

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15521

研究課題名(和文) ゲノム編集を促進する逆転写酵素阻害剤の開発とその応用

研究課題名(英文) Development and applications of allosteric reverse transcriptase inhibitors for Genome engineering

研究代表者

中村 朋文 (Nakamura, Tomofumi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・研究員

研究者番号：00772526

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：本萌芽研究では、まずCRISPA-Cas9によるゲノム編集効率を細胞内に発現した蛍光物質であるVenusの輝度を計測することによって評価するassay systemを構築した。また、ゲノム編集効率を変化させると報告された薬剤の効果を評価した。細胞内に発現させたSpCas9によるVenusのゲノム編集効果をマイクロプレートリーダーやFCMを用いて蛍光輝度を計測することによって、定量的にゲノム編集効率を検出可能であった。一方で使用した薬剤(AZT、SCR7、L755507)に関して構築したassay systemで評価するも、有意なゲノム編集促進または阻害効果は確認されなかった。

研究成果の概要(英文)：We produced a new assay system for detecting genome editing efficiency of CRISPA-Cas9 (SpCas9) by measuring fluorescent intensity emitting from the fluorescent proteins (Venus) expressed in 293T and COS7 cells, and then investigated and evaluated some compounds that were reported as affecting the genome editing (DNA repair) efficiency. By measuring the Venus fluorescent intensity in the cells using microplate reader and FCM, it was possible to acquire quantitatively the efficiency of Venus genome editing by SpCas9. When we analyzed the compounds of AZT, SCR7, and L755507 reported as genome editing enhancers or inhibitors by using the assay system, significant change of Venus intensity in the presence of the compounds were not detected.

研究分野：感染症、血液内科

キーワード：HIV-1感染症 CRISPA-Cas9 遺伝子編集

1. 研究開始当初の背景

HIV 感染症は、ウイルス蛋白を標的とした抗ウイルス薬を複数内服する多剤併用療法が唯一の治療法である。しかし、服薬を中止すると細胞内に残存する HIV プロウイルスから HIV が再増殖するため、生涯にわたり高額な薬剤を内服し続けることが必要である。したがって、体内からウイルスを完全に排除する HIV の根治療法の開発が急務であるという事実は言うまでもない。そのような状況下で、CRISPER-Cas9 システムによるゲノムの遺伝子編集効率（遺伝子修復を含めた）を逆転写酵素阻害剤（NRTI）である AZT 及びその類似薬が上昇させると報告された。報告によれば、AZT は濃度依存的に非相同末端再結合（non-homologous end joining : NHEJ）経路による遺伝子修復を促進していることが示され、すなわち CRISPR-Cas9 の遺伝子編集（ノックアウト）効率を上昇させていることが証明された。したがって、この報告から、研究室が所有する NRTI ライブラリーの CRISPR-Cas9 によるゲノム編集促進効果を評価することを考えた。

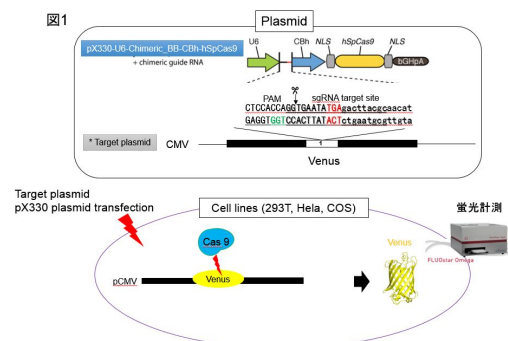
2. 研究の目的

本研究者は、抗 HIV 薬である NRTI として臨床応用されている AZT が CRISPR-Cas9 によるゲノム編集を促進する薬剤として報告されたことに着目し、すでに臨床応用されている NRTI、我々の研究室で合成展開された NRTI、抗 HBV 剤関連の NRTI のライブラリーから、CRISPR-Cas9 のゲノム編集を促進する薬剤の選定および同定を行い、同時にそのゲノム編集促進（遺伝子修復）機序の解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、まず上記報告に関して確認する為に細胞内に蛍光物質（Venus）を発現させた後、SpCas9 と Venus を標的とした sgRNA を細胞内に導入することにより、Venus の発現を計測することによって、遺伝子編集効率を定量的に評価する新しい Assay system (図 1) を構築した。続いて AZT を初めとする遺伝子編集効率に影響を与えると報告された薬剤 (図 4) の評価を行った。

Plasmid information and Assay protocol



4. 研究成果

Px330 Plasmid 内に挿入した sgRNA 配列は、Scramble (SC) 配列及び Venus に対する標的配列を 2 力所 (V1, V2) 設定した。標的配列は CRISPA Direct を用いてゲノム DNA とできる限り相同性がないように設定した。(図 2 上)

編研究で構築された assay system で用いた plasmid 投与量と Venus の相対蛍光輝度（遺伝子切断効率）の結果を図 2 下に示す（細胞は 293T 細胞を使用）。設定した Venus に対する標的配列 (V1, V2) および SpCas9 による Venus のゲノム編集効果の結果、投与 plasmid の容量依存的に Venus の相対蛍光輝度の低下、すなわち発現が抑制されていることが示唆された。

図2

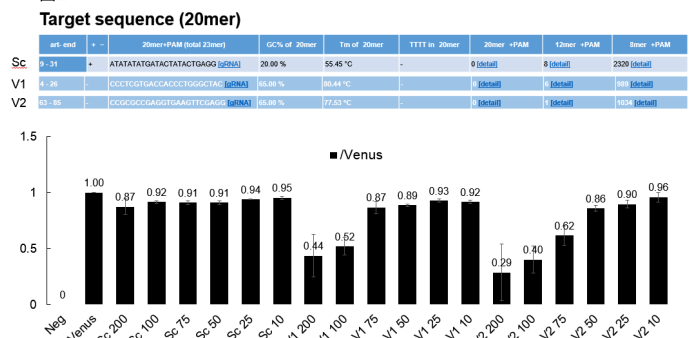


図2: 上表は標的 sgRNA 配列とヒトゲノムとの相同性を比較した表、下グラフは sgRNA Scramble (SC 配列及び Venus に対する標的配列 (V1, V2) を使用した際の Venus の相対蛍光輝度を示す。

また、同様の条件下で FCM を用いて Venus intensity を測定し、plasmid 内に V2 sgRNA 挿入した際において、明らかに Venus の蛍光輝度の低下を認めた (図 3)。

図3

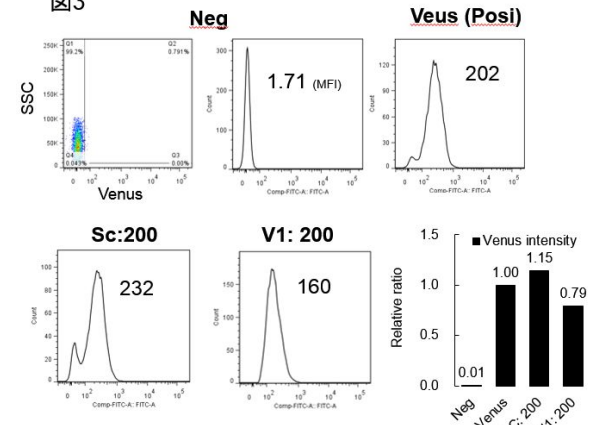


図 3: FCM による Negative control, Positive control (Venus 発現のみ), sgRNA に SC 配列及び V2 配列を使用した際の Venus の相対蛍光輝度を示す。

以上の結果から構築された assay system において、細胞内における SpCas9 の遺伝

子編集による Venus 発現抑制効果を認め、その蛍光輝度を測定することによって定量化でき得ることが示された。

次に、NHEJ 促進薬として報告された NRTI である AZT、NHEJ 阻害剤として報告された SCR7 および Homology Directed Repair : HDR (相同組換え型修復) 促進剤として報告された L755507 の化合物について、そのゲノム編集促進または阻害能を構築された assay system によって解析した。化合物の化学構造を下記図 4 に示す。

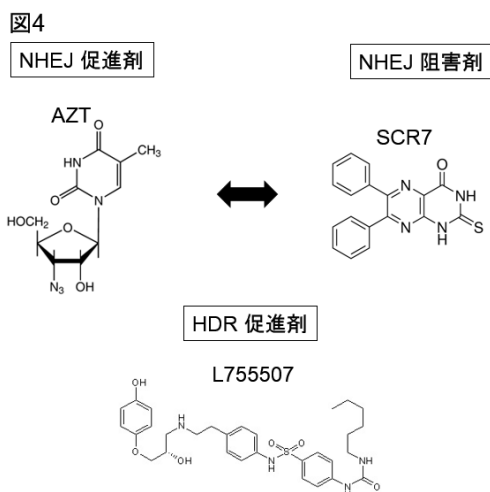


図 4: 本研究で使用した化合物とその構造

今回は、アフリカミドリザルの腎由来である COS7 細胞とヒト胎児由来腎臓上皮細胞である 293T 細胞を用いて、上記の assay system により評価(蛍光マイクロプレートリーダー)を行った。

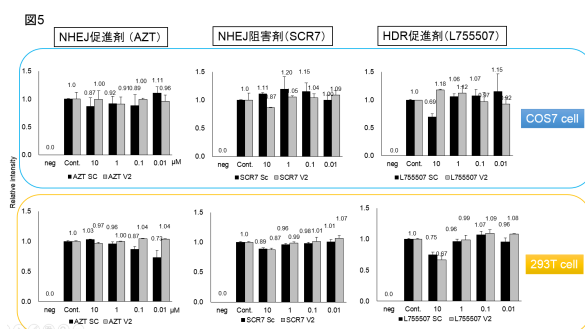


図 5: Negative control である Scramble sgRNA と標的配列である V2 sgRNA を使用し、各化合物存在下における濃度依存的な Venus の相対蛍光輝度を示す。

図 5 に示されるように、AZT で期待された NHEJ 経路の促進効果 (蛍光輝度の上昇) や SCR7 の NHEJ 阻害効果 (蛍光輝度の上昇)、L755507 の HDR 促進効果 (蛍光輝度の上昇) について明らかに有意差を認めることはできなかった。

考察

今回の assay system は 2 種類の plasmid を使用して比較的単純な方法となっている。しかしながら、正確な HDR の現象を再現するには、鑄型となる plasmid をもう 1 種類増やすことが必要である。また、今回用いた細胞は癌細胞由来であるが、報告された論文では薬剤スクリーニングにマウス ES 細胞株が使用されている。

本研究結果や以前の報告を吟味し、新たに鑄型 plasmid を作成し、3 種類の plasmid を使用した新しい assay system を再構築した。さらに使用する細胞として、ES 細胞に近いヒト iPS 細胞を用いることにした。遺伝子修復機構に関して、細胞によって少し異なる機序も示唆されており、NHEJ 経路や HDR 経路の促進および阻害についてその詳細な機序や化合物に関して更なるデータの蓄積や分析が必要である。

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 1 件)

2016 Nakamura, T., Campbell J.R., Moore A.R., Otsu S., Aikawa H., Tamamura H., and Mitsuya H. Development and validation of a cell-based assay system to assess human immunodeficiency virus type 1 integrase multimerization. *J. Virol. Methods.* 236, 196-206, 2016. 査読有り
DOI:10.1016/j.jviromet.2016.07.023

[学会発表] (計 3 件)

中村朋文, IN 多量体形成を促進する Non-catalytic site IN inhibitors (NCINIs) の耐性アミノ酸変異解析から得られた新しい知見、第 27 回 抗ウイルス療法学会 熊本 2017.5.18-20

Tomofumi Nakamura, Accumulation of amino acid substitutions against non-catalytic site HIV-1 integrase inhibitors alters assembly and stabilization of HIV-1 integrase, 18th.kumamoto AIDS seminar, kumamoto, 2017.10.30-11.1

中村朋文, Non-catalytic site integrase inhibitors (NCINIs) の耐性変異解析から得られた HIV-1 インテグラーゼ多量体形成プロファイル、第 31 回 日本エイズ学会 東京 2017.11.24-26

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況（計 0 件）
- 取得状況（計 0 件）

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中村朋文 (Nakamura Tomofumi)
熊本大学生命科学研究部・研究員
研究者番号：00772526

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

大津佐知子 (Otsu Sachiko)