

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 14 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22790436

研究課題名（和文）ZFP-LEDGF 融合タンパクを用いた LV ベクターの配列特異的挿入法の確立

研究課題名（英文）Development of the methods for site-specific integration of LV vector with novel ZFP-LEDGF fusion protein

研究代表者

近藤 麻美（井野 麻美）(KONDO ASAMI)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：30453046

研究成果の概要（和文）：レンチウイルス（LV）ベクターによる培養細胞への遺伝子導入は、細胞染色体への LV ベクターの挿入が必要だが、これにより宿主遺伝子への変異導入を伴うことがある。そこで LV ベクターの宿主染色体 DNA 配列特異的な挿入法の開発を試みた。LV ベクターの挿入に必須のタンパクに特異的 DNA 配列に結合可能なタンパクを融合させ、培養細胞において検討をおこなったが、標的部位付近への挿入を検出できなかった。

研究成果の概要（英文）：Although lentiviral (LV) vector genomic integration step is essential for gene expression, mutations are found in host genome accompanied with this step. This aim of project is to develop of the methods for site-specific integration of LV vector. I fused the essential protein for integration of LV vector and DNA binding domain which was designed to bind sequence specific DNA. I could not find the sequence-specific integration of LV vector with these fusion proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：生物

科研費の分科・細目：医歯薬、基礎医学、ウイルス学

キーワード：(1)レンチウイルスベクター、(2)配列特異的挿入、(3)遺伝子ノックアウト

1. 研究開始当初の背景

遺伝子ターゲティングは疾患モデルの作製及び遺伝子治療の手法として重要である。ヒト免疫不全ウイルス（HIV）を基盤としたレンチウイルス（LV）ベクターは分裂細胞及び非分裂細胞、どちらの細胞に対しても高い遺伝子

導入効率を有する。一方、その遺伝子発現にはウイルスゲノムの宿主染色体への挿入が必須であるが、その挿入サイトはランダムであり、導入遺伝子のサイレンシングや細胞の癌化などの問題もある。このステップには、ウイルスのコードするインテグラーゼ（IN）と

宿主由来のレンズ上皮由来成長因子 (LEDGF)/p75が結合することが必要である。LEDGF/p75がレンチウイルスのプレインテグレーション複合体を宿主クロマチンに係留することによって、宿主ゲノムへの挿入が誘導される。しかし、LEDGF/p75には塩基配列特異的な結合能がないため、レンチウイルスの挿入サイトはランダムになってしまう。そこで本研究では、塩基配列特異的に結合する亜鉛フィンガータンパクとLEDGF/p75の融合タンパク使用し、一般的なLVベクターの宿主ゲノム塩基配列特異的な挿入を可能とする手法を開発する。亜鉛フィンガーとは、転写因子に含まれるDNA結合ドメインで、1つの亜鉛フィンガーで3塩基を認識する。亜鉛フィンガーをコードするアミノ酸の置換により、どのような3塩基でも認識可能となることが報告されており、すでに確立された手法である。5個の亜鉛フィンガーの組み合わせにより、15塩基を特異的に認識する亜鉛フィンガータンパクを自由に設計することができる。一方、LEDGF/p75のインテグラーゼ結合ドメイン (IBD) とヒストンの融合タンパクの使用により、HIVの宿主ゲノムへの非特異的な挿入が報告された。

2. 研究の目的

本研究では、宿主染色体の配列特異的に一般的なレンチウイルスベクターを挿入可能な手法を開発する。この技術の応用によって、従来遺伝子ターゲティングが困難とされてきたヒトES/iPS細胞での高効率な部位特異的遺伝子ノックダウンが可能となり、疾患モデルの作製およびその詳細な解析が簡便かつ容易になると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 亜鉛フィンガー・IBD 融合遺伝子の作製

① 亜鉛フィンガー (ZFP) をコードする遺

伝子は、*Nat Biotechnol.* 2008, **26**, 808-816を参考とし、人工合成で作製した。これらの下流に LEDGF・IBD を導入し、1つの遺伝子として発現するよう、CA プロモーターを有するプラスミド pHMCA5 に導入した。

② LEDGF shRNA 発現プラスミドの作製
細胞側の LEDGF 発現を抑えるため、LEDGF mRNA の 3' non-coding region に対する shRNA を設計し、shRNA 発現プラスミド pshLEGF を作製した。

③ ピューロマイシン耐性遺伝子-GFP 発現 LV ベクターの作製

LV ベクタープラスミド CSII-CMV-MCS にピューロマイシン耐性遺伝子-IRES-GFP 遺伝子を導入し、pCAG-HIVgp 及び pCMV-VSV-G-RSV-Rev とともに 293T 細胞にトランスフェクションし、その培養上清より LV-puro-IRES-GFP を得た。

(2) AlphaScreen による ZFP・IBD の DNA 結合能の解析

(1) で作製した ZFP・IBD 融合タンパクの標的 DNA 結合能を検討するため、以下のような方法を用い検討した。

① ZFP・IBD 融合タンパクのコムギ無細胞系による合成

ZFP・IBD 融合遺伝子を PCR 法で増幅し、逆転写後 RNA を抽出し、コムギ胚芽抽出液を用いてタンパク合成した。なお、PCR 増幅時に FLAG tag を導入した。

② AlphaScreen を用いた ZFP・IBD の DNA 結合能の解析

上記で作製した FLAG-ZFP・IBD タンパクとその ZFP 標的配列を有し、5'末端をビオチン化したオリゴヌクレオチドを 384 プレートでインキュベート後、Alpha Beads と抗 FLAG 抗体を加え、さらにインキュベートした。この解析系は、DNA と ZFP-IBD タンパ

AlphaScreenを使用したZFP-IBDと標的オリゴの結合能測定法

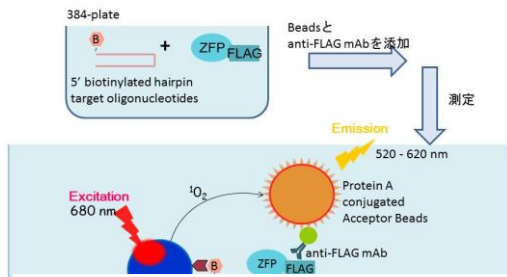


図1 AlphaScreenによるZFP・IBD融合タンパクの標的DNA結合能解析

クが結合したときにのみシグナルが検出される。

(3) 免疫染色

HIV IN 定常発現 293 細胞に DsRed タグを有する ZFP-IBD 発現プラスミドをトランスフェクションし、HIV IN との局在を免疫染色法によって検討した。

(4) レポーター細胞の作製

ZFP 結合領域をルシフェラーゼ遺伝子開始コドン直下に導入したルシフェラーゼレポーター系を細胞染色体上に 1 コピーのみ導入した HCT116-CCR5L2 細胞を作製した。この細胞は Flp-In system (Life Technologies) を使用して作製した。ZFP 結合サイト付近に LV ベクターが挿入された場合、ルシフェラーゼ活性が低下すると期待されるため、このようなレポーター系を作製した。また陰性コントロールとして、ZFP-IBD の結合配列を持たない HCT116-L2 細胞も同時に作製した。

(5) レポーター細胞を使用した検討

HCT116-CCR5L2 細胞とそのコントロール細胞として、HCT116-L2 細胞を使用して以下の検討をおこなった。各細胞に pshLEDGF および pZFP-IBD をトランスフェクション後 LV-puro-IRES-GFP を感染させた。LV ベクター感染後、ピューロマイシン含有培地で選択し、ピューロマイシン耐性となった細胞のルシフェラーゼアッセイ及

び DNA 抽出後 PCR をおこなった。

4. 研究成果

(1) AlphaScreen による ZFP・IBD の DNA 結合能の解析

ZFP-IBD 融合タンパクの DNA 結合能を検討したところ、signal/background (S/B)

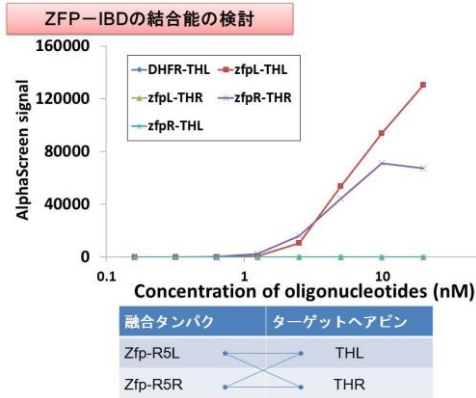


図2 ZFP-IBD 融合タンパク結合能の検討

比約 50 と強い結合がみられた (図2)。一方、一塩基置換したオリゴ DNA においてはバックグラウンドとほぼ同程度のシグナルが検出されるにとどまった。

(2) 免疫染色

HIV IN 定常発現 293 細胞に p DsRed-ZFP-IBD をトランスフェクションし、IV との局在を検討した。また、ネガティブコ

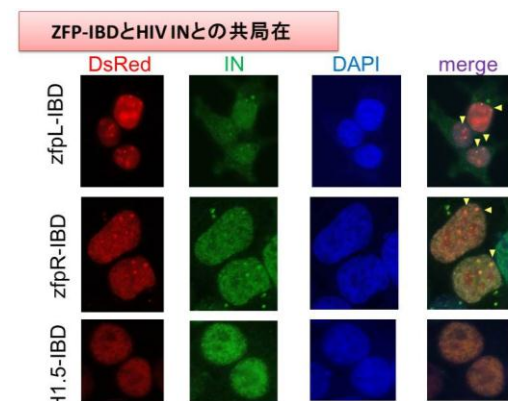


図3 免疫染色法による ZFP-IBD 融合タンパクの発現局在解析

ントロールとして、ZFP のかわりにヒストンタンパクのひとつである H1.5 を導入した

pDsRed-H1.5 を使用し検討した (図 3)

その結果、ZFP-IBD は核内に移行し、HIV IN と共局在し、foci を形成することが明らかとなった。

(3) レポーター細胞を使用した検討

本研究において作製した HCT116-CCR5L2 細胞と、HCT116-L2 細胞をコントロール細胞として使用し、LV-puro-IRSE-GFP の標的配列付近への挿入の有無を検討したが、標的配列付近への挿入を検出することはできなかった。

本検討では shRNA 及び遺伝子の導入方法として、プラスミドを使用しているが、LEDGF shRNA 定常発現細胞を使用し、ZFP-IBD 遺伝子の導入方法として Ad ベクターなどを使用するなど遺伝子の発現効率を上昇させることによって、標的配列付近への導入が検出される可能性があると考えられる。

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)

- ① 近藤 麻美、全自動タンパク質合成装置 (CellFree Science 社)、横浜医学、査読無、62 巻、2011、85-86

[学会発表] (計 1 件)

- ① 近藤 麻美、野村 渉、玉村 啓和、鈴木陽一、梁 明秀、亜鉛フィンガー-L E D G F 融合タンパクを用いた L V ベクターの配列特異的挿入法の開発の試み、第 58 回日本ウイルス学会 2010 年 11 月 9 日、徳島県郷土文化会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 麻美 (井野 麻美) (KONDO ASAMI)
横浜市立大学・医学部・助教
研究者番号：30453046

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：

(4) 研究協力者

梁 明秀 (RYO AKIHIDE)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号：20363814