

人工 DNA 結合タンパク質を用いた位置特異的な遺伝子挿入法の開発

(岡大院ヘルス) ○住友 美香・住川 達彦・王野 瀬里香・森 友明・森 光一・世良 貴史

Development of a site-specific gene insertion method using an artificial zinc-finger protein (Graduate School of Interdisciplinary Science and Engineering in Health Systems, Okayama University) ○Mika Sumitomo, Tatsuhiko Sumikawa, Serika Ohno, Tomoaki Mori, Koichi Mori, Takashi Sera

Retroviral vectors that can be adapted to dividing cells have often been used as gene therapy vectors, but past clinical trials have reported cases of leukemia due to undesirable activation of endogenous genes caused by unexpected insertion into specific genomic sites. Therefore, it is desirable to develop a technology that can introduce therapeutic genes into desired locations on the genome without affecting the expression of endogenous genes. We have devised a new method to insert a therapeutic gene into a target position on the genome by bring a therapeutic gene into spatial proximity to a target site on the genome using artificial zinc finger protein (AZP). In this system, we used Φ C31 integrase, which has been reported to cause efficient recombination reactions in human cells, as a gene insertion enzyme. We first tested this concept in an in vitro experiment. We used an acceptor DNA plasmid as a genomic DNA model and a donor DNA plasmid as a therapeutic gene model, and prepared tandem AZPs, in which two types of AZPs recognizing different 19 bp target DNAs on each plasmid were joined via a peptide linker. We succeeded in preferentially inserting the donor DNA into the target acceptor DNA by using tandem AZPs. The details of this study will be reported.

Keywords : Artificial zinc-finger protein; Site-specific insertion; Φ C31 integrase

遺伝子治療用ベクターとして、分裂細胞にも適応可能なレトロウイルスベクターがよく用いられてきたが、過去の臨床試験では特定のゲノム部位への予期せぬ挿入により内在性遺伝子が好ましくない活性化を受け白血病を発症した例が報告されている。そのため、内在性遺伝子の発現に影響を与えないように、治療遺伝子をゲノム上の望む場所に導入できる技術の開発が望まれている。我々は、ヒト細胞において効率的な組換え反応を起こすことが報告されている Φ C31 インテグラーゼを遺伝子挿入酵素として用い、人工ジンクフィンガータンパク質 (AZP) によりゲノム上の標的位置に治療遺伝子を空間的に近接させた上で挿入反応を起こさせる方法を考え出した。そこで、まずこのコンセプトを試験管内実験において検証した。すなわち、ゲノム DNA モデルとしてアクセプターDNA プラスミド、治療遺伝子モデルとしてドナーDNA プラスミドを用い、それぞれのプラスミド上の異なる 19 bp の標的 DNA を認識する 2 種類の AZP をペプチドリinkerを介して結合させたタンデム AZP を作製し、これらを用いて、標的アクセプターDNA へドナーDNA を優先的に挿入させることに成功した。その詳細について報告する。