

201029038B

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～平成22年度 総合研究報告書

主任研究者 野村 渉

平成23年(2011)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～平成 22 年度 総合研究報告書

主任研究者 野村 渉

平成 23 年（2011）年 4 月

目次

I. 総合研究報告

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	-----	2 5
--------------------	-------	-----

III. 研究成果の刊行物・印刷	-----	3 7
------------------	-------	-----

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行った。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 ZFP 融合型 DNA 組換え酵素の開発を目的とした。

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。このような酵素の場合、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、といった利点が挙げられる。このような酵素の構築により、感染細胞のゲノム中に組み込まれた HIV 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。

そこで、HIV プロウイルスの中で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。高親和 DNA 結合を示した ZFP を用いて、DNA 組換えドメイン 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。

本論では、HIV プロウイルス遺伝子の *gag* 配列から、スペーサー配列を 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

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 HIVNL43 M19921 と 4 種の変異株 (HIVJRCSF M38429, HIVJRFL U63632, HIVLAIJ19 A04321, HXB2 AF033819) の *gag* 遺伝子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(図 2.1, 表 2.1)。この時、中心に AT のあるスペーサー配列 20 塩基対に限定し、スペーサー配列側から 4~6 コドンをもつ 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。

Zinc Finger プラスミドの作製

選出した 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

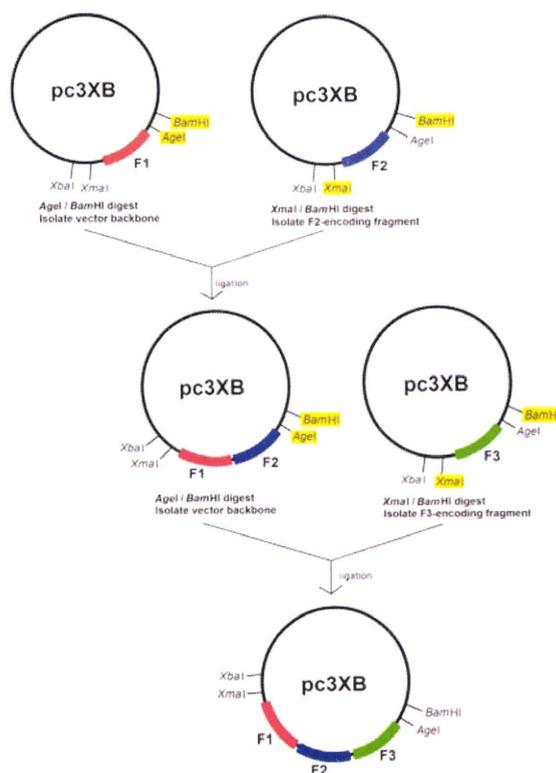


図 1. ZFP 遺伝子の作製方法について

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、4F~6F の配列を持つプラスミドを作製した (図 1)。

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。

また、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。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 pc3XB 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

		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

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

(図 2)。

Maltose Binding Protein (MBP) 融合 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。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

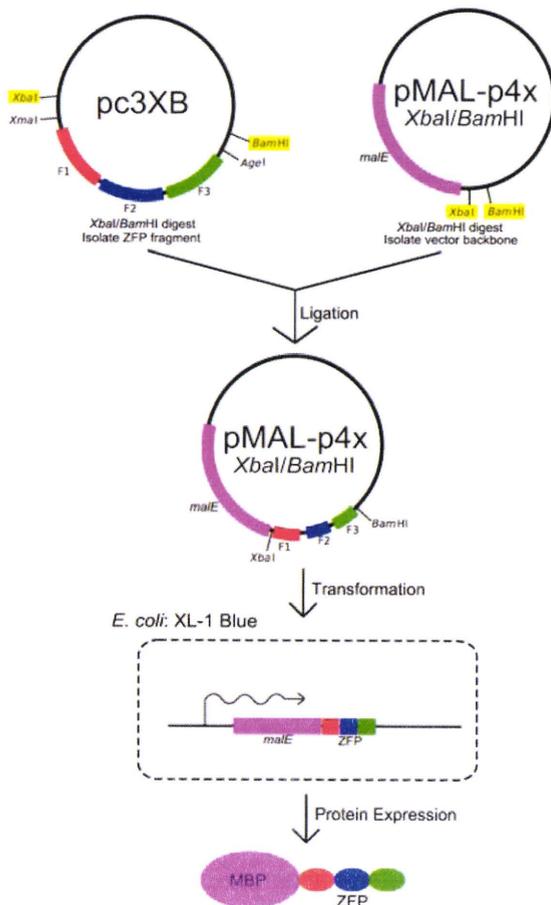


図 2. MBP 融合型 ZFP プラスミドの作製、および発現について

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。

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

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。

大腸菌内での DNA 組み換え反応評価

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 が標的部位に結合することで、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 (図 3)。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

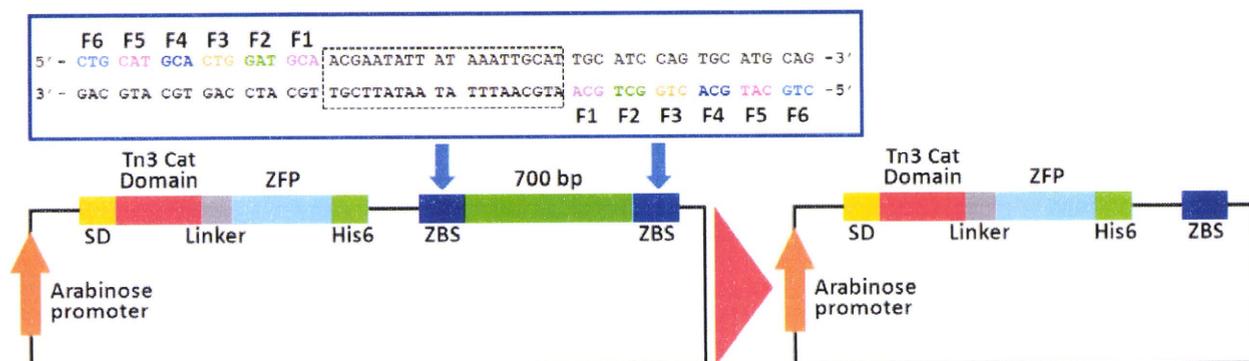


図 3. 大腸菌内における DNA 組み換え反応の評価系について

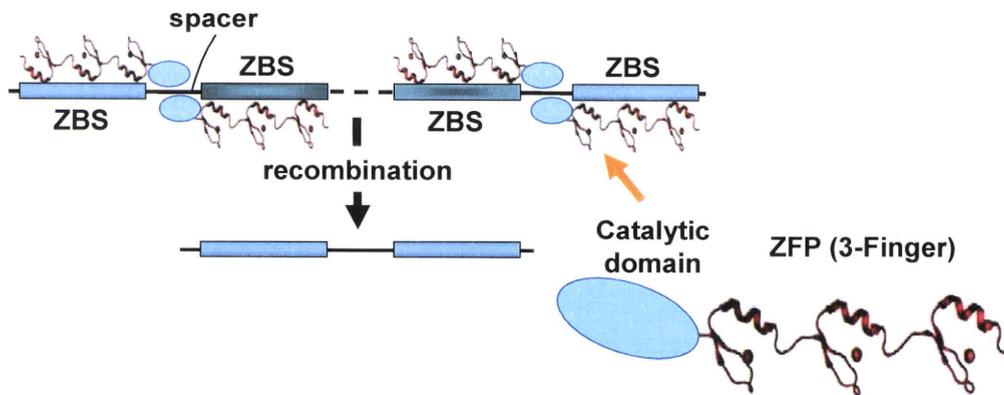


図 4. RecZFP による組換え反応システム

Catalytic domain of Tn3 resolvase

```

1      11      21      31      41      51      61
MALFGYARVS TSQQSLDIQI RALKDAGVKA NRIFTDKASG SSTDREGLDL LRMKVEGDV ILVKKLDRLG
71      81      91      101     111     121     131     140
RDTADMIQLM KEFDAQGVAV RFIDDGISTD SYIGLMVVTTI LSAVAQAERR RILERTNEGR QEAKLKGIKF GRRR

```

```

-6 a.a linker      RRSNGPSRPGEKP
-3 a.a linker IKF  GRRR      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     GSGRSNGPSRPGEKP
18 a.a linker IKF  GRRR     GSGGGSRSNGPSRPGEKP
21 a.a linker IKF  GRRR     GSGGGSRSNGPSRPGEKP
24 a.a linker IKF  GRRR     GSGGGSRSNGPSRPGEKP
27 a.a linker IKF  GRRR     GSGGGSRSNGPSRPGEKP
30 a.a linker IKF  GRRR     GSGGGSRSNGPSRPGEKP

```

```

0 a.a linker IKF  GRRR
3-2 a.a linker IKF  GRRR      GSG
6-2 a.a linker IKF  GRRR     GSGGGS
9-2 a.a linker IKF  GRRR     GSGGGS
12-2 a.a linker IKF  GRRR     GSGGGS
15-2 a.a linker IKF  GRRR     GSGGGS
18-2 a.a linker IKF  GRRR     GSGGGS

```

Zinc finger domain

```

FE (YK) CPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKFYKCPECGKSFSTSGNLVRHQRTHTGEKFYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGEKFYKCPECGKSFSQSGDLRRHQRTHTGEKFYKCPECGKSFSTSGNLTEHQRTHTGEKFYKCPECGKSFSRNDALTEHQRTHTGGSSAQ

```

図 5. 大腸菌内において組み換え反応効率を検討したリンカー長の異なる RecZF のアミノ酸配列

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

4)。

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

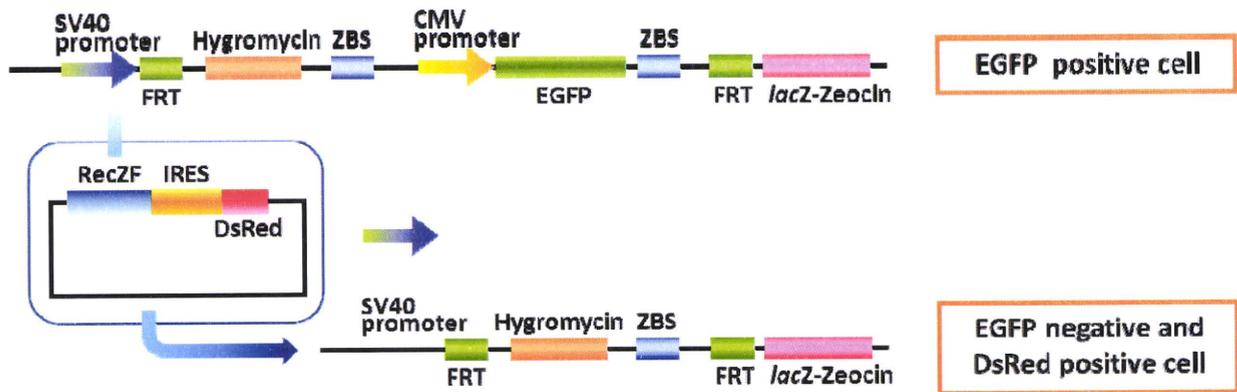


図 6. 哺乳類細胞での組み換え反応効率の検討に用いた DsRed の発現を指標とした定量方法

前項で用いた反応モデルプラスミドを利用して、エラープ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。エラープローン PCR は GeneMorph^R II Random Mutagenesis Kit を用いて行った。エラープローン 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 *Bam*HI で制限酵素処理した。これを、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。ランダム化した NM-resolvase から酵素活性が消失したものと、活性を保ったままのものが得られた。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。

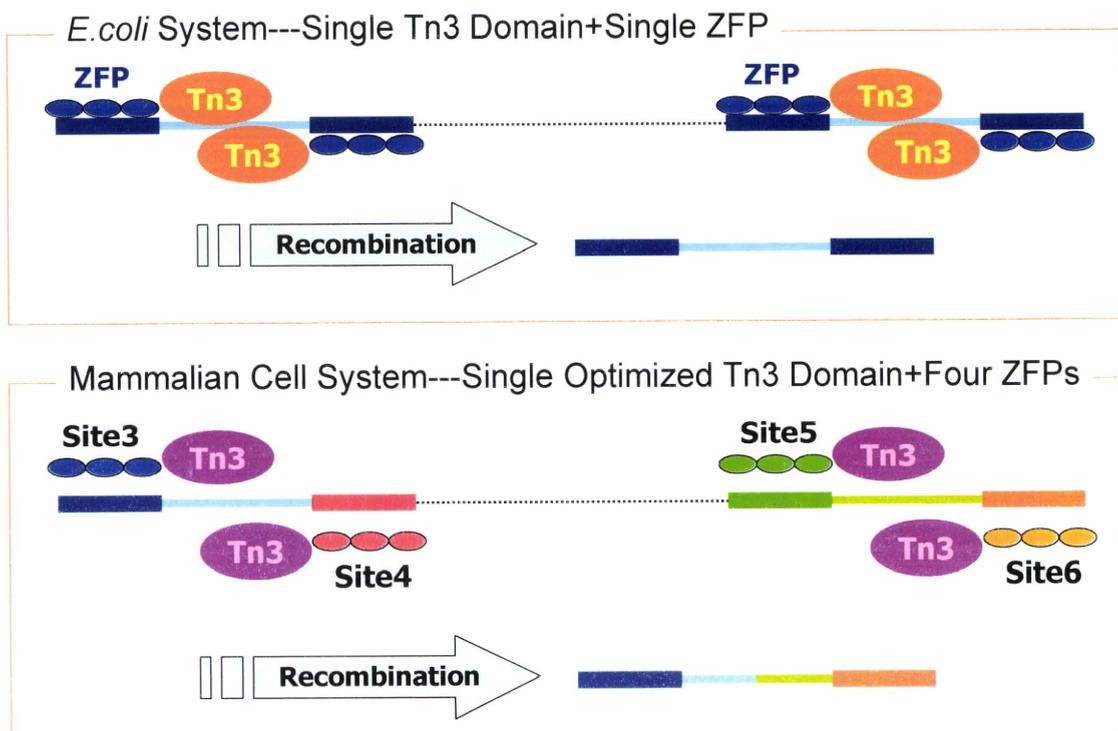


図 7. モデル配列の single ZFP system と four ZFPs system の違いについて

(EGFP) のコード配列を有する CHO-K1 細胞株を樹立した (図 6)。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。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 (図 7)。

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

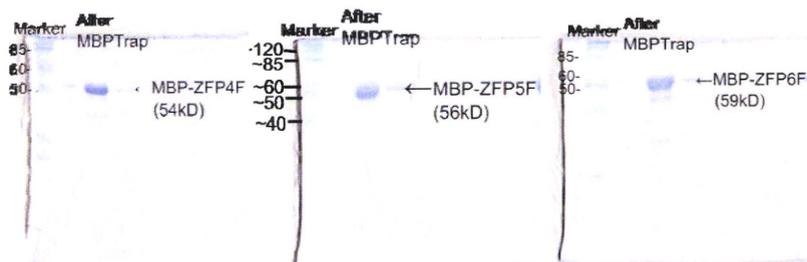
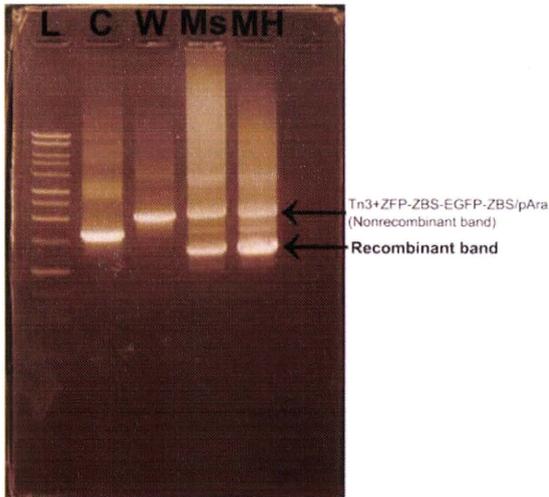


図 9. SDS-PAGE による精製亜鉛フィンガータンパク質の確認

		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

図 10. 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



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

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。さらに、アデノウイルスの力価に関して最適化を行い、CHO-K1 細胞での RecZF 発現をウェスタンブロッティングで確認した。

ゲノム遺伝子での標的配列切除反応の検出

KS34+56 サイトを有する CHO-K1 安定発現株において RecZF をコードするアデノウイルスを感染させて EGFP 蛍光量の減少と RecZF の発現が確認された細胞に関してゲノム遺伝子を回収し、PCR によって標的配列での組み換え反応について検出する条件を検討した。DNA 組み換え反応によって標的配列 KS34 および KS56 で挟まれている遺伝子配列は切除されるため、標的配列部分は短くなる。プライマーとして反応前に 1,800bp が増幅して組み換え反応後は 400 bp が増幅する組み合わせを用いた。

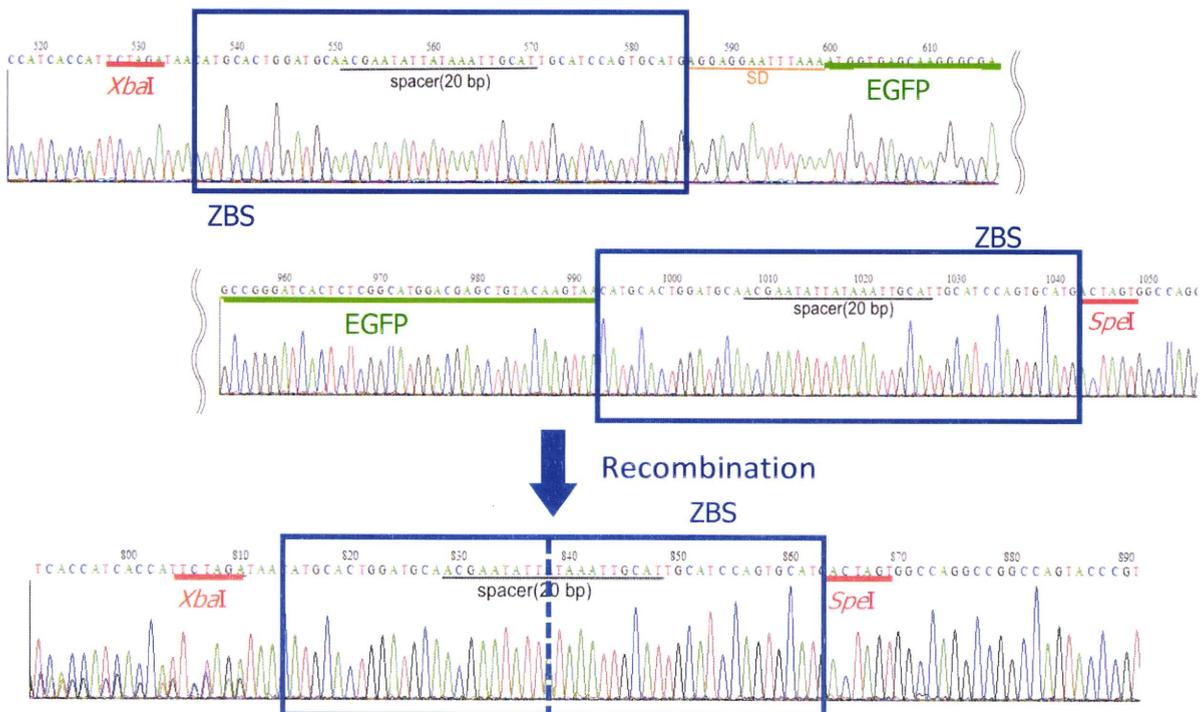
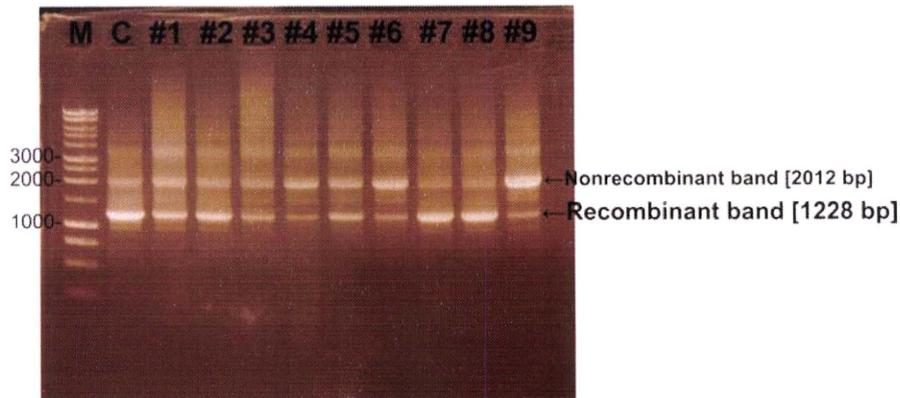


図 12. 大腸菌内における DNA 組換え反応のシーケンス解析結果について



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

C. 研究結果

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 箇所配列を見出した (6 箇所 ZFP 結合配列、図 8)。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)。

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 9)。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 10)。

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。

モデルプラスミドを用いた DNA 組換え反応の評価

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パ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プローン 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。

亜鉛フィンガードメインの DNA 結合親和性が与える DNA 組み換え反応効率への影響

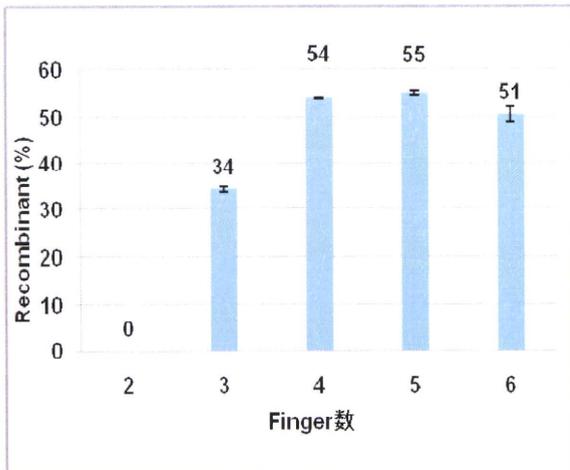


図 15. 亜鉛フィンガー数の違いによる組換え反応効率の変化について (KS6 サイトに結合する ZFP シリーズ)

ZFP と Tn3 酵素ドメインの融合体を構築した後、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 15)。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。

ドメイン間のリンカー長とアミノ酸の種類が与える DNA 組み換え反応への影響

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 16)。

細胞内への RecZF 遺伝子の導入

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 17)。しかし、6 フィンガーモジュールを有する RecZFP

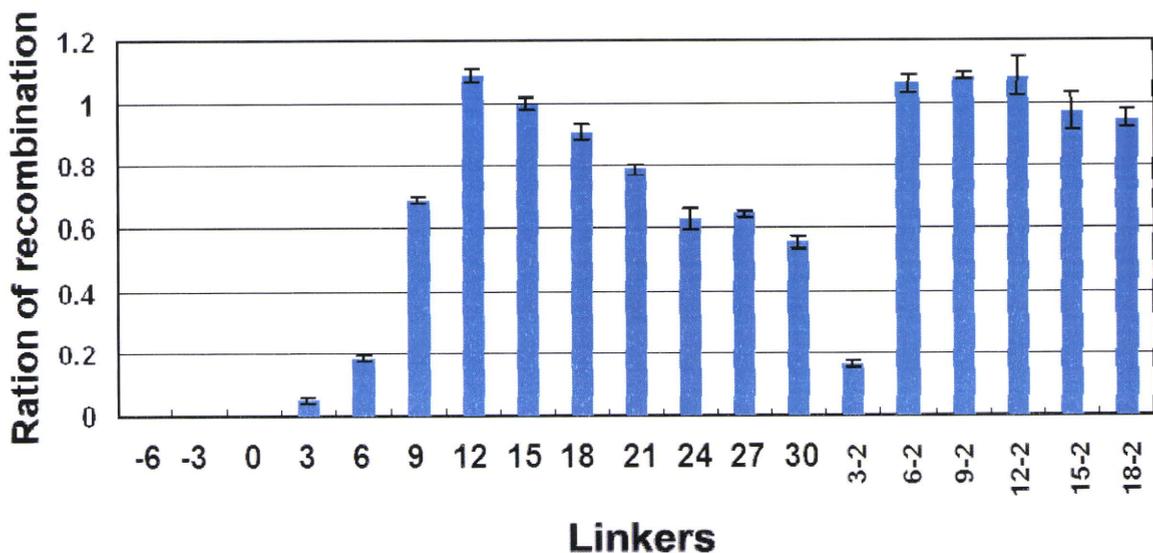


図 16. リンカー配列の異なる RecZF の大腸菌内における DNA 組み換え反応効率について

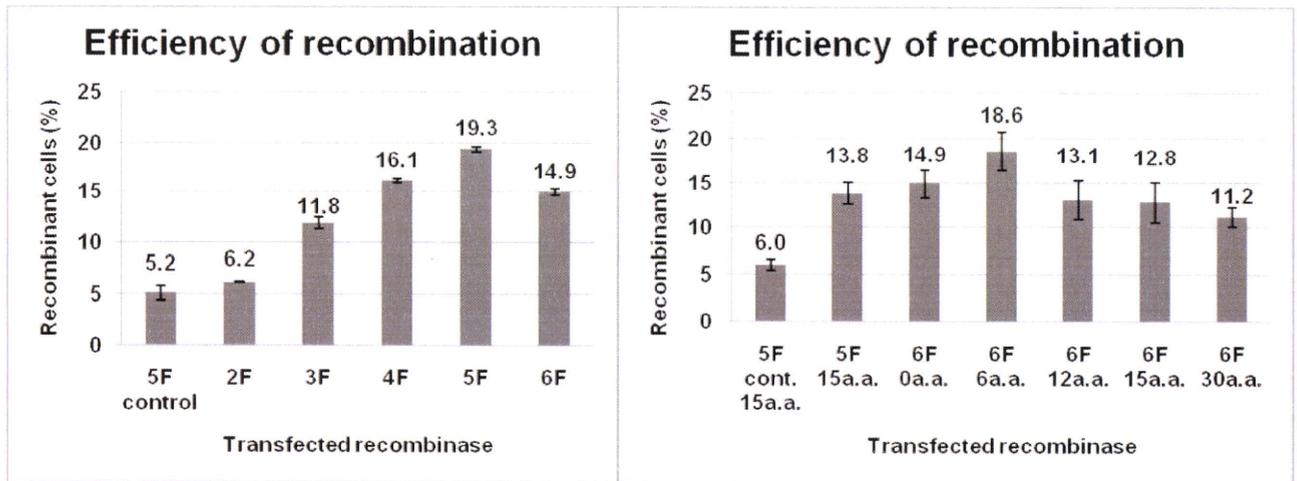


図 17. 哺乳類細胞内での DNA 組み換えについて。亜鉛フィンガー数の違い (左図) とリンカー長の違い (右図) に関して検討を行った。

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 (図 18)。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 (図 19)。そのため、アデノウイルスの産生を HEK293 細胞によって再度行うことでウイルスの力価を最適化し、再度感染実験を行った。この場合にウェスタンブロッティングで十分に検出される RecZF のバンドが確認された (図 20)。また、CHO-K1 細胞のゲノム遺伝子中に導入された標的配列に対して PCR を行った結果、KS34+56 に対応する RecZF を発現している細胞株において組み換え反応後の産物を示唆するフラグメントの生成を確認できた (図 21)。

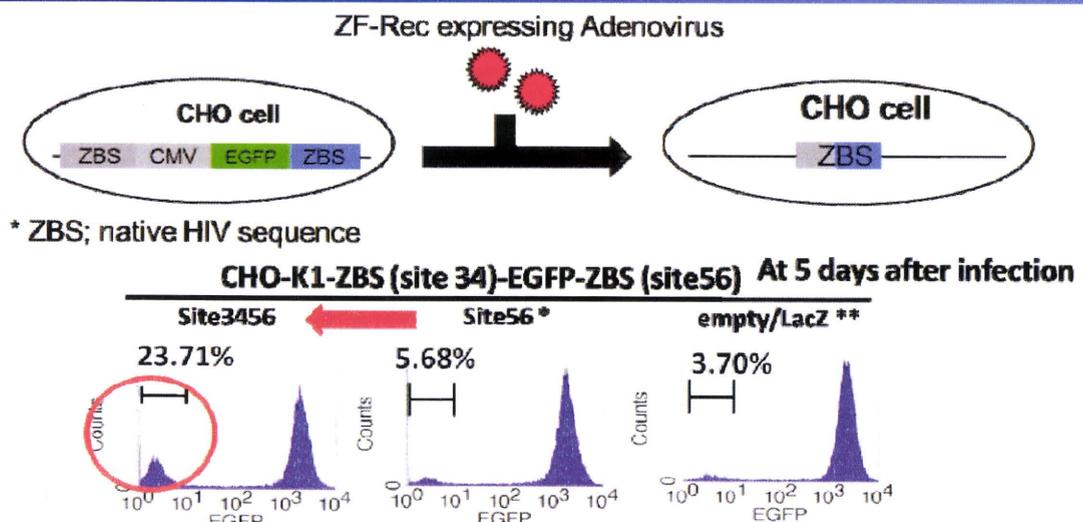


図 18. アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入による DNA 組み換え反応について

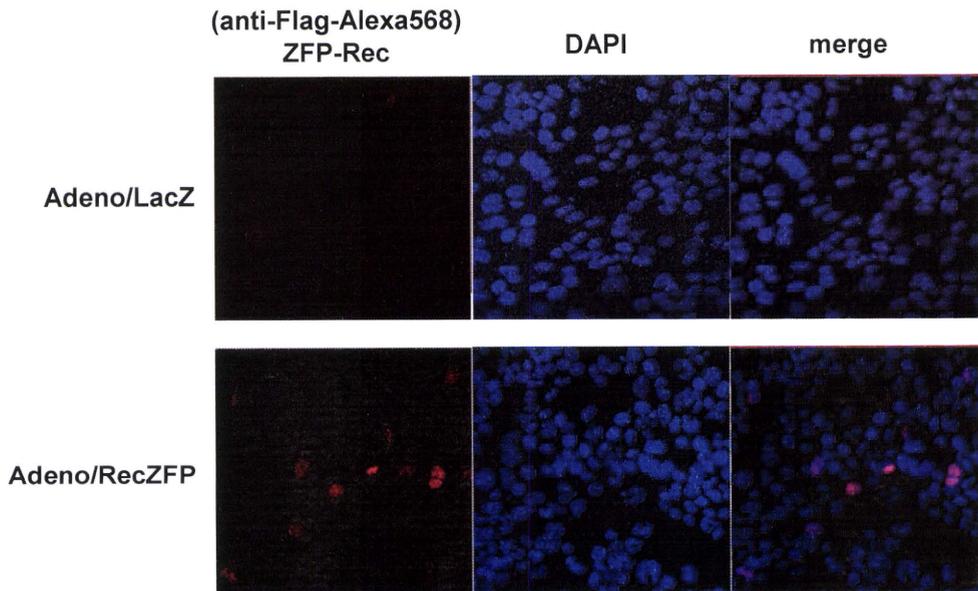


図 19. アデノウイルスベクターによる遺伝子導入によって核内に発現した RecZFP の抗 Flag 抗体による観察について

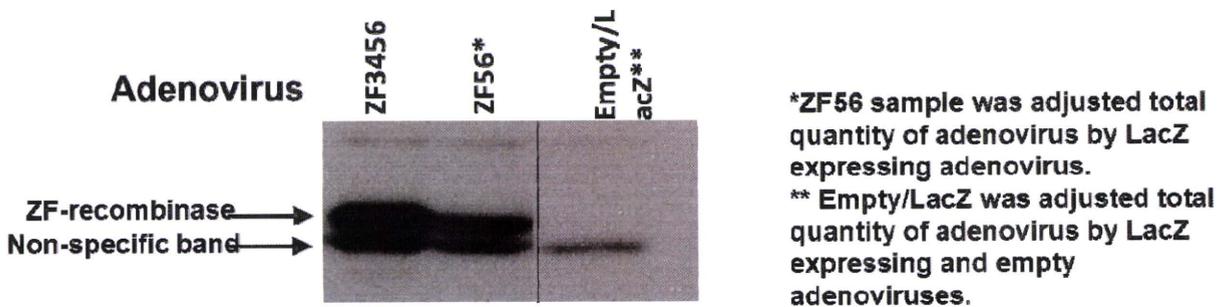


図 20. アデノウイルスベクターによる遺伝子導入後の細胞内での RecZF 発現について

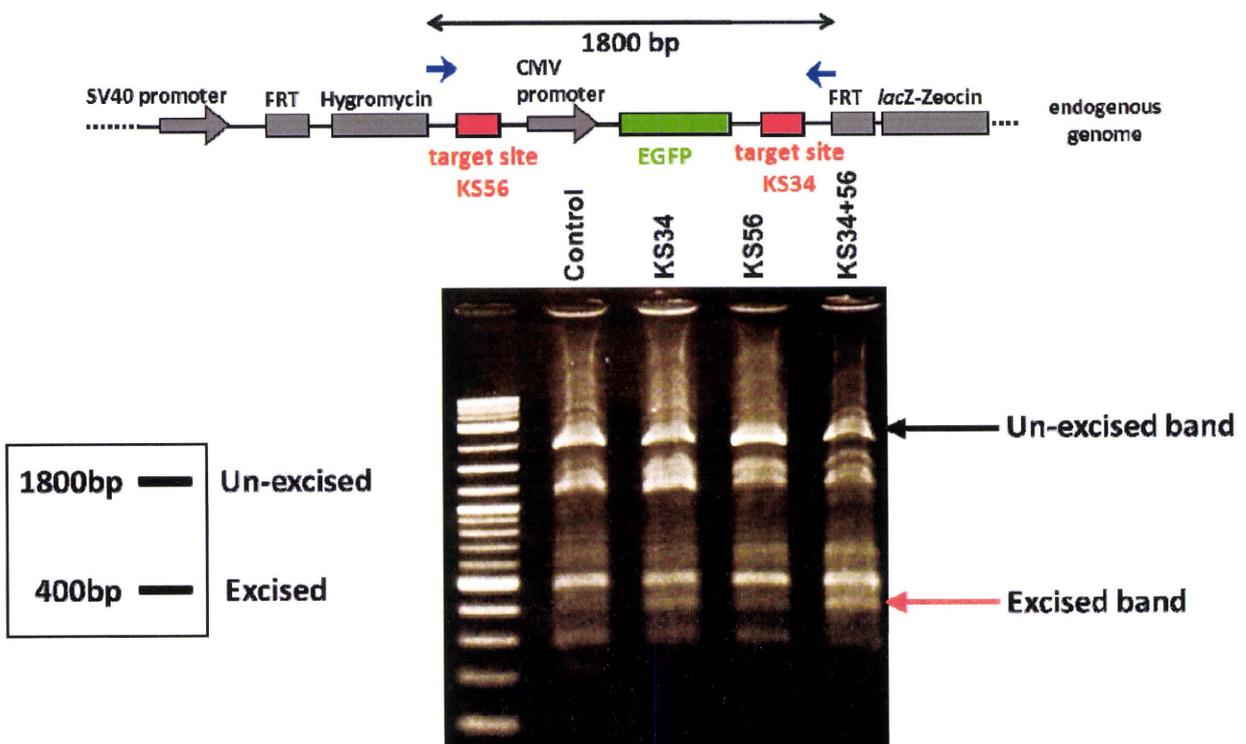


図 21. ゲノム遺伝子を標的とした PCR による DNA 組み換え反応の検出について

D. 考察

HIV プロウイルス遺伝子、特に本研究では比較の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。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いての反応も起こるといった問題を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。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を行うこ

とによって RecZF の発現量の増加が確認された。従って、この感染条件を用いることで更に高い組み換え効率を得ることが可能であると期待できる。EGFP などの蛍光タンパク質を用いた DNA 組み換え反応の検出は非常に迅速な定量が可能であるという特長を有しているが、さらに的確に組み換え反応を検出することが必要であることからゲノミック PCR 法を用いることで組み換え反応後に生成するフラグメントの検出条件を整えることができたことは今後の研究進展において重要になると考えられる。

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。

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 (HIVJRCSF 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。このプラスミドを用いて、NM-resolvase をエラープローン 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。

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。

アデノウイルスベクターを用いた遺伝子導入効率の向上が達成され、細胞内での RecZF 発現量が増大した。それによって、ウェスタンブロッティングによる明確なバンドの検出が可能となった。モ

デル配列における DNA 組み換え反応においてある程度の反応検出条件が整えられたため、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必要がある。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を期待して行った研究であるが、真に有効な治療方法となるためには実際の感染者体内において有効な遺伝子デリバリー法など付随する先端技術が発展する必要がある。また、iPS 技術などに代表される細胞形質を自由に制御することが可能となってきた現在において、遺伝子配列を自在に制御する技術はセルジェネティックエンジニアリングとして疾病治療に有効な細胞を創出することが可能になると期待される。

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.
 - 13) 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.
 - 14) 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.
 - 15) 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,