

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14633

研究課題名（和文）ヒトゲノムへの位置特異的遺伝子導入法の開発

研究課題名（英文）Development of a site-specific gene integration method to human genomes

研究代表者

世良 貴史（Sera, Takashi）

岡山大学・ヘルスシステム統合科学研究科・教授

研究者番号：10362443

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：従来の遺伝子治療法の問題点を克服するために、挿入酵素を空間的に標的DNAサイトに近接させることにより位置特異的遺伝子挿入を可能にする新しい技術の開発を目指した。その近接させる手法として、導入遺伝子と標的サイトにそれぞれ特異的に結合する2種類の人工DNA結合タンパク質を柔軟なペプチドリンカーで連結した新しい人工DNA結合タンパク質を作製し、これを用いて、まずは試験管内のモデル系で、標的DNAに別のDNAを特異的に挿入させることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム上の特定の標的サイトに、望む遺伝子を特異的に挿入する、新たな方法論を提供することができる。これにより、レトロウイルスベクターの致命的な問題点を克服し、患者の有する疾患に合わせた様々な治療遺伝子をゲノム上の安全な場所に挿入することが可能となる。さらに、本手法は、ゲノム情報を自由に改変する手法の一つとして新たに加わることになり、様々な生命現象の解明や、新しいバイオテクノロジーの創出にも貢献することが大いに期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to overcome the problems of conventional gene therapy, we aimed to develop a new technology that enables site-specific gene insertion by making an integrase spatially close to the target DNA site. To this end, a new artificial DNA binding protein is created by connecting two kinds of artificial DNA binding proteins that specifically bind to their own target sites respectively with a flexible peptide linker, and using this novel protein, in the in vitro model system, we succeeded in specifically inserting another DNA into the target DNA.

研究分野：蛋白質工学・遺伝子工学・細胞工学

キーワード：遺伝子導入

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

あるタンパク質を正常に作れないために、病気を発症する多くの患者を遺伝子治療により救済することが可能である。その際、治療遺伝子をゲノム中に挿入できれば、一度導入するだけで細胞分裂してもその後ずっと細胞内に維持されるので最も都合がよく、遺伝子治療用ベクターとして(逆転写により遺伝子 DNA をヒトゲノムに挿入できる)レトロウイルスベクターが最も有望視された。しかしながら、このベクターを用いて 1999 年にフランスで行われた臨床試験において、標的の遺伝病は治療できたが、その後数名の患者で新たに白血病が発病したため、遺伝子治療はストップした。その原因は、ランダムと考えられていたレトロウイルスベクターによる遺伝子導入が、実際はヒトゲノム上の特定の場所に挿入されることにより、健常者では低く抑えられていた内在性の遺伝子が強発現されるように変化したために白血病が発症されることが分かった。そのため、より安全な遺伝子治療法の確立のためには、ゲノム上の安全な場所に、すなわち遺伝子がない場所に特異的に治療遺伝子を導入する技術の開発が急務である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、安全な遺伝子治療用のベクター作製のための基礎技術となる、治療用遺伝子をヒトゲノム上の安全な場所に特異的に導入する技術の開発である。そのために、研究代表者が開発した人工 DNA 結合タンパク質を 2 つタンデムに連結した人工タンパク質を介して、① 遺伝子導入能を有する酵素インテグラーゼと導入遺伝子との複合体、および② 標的サイトを空間的に、しかも特異的に近接させることにより、ヒトゲノムへの位置特異的遺伝子導入を可能にする新しい技術の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) プラスミドの構築

2 つの人工 DNA 結合タンパク質 (AZP)、すなわち、2 種類の DNA 標的配列にそれぞれ結合する AZP を長さの異なる柔軟なペプチドリンカーによって連結されたものをコードする DNA を、pET-21a プラスミドに段階的にクローニングして、Tandem AZP 構築用の大腸菌発現プラスミドを調製した。

試験管内挿入反応のスペーサー長検討用の 4 つのプラスミドは、下記のように構築した。Donor (60) および Donor (150) プラスミドは、ΦC31 インテグラーゼ認識サイトの 60 および 150 bp 上流に位置する AZP 結合サイトを含む 42 および 132 bp の DNA 断片をそれぞれ Donor プラスミドの Acc65I/HindIII サイトにクローニングすることによって調製した。Acceptor1 (60) および Acceptor1 (150) プラスミドは、ΦC31 インテグラーゼ認識サイトの 60 および 150 bp 上流に位置するもう一つの AZP 結合サイトを含む 51 および 141 bp の DNA 断片をそれぞれ Acceptor1 プラスミドの Acc65I/NotI サイトにクローニングすることによって調製した。

(2) 人工 DNA 結合タンパク質の精製

Tandem AZP を大腸菌 BL21 (DE3) pLysS で過剰発現させ、回収した大腸菌細胞を超音波処理して溶解し、遠心分離によって清澄化した後、Bio-Rex 70 カラムにロードし、目的タンパク質を 400 mM NaCl 緩衝液で溶出した。最終タンパク質試料をドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 後、クマシーブリリアントブルー染色によって分析した。タンパク質濃度は、NI タンパク質アッセイキットを用いて決定した。

(3) DNA 結合アッセイ

両末端を蛍光標識したプローブを精製した Tandem AZP と共に 10 μl の緩衝溶液中でインキュベートした。1.5 時間反応後、プローブ-タンパク質複合体と遊離プローブを 6% 非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動して分離した。蛍光シグナルは、イメージングシステムを用いて検出した。

(4) 試験管内 DNA 挿入実験

全ての試験管内 DNA 挿入実験は下記のように実施した。各プラスミド基質 (100ng) を 3.13 nM TandemAZP とともに氷上で 1.5 時間反応緩衝液中でインキュベートした。次いで、混合物を ΦC31 インテグラーゼと共に様々な温度で 1.5 時間インキュベートした。反応混合物をフェノールで抽出し、ScaI で消化した。最終反応混合物を 1.2% アガロースゲル上で分離し、そしてゲルを UV 照射下で写真撮影した。アガロースゲル画像上の DNA バンド強度は、専用のソフトウェアを用いてデジタル化および定量した。統計分析は、マイクロソフトエクセルを用いたスチューデントの t 検定を用いて行った。

4. 研究成果

(1) タンパク質の発現と精製

本手法は、治療遺伝子を有するドナー DNA を、今回開発した新しい人工 DNA 結合タンパク質誘導体 (「Tandem AZP」) を用いて、ヒトゲノムのアクセプター DNA 上の特定の場所に近づけるこ

とにより、ΦC31 インテグラーゼによる遺伝子挿入反応を位置特異的に生じさせる。本研究に用いる Tandem AZP は、ドナープラスミド上の標的配列とアクセプタープラスミド上の別の標的配列にそれぞれ結合する、2つの AZP をフレキシブルなペプチドリンカーでつなげた人工タンパク質である。まず、この Tandem AZP の遺伝子をそれぞれ強力な T7 プロモーターの下流においた発現プラスミドを作製し、それぞれで形質転換した大腸菌で該当タンパク質を大量発現させた。Tandem AZP は、陽イオン交換カラムを用いて精製した。SDS-PAGE から判断すると、95%以上の純度で精製できた。

(2) 挿入反応に用いる Tandem AZP の濃度決定

まず、標的 DNA とほぼ 100% 結合する AZP の濃度を実験的に決定した。標的 DNA に対して Tandem AZP が少なく、標的 DNA がフリーである割合が多いと、当然挿入反応の効率が下がる。逆に、標的 DNA に対して Tandem AZP が過剰に存在すると、ドナー及びアクセプター DNA 上の AZP 結合サイトがすべて、1分子の Tandem AZP により占有されてしまうので、Tandem AZP がドナー DNA を標的サイトにリクルートする能力が下がってしまうからである。

DNA 結合アッセイにより、標的 DNA とほぼ 100% 結合できる Tandem AZP の最小濃度は、3.1 nM であることがわかった。今後の挿入反応に用いる Tandem AZP は、すべて 3.1 nM で固定することとした。

(3) 30°Cでの挿入反応

本研究の目的は、まずは、ドナープラスミドをアクセプタープラスミドへ導入する ΦC31 インテグラーゼの反応を Tandem AZP で優先的に生じさせることができるかどうかを試験管内で実証することである。より具体的には、2種類のアクセプタープラスミドを用意した。1つは、標的のアクセプタープラスミド Acceptor-1 で、ΦC31 インテグラーゼの認識サイトのほかに Tandem AZP 中の1つの AZP の認識サイトを有している。もう一つは、コントロールとして用いるアクセプタープラスミド Acceptor-2 で、ΦC31 インテグラーゼのもう一つの認識サイトのみに有している。さらに、用いるドナープラスミド Donor は、ΦC31 インテグラーゼの認識サイトおよび Tandem AZP 中のもう1つの AZP の認識サイトを有している。プラスミドの長さが異なると挿入反応の効率を変えてしまうかもしれないので、Acceptor-1 と Acceptor-2 の長さは揃えた。そうすると、Donor との挿入生成物は、5.7 kbp の同じ長さになってしまう。簡便なアガロースゲルで分析できるようにするために、Acceptor-2 に ScaI 制限酵素サイトを加えた。そのため、挿入反応後、制限酵素処理することにより、Acceptor-1 との挿入生成物は 5.7 kbp のリニアな DNA 断片となり、また Acceptor-2 との挿入生成物は 4.0 kbp と 1.7 kbp のリニアな2つの DNA 断片となる。したがって、アガロースゲル上の 5.7 kbp と 4.0 kbp の DNA バンドの量比を比較することにより、Tandem AZP による Acceptor-1 への挿入反応の選択性を評価することができる。すなわち、Tandem AZP 存在下で、5.7 kbp の DNA バンドが 4.0 kbp の DNA バンドより多ければ、Tandem AZP による挿入反応が選択的に行われたことがわかる。

まずは、2つのアクセプター DNA を共存させた場合にも、Tandem AZP により、標的の Acceptor-1 への挿入反応を優先的に行わせることができるかどうかを検証した。Tandem AZP 存在下で、コントロールの Acceptor-2 との挿入生成物の増加はみられなかった。これに対し、Tandem AZP 存在下で、標的の Acceptor-1 の挿入生成物の明らかな増加が見られ、アクセプター DNA が混在していても、Tandem AZP は、標的の Acceptor-2 への挿入反応を優先的に生じさせることがわかった。なお、基準となるペプチドリンカーの長さをさらに伸ばした変異体を2種類作製し、その性能を評価したところ、最も短いペプチドリンカーを有する人工タンパク質が最も高い性能を示すことがわかった。

(4) 30°Cでの挿入反応における ΦC31 インテグラーゼの濃度依存性

50 nM ΦC31 インテグラーゼで Tandem AZP による選択的挿入反応が見られたが、次に、ΦC31 インテグラーゼの濃度を変えて、挿入反応の効率・選択性がどう変わるかを見てみた。

ΦC31 インテグラーゼの濃度を 60 nM から 18 nM まで下げてみた。図1のレーン2と4の比較からわかるように、ΦC31

インテグラーゼの濃度を 50 nM から 60 nM へ上げると、D+A1 の生成物の量はあまり変わらず、D+A2 の副生成物が増加し、挿入反応の選択性の低下が見られた。

ΦC31 インテグラーゼの濃度を 50 nM から 40, 30, 18 nM へ下げていくと、ΦC31 インテグラーゼの濃度依存的に、挿入反応の生成物の減少が見られた。

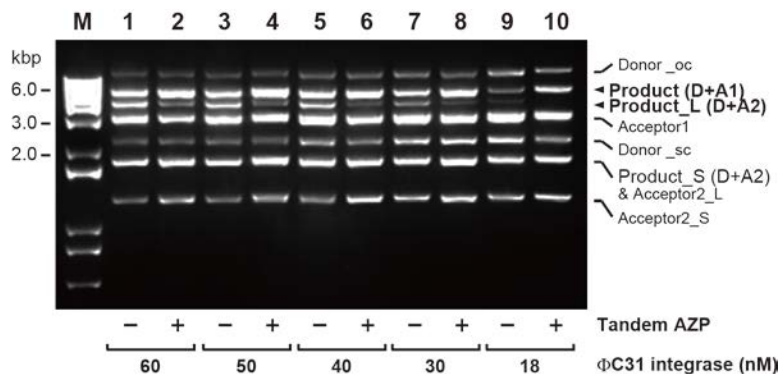


図1. 30°Cでの挿入反応におけるΦC31 インテグラーゼの濃度依存性

以上の結果より、本条件下では、ΦC31 インテグラーゼの濃度が 50 nM の時に、挿入反応の反応性及び選択性が最も高いことがわかった。

(5) 挿入反応の温度依存性

次に、開発した遺伝子挿入システムの温度依存性を検証した。ΦC31 インテグラーゼの至適温度は 30°C のようであるが、遺伝子治療ではヒトの体温 37°C で行う必要があるためである。

反応温度を 30°C から 25°C へと下げると、D+A1 の生成量は増えているが、それ以上に D+A2 の生成量が増えてしまい、選択性が低下していた (図 2 のレーン 4 と 6)。

さらに反応温度を 16°C へと下げると、挿入反応生成物が著しく減少した (図 2 のレーン 2 と 4)。

逆に、反応温度を 30°C から 37, 42°C へと上げると、反応生成物量は減少していき、42°C ではほとんど反応生成物が見られなくなった (図 2 のレーン 9, 10)。しかしながら、図 2 のレーン 8 に見られるように、Tandem AZP 存在下で、かすかに D+A1 が見られたので、次に ΦC31 インテグラーゼの濃度を上げてみることにした。

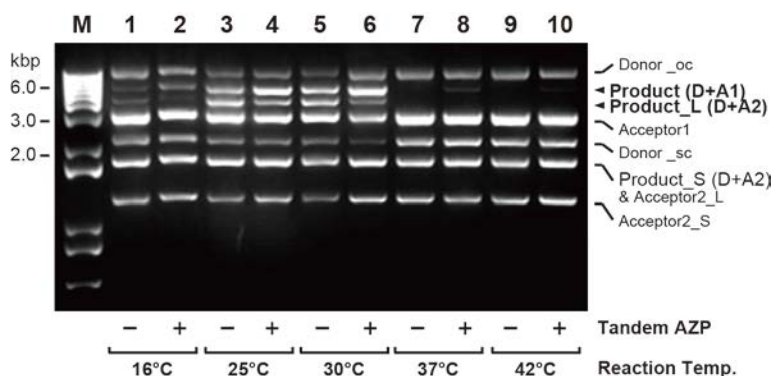


図 2. 挿入反応の温度依存性

(6) 37°C での挿入反応における ΦC31 インテグラーゼの濃度依存性

本システムの 37°C での反応性を向上させるため、ΦC31 インテグラーゼの濃度を 1350 nM まで上げてみた。図 3 に見られるように、ΦC31 インテグラーゼを 150 nM 用いた時に、30°C の時と同程度の反応性が見られ、かつ及び選択性が最も高かった。さらに、150 nM から 450 nM の間での濃度依存性を見るため、ΦC31 インテグラーゼの濃度を 150, 250, 350, 450 nM と振ってみたが、150 nM での反応が最も良かった。

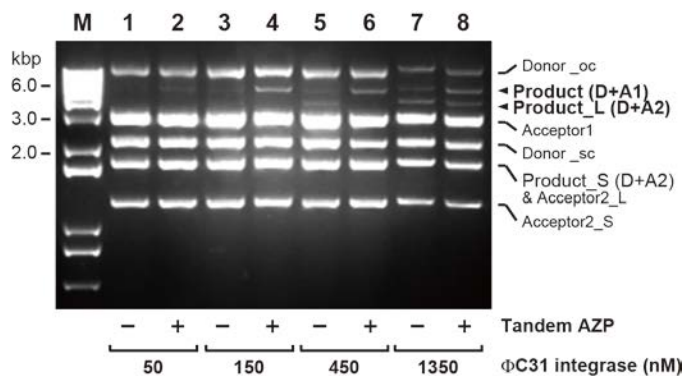


図 3. 37°C での挿入反応における ΦC31 インテグラーゼの濃度依存性

(7) 90 分間隔での ΦC31 インテグラーゼの複数回投与

37°C で反応性を改善するために、まず反応時間を 90 分から 180 分および 270 分に増やしてみたが、改善は見られなかった。この結果は、ΦC31 インテグラーゼは 37°C では 90 分以内に失活する可能性があることを示唆している。

そこで、次に 90 分間隔で 150 nM の ΦC31 インテグラーゼを投与することを検討した。これにより、投与回数に応じて D+A1 生成物が増加した (図 4)。投与した ΦC31 インテグラーゼの総量は 450 nM に相当するが、複数の投与の結果は 450 nM の単回投与を用いて得られたもの (図 3 のレーン 6 に示す) とは明らかに異なっていた。従って、90 分間隔での ΦC31 インテグラーゼの複数回投与により、部位選択性を低下させることなく 37°C で反応性を改善することに成功した。

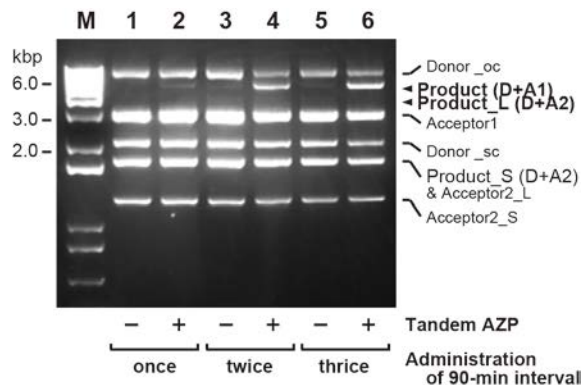


図 4. 90 分間隔での ΦC31 インテグラーゼの複数回投与

(8) ΦC31 インテグラーゼ認識部位と

AZP 認識部位との間のスペーサー DNA 領域の伸長

さらに、ΦC31 インテグラーゼ認識部位と AZP 認識部位との間のスペーサー DNA 領域の長さを検討した。そのために、ΦC31 インテグラーゼ認識部位と AZP との間のスペーサー DNA 領域である

2組の新しいドナー／アクセプター誘導体、Donor (60)／Acceptor1 (60) および Donor (150)／Acceptor1 (150)を構築した。認識部位は、元の30-bp から、それぞれ60-bp および150-bp まで伸長した。図5に示すように、より長いスペーサーを有するこれらのプラスミド間の組込みは効率的かつ特異的にも起こり、我々の挿入システムはスペーサーの長さに関して柔軟であり得ることを示唆している。将来のヒト細胞での位置特異的遺伝子挿入への応用において有用性を高めるために、さらに長いスペーサーを検討する必要があるかもしれない。

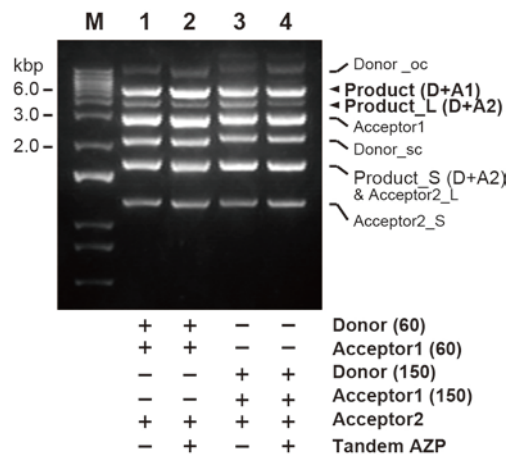


図5. スペーサー長の検討

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計1件)

- ① Tatsuhiko Sumikawa, Serika Ohno, Takeharu Watanabe, Ryo Yamamoto, Miyu Yamano, Tomoaki Mori, Koichi Mori, Takamasa Tobimatsu, and Takashi Sera*, “Site-specific integration by recruitment of a complex of ΦC31 integrase and donor DNA to a target site by using a tandem, artificial zinc-finger protein”, *Biochemistry*, 査読有, 57巻 2018, 6868–6877.

DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00979

〔学会発表〕 (計0件)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当者なし

(2)研究協力者

該当者なし