

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670221

研究課題名(和文) -Cre相補とフレームオーバーラップ発現法の開発

研究課題名(英文) Visualization of replicating genome of hepatitis B virus: development of the method for alpha-Cre complementation and frame overlap

研究代表者

齋藤 泉 (Saito, Izumu)

東京大学・医科学研究所・教授

研究者番号：70158913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：B型肝炎ウイルス(HBV)ゲノムを可視化する目的で、PreS蛋白領域をCre遺伝子の前半部分(-Cre)または後半部分(-Cre)に置き換えたHBVゲノムを作製した。分断Creのサイズは本来のCreの半分であり、両者を同時発現するとCre活性を生ずる。この分断Creを、HBVのPol遺伝子のフレームを温存しながらゲノムサイズをあまり大きくせずに置換した。作製されたHBVゲノムは分断Creを発現し、他方の分断Creをゲノムの外から供給するとCre活性を示し、GFPの発現をオンにした。ここで開発されたHBVゲノムは抗HBV薬剤の蛍光スクリーニングに道を開くと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We constructed genomes of hepatitis B virus (HBV), in which PreS region were replaced by split Cre's (-Cre and -Cre for first and latter halves, respectively), while overlapping Pol frame is maintained. Simultaneous expression of both the split Cre's resulted in the Cre activity. The replacement does not exceed the genome size that can be replicated. The HBV genome described here expressed split Cre and, when the other split Cre was supplied from outside the genome, functional Cre activity was observed and turn on the GFP expression present outside. Because the replication of HBV genomes constructed here have not sufficiently been examined within the term of this study, further experiments are needed to confirm replication of these genomes quantitatively. Moreover, more information could be available if adenovirus vector systems are used instead of transfection. When they are confirmed, these HBV genomes must be useful for fluorescent screening of ant-HBV medicine.

研究分野：ウイルス学

キーワード：B型肝炎ウイルス split Cre 相補 蛍光スクリーニング

## 1. 研究開始当初の背景

(1) HBV の保因者は世界人口の 2-3% を占め、慢性肝炎・肝硬変・肝癌の主要原因である。しかしその治療薬剤においては、現在用いられているインターフェロン、逆転写酵素阻害剤リバビリンの効果は不十分であり、薬剤耐性ウイルスの出現も問題であるため、早急な有効薬剤のスクリーニングが必要である。もし複製した HBV ゲノムに GFP 等の蛍光蛋白を発現させることができれば、この蛍光を可視化・定量することにより複製した HBV ゲノム量を定量することができ、そのゲノム複製を阻止する薬剤を可視化でスクリーニングする道が開かれると考えられる。

(2) HBV に GFP 等の蛍光蛋白をスクリーニングに使えるレベルで発現させることは、HBV ゲノムの特異な構造のため世界でも例がない。その理由は(i) HBV ゲノムはその全ての塩基配列がウイルス蛋白のコード領域としてオーバーラップしており、外来 DNA を挿入した地点で必ずウイルス蛋白が断裂するため、組み込める場所がない。また(ii) HBV の 2 本鎖環状 DNA ゲノムはわずか 3.2kb であらゆるウイルスの中で最も短く、しかもゲノム複製は C (core) 蛋白の殻の中で行われる。この殻に許されるサイズは約 3.5kb で、もし外来配列を入れることができたとしても約 0.2kb である。しかし GFP 遺伝子は 0.8kb、Cre 遺伝子は 1.2kb あり全くのサイズオーバーとなるため組み込むことができない。

## 2. 研究の目的

上記(i)および(ii)を以下の方法で解決し、HBV ゲノム複製を可視化する方法を開発するのが第 1 の目的である。厳密なサイズ制限については、GFP 遺伝子よりサイズが短い  $\beta$ -Cre 遺伝子 (0.5kb) および  $\gamma$ -Cre 遺伝子 (0.4 kb) を用いることで解決する (文献 1)。 $\beta$ -Cre は HBV ゲノム外の  $\beta$ -Cre と会合すれば Cre 活性を与え、ゲノム外の GFP 発現を強力に ON にすることができる。また  $\beta$ -Cre を組み込むのではなく P 遺伝子のスペーサードメインとフレームオーバーラップさせるという方法で両蛋白の発現を同一塩基配列上で共存させることで、HBV ゲノム複製が可能なサイズに収めることが可能であると考えられる。更に HBV ゲノムの外に存在する GFP は強力な CAG プロモーターで発現させるため、HBV のプロモーターより高い発現が見込める。また  $\beta$ -Cre および  $\gamma$ -Cre の役割を逆転させることも可能であるため、どちらを HBV ゲノムに組み込むべきかを明らかにするのが第 2 の目的である。

## 3. 研究の方法

(1) PreS 領域はエンベロープの構成領域であり、PreS 蛋白は感染に必須ではあるがゲノム複製には不要である。そこで PreS 領域を  $\beta$ -Cre または  $\gamma$ -Cre のアミノ酸配列に置換し、同時にオーバーラップする Pol 遺伝子のフレームを温存するように設計した DNA を全合成し、上記領域と置換した。

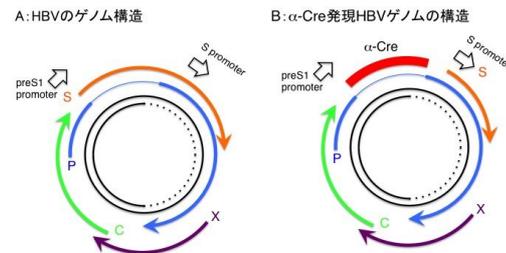


図 1

この構築では  $\beta$ -Cre または  $\gamma$ -Cre は HBV 本来の PreS プロモーターにより発現する (図 1)。

(2) CMV プロモーターから HBV プレゲノムを高発現するプラスミドを HuH 細胞へトランスフェクションし、1~3 日後に GFP の蛍光を顕微鏡で検出した。また定量には蛍光測定装置 (Fluoroskan Ascent FL, Labsystems) を用いた。また他方の分断 Cre を強力な EF1 プロモーター下に過剰に発現するプラスミドを作製した。また分断 Cre の会合により生ずる Cre 活性を検出するには、stuffer DNA が除去される結果、強力な CAG プロモーター下に GFP の発現がオンになるプラスミド pCALNLGFP を共トランスフェクションすることにより行った。

## 4. 研究成果

(1) Pol フレームを温存した  $\beta$ -Cre および  $\gamma$ -Cre 遺伝子の設計は簡単ではなかった。通常の Cre 遺伝子発現フレームに併走するフレームには約 10 個程度の終止コドンが存在し、そのすべてを Cre のアミノ酸を温存しながら他のアミノ酸にかえる一方で、 $\beta$ -Cre および  $\gamma$ -Cre 遺伝子のコドンヒット型化し、しかもオーバーラップする Pol のアミノ酸はなるべく蛋白の構造に影響を与えないよう、プラスまたはマイナスチャージのあるアミノ酸や、構造を変える可能性のある Pro、また疎水性・親水性アミノ酸のバランス、および将来の Southern 解析に便利になるような制限酵素配列を考え、

多くの可能な案から選りすぐった配列をもつ DNA を設計した。

(2) 作製した  $\Delta$ -Cre および  $\Delta$ -Cre 発現 plasmid である pxEFaCre および pxEFbCreN の同時発現により、実際にこの 2 つの蛋白の自己会合により Cre 活性が生じ、pCALNLGFP モニタープラスミドから GFP が発現するかをまず検討した。293 細胞へこれらの plasmid を共トランスフェクションしたところ、 $\Delta$ -Cre および  $\Delta$ -Cre 単独では 3 日目でも全く蛍光が見られず、 $\Delta$ -Cre および  $\Delta$ -Cre を同時トランスフェクションした細胞ではわずか 1 日目で蛍光が見られ、このアッセイでは本来の Cre の約 1/30 の活性が得られた。GFP を発現する CAG プロモーターは強力であり、この蛍光レベルは十分に高い。

(3)  $\Delta$ -Cre および  $\Delta$ -Cre 遺伝子を HBV ゲノムの PreS 領域と置換した HBV ゲノムを持つプラスミド pCM-HBaCre および pCM-HBbCreN を作製した。この場合分断 Cre は EF1 プロモーター等のプロモーターに比して非常に弱い PreS プロモーターから発現することになるが、他方の分断 Cre は EF1 プロモーターから過剰に発現されるため、その発現量はゲノム量を定量的に反映することが期待される。

HuH-7 細胞 Day2

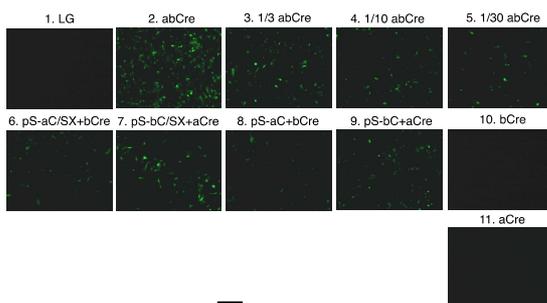


図 2a

蛍光強度 (HuH 細胞 day2)

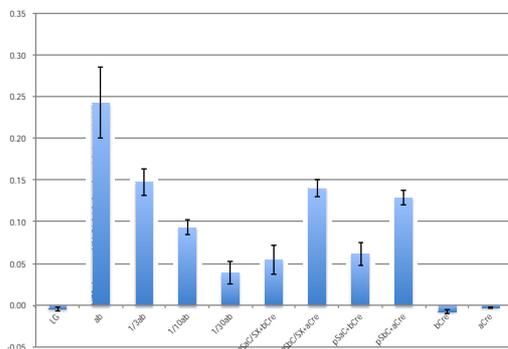


図 2b

この preS1 プロモーター + Cre、過剰量の  $\Delta$ -Cre、モニタープラスミドを HuH 細胞へ共トランスフェクションすると、preS1 プロモーターによる蛍光が検出され、(図 2a、パネル 6 と 7 ; 図 2b)。PreS1 プロモーターから  $\Delta$ -Cre を発現した方が  $\Delta$ -Cre の場合より 2 倍以上の蛍光が観察された。この場合は本来の PreS1 からの発現結果を見ているのに対し、CMV プロモーターから HBV プレゲノムを発現する実験では PreS1 プロモーターの上流から強力な CMV プロモーターが転写されるため、PreS1 プロモーターの活性が阻害されることが考えられる (図 2a、パネル 8 と 9 ; 図 2b)。実際に PreS1 のプロモーターの発現は抑制され蛍光が減少するが、 $\Delta$ -Cre の蛍光が  $\Delta$ -Cre より高いことが確認された。以上の結果から、この蛍光を発する HBV ゲノムを用いた実験では  $\Delta$ -Cre をゲノムに組み込む方が効率が高いことが示唆された。(4) 上の結果から PreS1 プロモーター下に分断 Cre を発現させる実験では、トランスフェクション実験において蛍光を検出できることが結論された。しかし、複製した HBV ゲノムから発現誘導される蛍光を検出するには、鋳型として用いた HBV ゲノムからの発現を除去する必要がある。本実験では 1 ~ 3 日目の蛍光を計測しているが、複製した HBV ゲノム量は 10 日以上に渡って増加するのに対し、鋳型として導入した DNA は細胞内での崩壊や細胞のまきかえによる希釈のため除去されると考えられる。この長期にわたる実験は本研究では行われておらず今後の課題である。また我々はアデノウイルスベクターで大量のプレゲノムを産生する系を開発しているが、同様の鋳型の除去を観察している。このアデノウイルスベクターを用いた実験系は有望であり、本研究を基盤とした今後の研究が期待される。

#### < 引用文献 >

Casanova E1, Lemberger T, Fehsenfeld S, Mantamadiotis T, Schütz G. Alpha complementation in the Cre recombinase enzyme. *Genesis*, 37:25-29, 2003.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

- 1) M Suzuki, S Kondo, Z Pei, A Maekawa, I Saito and Y Kanegae. Preferable sites and orientations of transgene inserted

in the adenovirus vector genome: The E3 site may be unfavorable for transgene position. *Gene Therapy*, 2015

- 2) Kondo S., Yoshida K., Suzuki M., Saito I., and Kanegae Y. Adenovirus-encoding virus-associated RNAs suppress HDGF gene expression to support efficient viral replication Plos One., 9: e108627, 2014
- 3) Lystad AH, Ichimura Y, Takagi K, Yang Y, Pankiv S, Kanegae Y, Kageyama S, Suzuki M, Saito I, Mizushima T, Komatsu M, Simonsen A. Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. *EMBO Rep.*,15:557-565, 2014

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 前川 文、近藤 小貴、鈴木 まりこ、齋藤 泉、鐘ヶ江 裕美 Cas9 高発現アデノウイルスベクター及び多数 guide RNA 同時発現によるゲノム編集効率の最適化とその応用 第 38 回 日本分子生物学会年会、神戸、2015 年 12 月
- 2) A Maekawa, S Kondo, M Suzuki, I Saito and Y Kanegae. Multiplex guide RNAs targeting HBV genome expressed using adenovirus vector improve the efficiency of CRISPR/Cas9 system. HBV International Meeting 2015, Germany/Bad Nauheim, Oct. 2015
- 3) M Suzuki, S Kondo, M Yamasaki, I Saito, M Shibasaki and Y Kanegae. Efficient production of the replicating HBV genome using “HBV-AdV system.” HBV International Meeting 2015, Germany/ Bad Nauheim, Oct. 2015
- 4) 前川 文、裴 崢、近藤 小貴、鈴木 まりこ、齋藤 泉、鐘ヶ江 裕美 Adenovirus vectors lacking virus-associated RNA expression enhance shRNA activity 第 20 回日本遺伝子治療学会学術集会、東京、2014 年 8 月
- 5) 吉岡 貴史、前川 文、鈴木 まりこ、近藤 小貴、鐘ヶ江 裕美、齋藤 泉 Development of a novel adenovirus vector for cancer-specific and stable expression: mini-adenovirus vector (mini-AdV)第 20 回日本遺伝子治療学会学術集会、東京、2014 年 8 月

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計 1 件)

名称:複数のユニットが多重に連結した DNA カセットを含むベクターの製造方法  
発明者:齋藤 泉  
権利者:  
種類:  
番号:2014-242914  
出願年月日:2014 年 12 月 1 日  
国内外の別:

取得状況 (計 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
<http://www.ims.u-tokyo.ac.jp/idenshi/pg154.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤 泉 (SAITO Izumu)  
東京大学・医科学研究所・遺伝子解析施設・教授  
研究者番号:70158913

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

( )

研究者番号: