エイズセミナー. 熊本, 2009 年 9 月 28 - 29 日.
 - 8) 野村 渉, 芹澤雄樹, 大橋南美, 奥田善章, 鳴

- 海哲夫,吉田清嗣,古田寿昭,玉村啓和. 時間・空間特異的な細胞シグナル解析のためのケージド DAG ラクトンの合成. 第 46 回ペプチド討論会.北九州,2009 年 10 月 4-5 日.
- 9) 田中智博,野村 渉,鳴海哲夫,吉村和久,松下修三,村上努,駒野 淳,山本直樹,玉村啓和.リバスからフォワードへケミカルゲノミクスを基盤とした抗 HIV 剤の創製. 第 46 回ペプチド討論会.北九州,2009 年 10 月 4-5 日.
 - 10) 大矢亜紀,中原 徹,野村 渉,大庭賢二,田中智博,橋本知恵,鳴海哲夫,村上 努,山本直樹,玉村啓和.HIV 外被蛋白質 gp41 の 3 量体構造に特異的な抗体を誘導する人工抗原ペプチドの合成. 第 46 回ペプチド討論会.北九州,2009 年 10 月 4-5 日.
 - 11) 大橋南美,野村 渉,鳴海哲夫,奥田善章,伊倉貞吉,伊藤暢聡,吉田清嗣,Lewin NE,Blumberg PM,玉村啓和.蛍光標識を用いたオルソゴナルな PKC リガンド結合活性評価法の開発. 第 46 回ペプチド討論会.北九州,2009 年 10 月 4-5 日.
 - 12) 田中智博,野村 渉,鳴海哲夫,玉村啓和. 合成二価型リガンドを用いた CXCR4 二量体構造の解析研究. 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京,2009 年 11 月 25-27 日.
 - 13) 奥田善章,野村 渉,鳴海哲夫,大橋南美,玉村啓和. PKC リガンドの蛍光を用いた洗浄不要型アッセイ法の開発. 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京,2009 年 11 月 25-27 日.
 - 14) 橋本知恵,野村 渉,田中智博,鳴海哲夫,大庭賢二,山本直樹,玉村啓和. HIV-1 第二受容体 CXCR4 を基にした合成抗原分子の開発. 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京,2009 年 11 月 25-27 日.
 - 15) 中西 勇太,中原 徹,鈴木慎太郎,田中智博,大橋南美,堤 浩,鳴海哲夫,野村 渉,駒野 淳,山本 直樹,玉村啓和. ペプチドライブラリーを基にした HIV-1 インテグラーゼに対する阻害剤の創製. 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京,2009 年 11 月 25-27 日.
 - 16) 大矢亜紀,中原 徹,野村 渉,大庭 賢二,田中智博,橋本知恵,鳴海哲夫,村上 努,山本直樹,玉村 啓和. HIV-gp41 の三量体構造に特異的な中和抗体を誘導する人工抗原ペプチド. 第 28 回メディシナルケミストリーシンポジウム. 東京,2009 年 11 月 25-27 日.
 - 17) Masuda A, Nomura W, Okuda T, Narumi T, Tamamura T. Design of zinc finger recombinase (RecZFP) for efficient sequence-specific genome editing. 第 32 回日本分子生物学会年会. 横浜,2009 年 12 月 10 日.
 - 18) 橋本知恵,野村 渉,田中智博,中原 徹,鳴海哲夫,大庭賢二,村上 努,山本直樹,玉村啓和. エイズワクチンを指向した宿主受容体 CXCR4 由来抗原分子の創製. 日本薬学会第 130 年会. 岡山,2010 年 3 月 28-30 日.
 - 19) 田中智博,野村 渉,鳴海哲夫,玉村啓和.二価型 CXCR4 リガンドの創製と二量体構造解析への応用. 日本薬学会第 130 年会. 岡山,2010 年 3 月 28-30 日.
 - 20) 大橋南美,野村 渉,鳴海哲夫,奥田善章,伊倉貞吉,伊藤暢聡,吉田清嗣,Lewin NE,Blumberg PM,玉村啓和.蛍光を用いた PKC リガンド結合評価法の開発. 日本薬学会第 130 年会. 岡山,2010 年 3 月 28-30 日.
 - 21) 鳴海哲夫,清家俊輔,野村 渉,玉村啓和. 新規アミド等価体クロロアルケン型ジペプチドイソスターの合成研究. 日本薬学会第 130 年会. 岡山,2010 年 3 月 28-30 日.
 - 22) 鳴海哲夫,落合千裕,山田裕子,吉村和久,原田恵嘉,大橋南美,野村 渉,松下修三,玉村啓和. HIV-1 外被タンパク質 gp120 の構造変化誘起を指向した低分子 CD4 ミミックの構造活性相関研究. 日本薬学会第 130 年会. 岡山,2010 年 3 月 28-30 日.
 - 23) 野村 渉,中原 徹,大矢亜紀,大庭賢二,田中智博,橋本知恵,鳴海哲夫,村上 努,山本直樹,玉村啓和. 合成人工抗原ペプチドに

よる HIV-gp41 の三量体構造を認識する抗体の誘導. 日本薬学会第 130 年会. 岡山, 2010 年 3 月 28-30 日.

- 24) 増田朱美, 野村 渉, 大庭賢二, 奥田 毅, Barbas,C.F.,III, 山本直樹, 玉村啓和. 標的配列特異的 DNA 組換え酵素の構築を目指した亜鉛フィンガータンパク質の応用. 日本薬学会第 130 年会. 岡山, 2010 年 3 月 28-30 日.

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

1.

出願： 2009 年 5 月 18 日 番号 特願
2009-120352

名称: HIV 立体構造認識抗体誘導ペプチド抗原、及びその合成方法

発明人: 玉村啓和、中原徹、野村渉

出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学

2.

出願： 2009 年 7 月 6 日 番号 特願
2009-159771

名称: ケモカインレセプター CXCR4 の二価型アンタゴニストの創製とがん細胞のイメージング方法の開発

発明人: 玉村啓和、野村渉、鳴海哲夫、田中智博

出願人: 国立大学法人東京医科歯科大学

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) Yamada Y, Ochiai C, Yoshimura K, Tanaka T, Ohashi N, Narumi T, Nomura W, Harada S, Matsushita S, Tamamura H. | CD4 mimics targeting the mechanism of HIV entry. | Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters | 20 | 354-358 | 2010 |
| 2) Tsutsumi H, Nomura W, Abe S, Mino T, Masuda A, Ohashi N, Tanaka T, Ohba K, Yamamoto N, Akiyoshi K, Tamamura H. | Fluorogenically Active leucine zipper peptides as new tag-probe pairs for protein imaging in living cells. | Angewandte Chemie, international edition | 48 | 9164-9166 | 2009 |
| 3) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Esaka A, Oishi S, Ohashi N, Itotani K, Evans BJ, Wang Z, Peiper SC, Fujii N, Tamamura H. | Structure-activity relationship study on artificial CXCR4 ligands possessing the cyclic pentapeptide scaffold: the exploration of amino acid residues of pentapeptides by substitutions of several aromatic amino acids. | Organic & Biomolecular Chemistry | 7 | 3805-3809 | 2009 |
| 4) Ohashi N, Nomura W, Kato M, Narumi T, Lewin NE, Blumberg PM, Tamamura H. | Synthesis of protein kinase C δ C1b domain by native chemical ligation methodology and characterization of its folding and ligand binding. | Journal of Peptide Science | 15 | 642-646 | 2009 |
| 5) Ohya A, Nakahara T, Nomura W, Ohba K, Tanaka T, Hashimoto C, Narumi T, Murakami T, Yamamoto N & Tamamura H. | Synthesis and evaluation of artificial antigen peptide based on the trimeric form of HIV fusion protein. | Peptide Science 2009 | Kouji Okamoto (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka | 29-32 | 2010 |
| 6) Tanaka T, Nomura W, Narumi T, Yoshimura K, Matsushita S, Murakami T, Komano J, Yamamoto N & Tamamura H. | From reverse to forward chemical genomics: development of anti-HIV agents. | Peptide Science 2009 | Kouji Okamoto (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka | 105-106 | 2010 |

| | | | | | |
|---|--|-------------------------|---|---------|------|
| 7) Nomura W, Serizawa Y, Ohashi N, Okuda Y, Narumi T, Yoshida K, Furuta T & Tamamura H. | Caged DAG-lactones for study of cellular signaling in a spatial- and temporal-specific manner. | Peptide Science 2009 | Kouji Okamoto (Eds.), The Japanese peptide Society, Osaka | 347-348 | 2010 |
| 8) 野村 渉, 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. | 光機能性リガンドを用いたプロテインキナーゼCの活性化制御. | 日本ケミカルバイオロジー研究会第4回年会抄録集 | | 67 | 2009 |
| 9) 中西勇太, 堤 浩・駒野 淳, 田中智博, 中原徹, 大橋南美, 野村 渉, 山本直樹, 玉村啓和. | フォワードケミカルジェネティクスを応用した HIV インテグラーゼ阻害剤. | 日本ケミカルバイオロジー研究会第4回年会抄録集 | | 76 | 2009 |
| 10) 堤 浩, 阿部清一郎, 蓑 友明, 野村 渉, 玉村啓和. | 新規タグープローブシステムの開発とタンパク質蛍光イメージングへの応用. | 日本ケミカルバイオロジー研究会第4回年会抄録集 | | 77 | 2009 |
| 11) 大橋南美, 奥田善章, 野村 渉, 堤 浩, 芹澤雄樹, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 吉田清嗣, Nancy E. Lewin, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. | 蛍光性 diacylglycerol-lactone 誘導体の合成と機能評価. | 日本ケミカルバイオロジー研究会第4回年会抄録集 | | 93 | 2009 |
| 12) 野村 渉, 増田朱美, 奥田 毅, Carlos F. Barbas, III, 玉村 啓和. | 遺伝子機能制御に向けたプログラム可能な DNA メチル化酵素の創製. | 第3回日本エピジェネティクス研究会年会要旨集 | | 130 | 2009 |
| 13) 野村渉, 芹澤雄樹, 大橋 南美, Nancy E. Lewin, 奥田善章, 鳴海哲夫, 吉田清嗣, Peter M. Blumberg, 玉村啓和. | キナーゼの細胞内局在機構解明のためのツールとしてのケージド化合物 | 第4回バイオ関連化学合同シンポジウム講演要旨集 | | 76 | 2009 |

| | | | | | |
|--|---|-------------------------------|--|---------|------|
| 14) 大矢亜紀, 中原 徹, 野村 涉, 大庭賢二, 田中智博, 橋本知恵, 鳴海哲夫, 村上 努, 山本直樹, 玉村啓和. | HIV 外被蛋白質 gp41 の 3 量体構造に特異的な抗体を誘導する人工抗原ペプチドの合成. | 第 46 回ペプチド討論会 講演要旨集 | | 10 | 2009 |
| 15) 田中智博, 野村 涉, 鳴海哲夫, 吉村和久, 松下修三, 村上努, 駒野 淳, 山本直樹, 玉村啓和. | リバーズからフォワードヘケミカルゲノミクスを基盤とした抗 HIV 剤の創製. | 第 46 回ペプチド討論会 講演要旨集 | | 38 | 2009 |
| 16) 野村 涉, 芹澤雄樹, 大橋南美, 奥田善章, 鳴海哲夫, 吉田清嗣, 古田寿昭, 玉村啓和. | 時間・空間特異的な細胞シグナル解析のためのケージド DAG ラクトンの合成. | 第 46 回ペプチド討論会 講演要旨集 | | 131 | 2009 |
| 17) 大橋南美, 野村 涉, 鳴海哲夫, 奥田善章, 伊倉貞吉, 伊藤暢聡, 吉田清 嗣 , Lewin NE, Blumberg PM, 玉村啓和. | 蛍光標識を用いたオルソゴナルな PKC リガンド結合活性評価法の開発. | 第 46 回ペプチド討論会 講演要旨集 | | 133 | 2009 |
| 18) 中西 勇太, 中原徹, 鈴木慎太郎, 田中智博, 大橋南美, 堤 浩, 鳴海哲夫, 野村 涉, 駒野 淳, 山本直樹, 玉村啓和. | ペプチドライブラリーを基にした HIV-1 インテグラーゼに対する阻害剤の創製. | 第 28 回メデイシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集 | | 110-111 | 2009 |
| 19) 田中智博, 野村 涉, 鳴海哲夫, 玉村啓和. | 合成二価型リガンドを用いた CXCR4 二量体構造の解析研究. | 第 28 回メデイシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集 | | 112-113 | 2009 |
| 20) 奥田善章, 野村 涉, 鳴海哲夫, 大橋南美, 玉村啓和. | PKC リガンドの蛍光を用いた洗浄不要型アッセイ法の開発. | 第 28 回メデイシナルケミストリーシンポジウム講演要旨集 | | 238-239 | 2009 |