

2. 人工 DNA 結合タンパク質及び人工ヌクレアーゼの ウイルス感染防御への応用： ウイルス耐病性植物および抗ウイルス剤の開発

世 良 貴 史

岡山大学大学院自然科学研究科化学生命工学専攻生体機能分子設計学分野

ウイルスは多種多様なものが存在し、ヒトおよび家畜・農作物に甚大な被害を与え続けているが、その被害は、抑制されるどころか、拡大の途をたどる一方である。そのため、効果的なウイルス対処法の開発が望まれている。ウイルスは体内に侵入しても増えなければ発病しないと考えられるので、我々はウイルスゲノム複製過程に着目し、人工タンパク質を用いて、ウイルス複製を阻害する手法を新たに開発した。まずは、ウイルスゲノムの複製の開始に必要な、ウイルス複製タンパク質のウイルスゲノム上の複製起点への結合を阻害できる人工 DNA 結合タンパク質を開発した。この遺伝子を植物個体および動物細胞に導入することにより、ウイルス複製を効果的に阻害し、植物個体ではウイルス耐病性を付与することに成功した。また、この人工タンパク質に細胞膜透過能を付与することにより、新たな抗ウイルスタンパク質製剤を創出した。さらに、人工 DNA 結合タンパク質に DNA 切断部位を融合することにより、ウイルスゲノムを特異的に切断する人工ヌクレアーゼを創出し、有機化合物よりも 10 万倍高い比活性を示す、より効果的な抗ウイルス剤を開発することに成功した。

1. はじめに

ウイルスは多種多様なものが存在し、昔からヒトおよび家畜・農作物に甚大な被害を与え続けてきた。国内に存在するウイルスによる感染だけでなく、国際化の進展に伴い、人的交流及び物的な移動が加速し、海外からのウイルスの侵入の頻度が増えてきており、その被害は、抑制されるどころか、拡大の一途をたどっている。

植物ウイルスは、様々な種類の農作物に感染し、その収穫量を大幅に減らしており、その感染の予防および拡大を防ぐことは食糧問題の上でも非常に重要な問題である。たとえば、植物 DNA ウイルスの中で大きなファミリーを形成するジェミニ・ウイルスは、アフリカではタバコカノ原

料となるキャッサバに対して 2000 億円以上の損害を与えている。アメリカ合衆国のフロリダ州のみでもウイルス感染によるトマトの被害だけで年間 140 億円の損失が報告されている。そのため、感染の被害を食い止める多種多様な試みがなされてきたが、いまだ効果的な手法は開発されていない。現在ブリーディングにより、ウイルス感染にある程度の抵抗性を有する農作物が作製され、市販されているが、ウイルスは完全には防除できず、感染後除去しなければそれ自体が感染源となる。また、ウイルスの媒体である昆虫の駆除は農薬で可能であるが、環境汚染の問題から、現在のもっとも現実的な対応は感染した植物を発見次第除去することであり、抜本的な解決策が望まれている。

ヒトに感染するウイルスでは、古くからインフルエンザウイルスやヒト免疫不全ウイルスなどの RNA ウイルスが医療上重要な標的ウイルスとなっている。最近では、アフリカで発生したエボラウイルスが、検査体制が整っているはずの欧米諸国で感染者が見つかり、国際化が進む現代では地球規模でのウイルスの広がりを食い止めることが非常に難しいことがわかってきた。DNA ウイルスでは、子宮頸がんの原因ウイルスであるヒトパピローマウイルスのワクチンが開発され若年層の子宮頸がん発症のリスクが軽減

連絡先

〒 700-8530

岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学大学院自然科学研究科化学生命工学専攻

TEL & FAX: 086-251-8194

E-mail: sera@cc.okayama-u.ac.jp

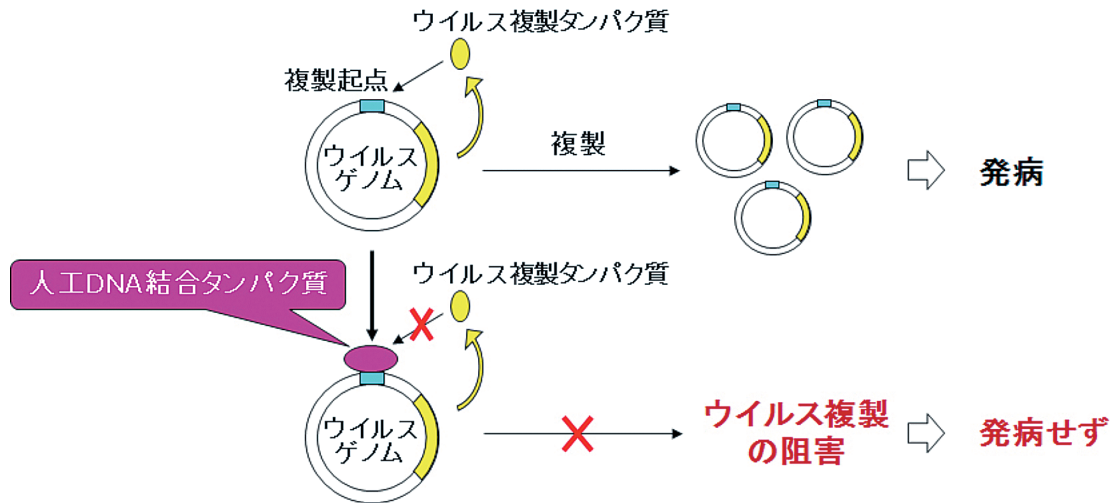


図1. 人工DNA結合タンパク質を用いたDNAウイルス複製の阻害. 人工DNA結合タンパク質により, ウイルスゲノム上の複製起点へのウイルス複製タンパク質の結合を阻害することにより, ウイルス複製を阻害する.

されると期待されたが, 全身痙攣などの重篤な後遺症の報告が最近相次ぎ, 社会問題化している. このように, ヒトにおいても, 効果的なウイルス対処法の開発が急務となっている.

2. DNAウイルスの複製

DNAウイルスは, ゲノムとしてDNAを保持し, その複製メカニズムは, 基本的に植物および動物・ヒトで保存されている. すなわち, ウイルスの体内への侵入後, 最終的に核に到達した後, 脱殻されたウイルスゲノムDNAから転写・翻訳されたウイルス複製タンパク質が, ウイルスゲノム上の複製起点に結合することにより, ウイルスゲノムDNAの複製を開始させる(図1). 最終的にウイルスが増殖することにより, 感染した生物はウイルス病を発症するので, もしこのウイルス複製タンパク質のウイルスゲノム上の複製起点への結合を何らかの方法で阻害することができれば, たとえウイルスが体内に侵入しても, ウイルスは複製できず増殖できないため, ウイルス感染を防ぐことが可能になると考えられる(図1).

3. 人工DNA結合タンパク質の開発

我々は, 真核生物の転写因子のDNA結合部位に見出される亜鉛フィンガーというDNA結合タンパク質を基にして, 生体内でゲノム上の望みのDNA配列を認識できる, 人工DNA結合タンパク質(図2)の合理的分子設計アプローチによるデザインおよび創出法を開発した¹⁾. 植物・ヒトを含めた様々な生物内で, ゲノムDNA上のある特定の配列を認識できる人工のタンパク質を自由にデザインできれば, 遺伝子発現をはじめ, 染色体DNAが関与する多

種多様な生命現象を人為的に, しかも生体とは独立にコントロールできるようになるからである. 我々は, 本総説で紹介するウイルスへの応用だけでなく, この人工DNA結合タンパク質に転写調節ドメインを連結させた「人工転写因子」やDNA切断ドメインを連結させた「人工ヌクレアーゼ」を開発し, 植物およびヒト培養細胞内の標的遺伝子の発現制御や位置特異的なDNA切断等にも成功している^{2,4)}.

鋳型として亜鉛フィンガータンパク質を用いた理由は, 1) モノマーとしてDNAに結合し, 2) 分子内にフィンガードメインを多数有し, 長いDNA配列を認識できることから, 非回文配列が多く見られるゲノム上のDNA配列の特異的な認識に適し, かつ3) ひとつのアミノ酸がひとつの核酸塩基を他のアミノ酸残基とは比較的独立に認識していることから, その特異性を変えることが比較的容易と考えられるからである. 我々は, 今まで報告されてきたタンパク質・DNA複合体に見られるアミノ酸-核酸の認識パターンおよびアミノ酸と核酸塩基の化学的な性質等に基づき, 新たに「DNA認識コード表」を開発した¹⁾. このコード表の特徴は, 亜鉛フィンガードメイン中の特定の場所の特定の塩基の認識に1個のアミノ酸を割り当てたことである. 従って, この表を用いることにより, 標的DNA配列さえ決めれば, 一義的に認識アミノ酸セット, すなわち各亜鉛フィンガードメインをデザインでき, それらドメインを連結することにより人工DNA結合タンパク質(図2)を創出することが可能となる. 我々は, この手法によりデザインされた人工DNA結合タンパク質が, 標的DNA配列に非常に高い結合能(例えば, 3 pM以下の解離定数)を有し, かつ生細胞において, 1, 2塩基の違いを識別できることをすでに報告している^{5,6)}.

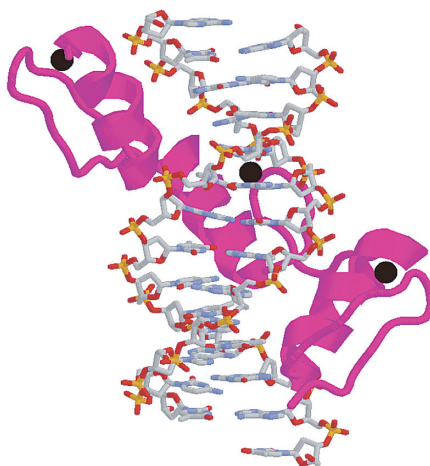


図2. 人工 DNA 結合タンパク質. この図では, 3 個の亜鉛フィンガーを有する人工タンパク質を紐とりボンで示している. 黒色の丸は, 亜鉛を示す.

4. ウイルス耐性植物の創出

そこで, この人工 DNA 結合タンパク質を用いて, ウイルス複製タンパク質の, ウイルスゲノム上の複製起点への結合を阻害することにより, ウイルスの増殖を防ぎ, ウイルスが侵入してきても感染しない植物を創出できるかどうかを検証した⁷⁾. このアプローチの利点の一つは, 耐性ウイルスの出現の可能性が従来の手法と比べて格段に低いと考えられる点である. 人工 DNA 結合タンパク質による複製阻害を無力化するには, 人工 DNA 結合タンパク質の標的サイト, すなわちウイルス複製タンパク質の結合サイトに変異が導入され, かつ変異された結合サイトに結合できるようウイルス複製タンパク質にも変異が同時に導入されねばならず, そのような同期した変異が起きる確率は極めて低いと考えられるからである.

この場合, 植物として, 実験室でよく用いられているシロイヌナズナを選び, DNA ウイルスとして, シロイヌナズナをはじめ様々な植物に強く感染し枯死させることが知られている Beet severe curly top virus (BSCTV) を用いた. この研究では, 上述のデザイン法を用いて, BSCTV のウイルス複製タンパク質よりも 1000 倍以上強い DNA 結合能を有する人工 DNA 結合タンパク質を作製した. この人工 DNA 結合タンパク質は, ウイルス複製タンパク質の BSCTV 複製起点への結合をたった 1000 分の 1 の量で効果的に阻害できることを試験管内で確認した.

次に, この人工 DNA 結合タンパク質遺伝子を, 植物に侵入できる菌であるアグロバクテリアを用いてシロイヌナズナの生殖細胞に組み込み, 最終的に人工 DNA 結合タンパク質を発現する組換え植物を作製した. この組換え植物および野生型植物に BSCTV を接種したところ, 図3の植物2で示されているように, 野生型のシロイヌナズナは感

染し, すでに報告されているとおり茎の成長が停止し, 接種後4週間目には枯死していた. これに対し, 人工 DNA 結合タンパク質遺伝子を発現するシロイヌナズナ (たとえば, 図3の植物3) では, 感染させていない健康な野生型植物 (図3の植物1) と全く同じ外観で感染症状は見られなかった. さらに, これら組換え植物では, ウイルスは侵入しているにもかかわらずウイルス複製が阻害されているため, サザンブロット法においてウイルス DNA は全く検出されなかった. このように, 人工 DNA 結合タンパク質を用いてウイルス複製タンパク質の結合をブロックすることにより, DNA ウイルスに対する免疫性を植物に付与することに初めて成功した. また, 本手法が, 世界的に重要な野菜であるトマトに感染し問題となっている Tomato yellow leaf curl virus にも有効であることを確認している⁸⁾.

5. ヒト DNA ウイルスの複製阻害

前項で述べたように, 人工 DNA 結合タンパク質を用いて, ウイルス複製阻害することが可能なことを植物個体で実証した. 基本的に植物もヒトも DNA ウイルスの複製メカニズムは保存されているので, 次に本技術をヒト DNA ウイルスであるヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) に適用することとした. HPV は, 子宮頸がんの原因ウイルスであり, 医療上重要な標的ウイルスの一つである. 2009 年に HPV のワクチンが開発され, 日本でも接種が始まったが, 近年報道等でも伝えられているように, 全身痙攣のような重篤な副作用が報告されて社会問題化しており, ワクチンとは異なる作用メカニズムで働く HPV 感染予防法の開発が必要である.

そこで, 我々は, HPV 複製タンパク質の機能阻害を試みた⁵⁾. HPV には, ウイルス複製タンパク質として, E1 および E2 タンパク質が知られている. まず, E2 タンパ



図3. 人工 DNA 結合タンパク質によるウイルス感染耐病性の付与. 野生型植物に BSCTV を感染させると枯死した (植物2). これに対し, 人工 DNA 結合タンパク質を発現する植物は, BSCTV 感染に対して耐病性を示した (植物3 および4). 植物1は, ウイルスを接種していない, 健康な野生型の植物を示す.

ク質がウイルスゲノムに結合し, 結合した E2 タンパク質が, ヘリカーゼ活性を有する E1 タンパク質を複製起点にリクルートし, ウイルス複製が開始される. そのため, 我々は, E2 タンパク質の複製起点への結合を阻害できれば, E1 タンパク質が複製起点に結合できず, 結果的にウイルス複製は開始されないと考えた.

そこで, E2 タンパク質の結合サイトに結合する人工 DNA 結合タンパク質をデザインし, 大腸菌で発現・精製した. ゲルシフト・アッセイで解離定数を求めたところ, 10 pM であり, 標的の E2 タンパク質より 1000 倍以上結合能が高いことが分かった.

次に, この人工 DNA 結合タンパク質遺伝子を過渡的 HPV 複製系に導入し, ウイルス複製量をサザン・ブロット法により解析した. この過渡的 HPV 複製系は, 複製起点領域を含むプラスミドを E1 および E2 タンパク質発現プラスミドと共に動物細胞に導入することにより, 過渡的に HPV の DNA 複製を再現する. この複製系に人工 DNA 結合タンパク質発現プラスミドを導入したところ, 3 日後には約 90% 複製を阻害できることがわかった. さらに, 複製起点に変異を入れた過渡的 HPV 複製系を用いた実験により, 作製した人工 DNA 結合タンパク質は, 1, 2 塩基の違いを細胞内で識別できる特異性を有していることも明らかにした.

6. 抗 HPV タンパク質製剤の開発

次に, 我々は, 上記の手法に基づく, 新たな抗ウイルス

剤を開発した⁹⁾. すなわち, 上記の人工 DNA 結合タンパク質に 9 個の Arg からなるペプチド¹⁰⁾を付加することにより, 細胞膜透過能を付与した人工タンパク質を創出した (図4). この人工タンパク質を, 上述の過渡的 HPV 複製系に添加したところ, タンパク質濃度依存的に複製抑制効果が見られ, 250 nM という非常に低い濃度でこの人工タンパク質が HPV の DNA 複製をほぼ阻害できることを確認した. また, このタンパク質は, 10 μ M という高濃度で添加しても, 細胞毒性はほとんど見られなかった. これら実験より算出した IC₅₀ および EC₅₀ から比活性を求めると, >300 であった. HPV に対する抗ウイルス剤はほとんど報告がなく, われわれが調べた限りでは, サイトメガロウイルス用に開発された抗ウイルス剤 Cidofovia を用いた研究しか報告がなく, その比活性は 15~42 であり¹¹⁾, 我々が開発した人工タンパク質は, 有機化合物よりも 10 倍以上活性の高いことが分かった.

7. 人工ヌクレアーゼによる HPV 複製の阻害

さらに, 我々は, 上記の抗ウイルス剤の改善を目指した. 人工 DNA 結合タンパク質によるウイルス複製タンパク質の複製起点への結合阻害は, 植物個体および動物細胞で有効であることを実証できたが, この手法を適用するには, あらかじめウイルス複製メカニズムが明らかとなっている必要がある. 少なくとも, どの遺伝子がウイルス複製タンパク質で, そのタンパク質の複製起点上の結合サイトの DNA 配列が明らかとなっている必要があり, 新種のウイ

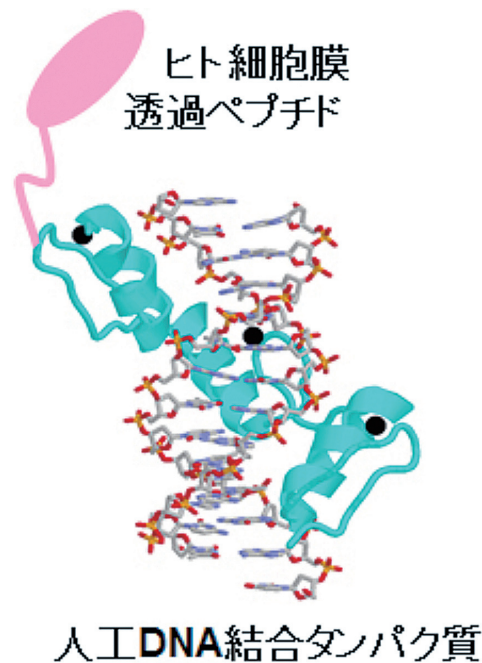


図 4. 新しい抗ウイルスタンパク質製剤. この例では, ウイルス複製を阻害する人工 DNA 結合タンパク質にヒト細胞膜透過ペプチドを融合させている. この図では示していないが, この抗ウイルス剤には核移行シグナルペプチドも連結させているため, このタンパク質を添加すると, ヒト細胞膜, 続いて核膜を透過して, ウイルスの複製を阻害する. 人工ヌクレアーゼに基づく抗ウイルスタンパク質製剤の場合には, 上記のタンパク質にさらに DNA 切断ドメインが連結される (図 5 を参照).

ルスに迅速に対応することが容易ではない. ウイルスの DNA 配列の解析は容易であり, 標的のウイルスの部分的な塩基配列 (19 塩基以上) がわかりさえすれば対応できるよう, 我々は人工ヌクレアーゼを用いることとした^{6, 12)}. すなわち, ウイルスゲノムを認識できる人工 DNA 結合タンパク質に DNA 切断酵素を融合させたものである. この利点は, ウイルス複製メカニズムが全く分からなくても, ウイルスゲノムの一部の配列 (19 塩基対以上) さえわかれば人工ヌクレアーゼの開発が可能であり, 新種のウイルスにも迅速に対応できる点である.

このコンセプトをすでにアッセイ系が当研究室で確立されている HPV で実証することとした. 最初の実験では, HPV に特異的に結合する人工 DNA 結合タンパク質 (ただし, それ単独ではウイルス阻害能が低いもの) に DNA 切断酵素の staphylococcal nuclease を連結した. この酵素を用いた理由は, 単量体で DNA を切断できるからである. この人工ヌクレアーゼ発現プラスミドを上述の過渡的 HPV 複製系に導入すると, 3 日後にはコントロールの複製量の 4% にまで複製を阻害できることがわかった. 複製起点に変異を入れた過渡的 HPV 複製系を用いた実験により, 作製した人工 DNA 結合タンパク質は, 1, 2 塩基の違いを細胞内で識別できる特異性を有していることも確認した. さらに, linker-mediated PCR 法により, この人工ヌクレ

アーゼは, 動物細胞内で標的サイトの DNA を特異的に切断していることも明らかにした.

この人工ヌクレアーゼで危惧される点は, ランダムに標的以外のヒトゲノムを切断することによる細胞毒性である. まず, MTT アッセイにより, この人工ヌクレアーゼが細胞毒性を与えないことはまず確認した. 次に, ウイルス複製阻害実験に用いた細胞を 3 世代継代した. もし, 人工ヌクレアーゼによりゲノムに傷が入っていれば, 細胞の増殖スピードなどに影響が出ることが考えられるが, 本実験ではそのような副作用は見られなかった. 今後, ゲノムに変異が導入されていないかどうかを全ゲノム配列解析により塩基レベルで検証する必要があると思われる.

8. 人工ヌクレアーゼに基づく抗 HPV タンパク質製剤の開発

項目 6 で述べた細胞膜透過性の付与を人工ヌクレアーゼ (図 5) に施した⁶⁾. この人工タンパク質を, 上述の過渡的 HPV 複製系に添加したところ, タンパク質濃度依存的に複製抑制効果が見られ, 80 pM という非常に低い濃度でこの人工タンパク質が HPV DNA 複製をほぼ阻害できることを確認した. また, このタンパク質を 1 μ M で添加しても, 細胞毒性はほとんど見られなかった. この細胞膜透過能を有する人工ヌクレアーゼの比活性は $>5 \times 10^6$ であり,

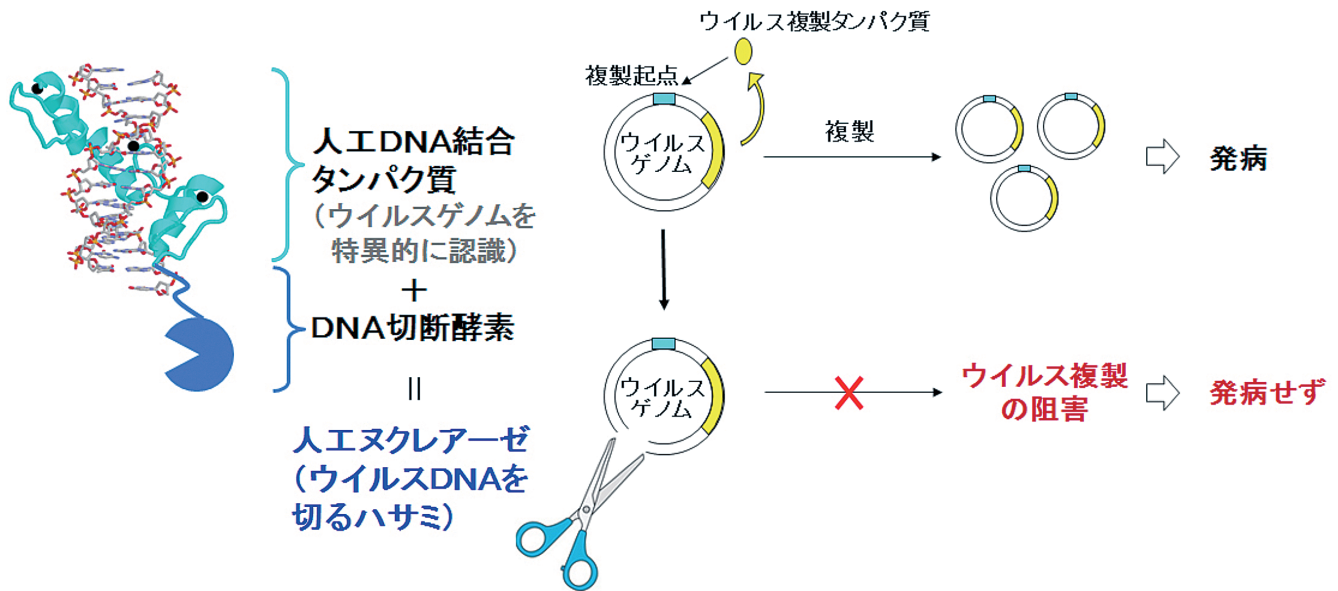


図5. 人工ヌクレアーゼを用いたDNAウイルス複製の阻害. ウイルスゲノムを特異的に認識する人工DNA結合タンパク質にDNA切断酵素を融合した人工ヌクレアーゼを用いてウイルスゲノムを特異的に切断することにより, ウイルス複製を阻害する. 図では省略しているが, 人工ヌクレアーゼには核移行シグナルを連結してある. この人工ヌクレアーゼをタンパク質として導入する場合には, 図4に示してあるように, ヒト細胞膜透過ペプチドを融合させる.

DNA切断酵素を有しない以前の人工タンパク質よりも1万倍複製阻害活性が上昇した. また, Cidofoviaよりも10万倍以上活性の高いことが分かった. この抗ウイルスタンパク質製剤は, 細胞毒性もほとんどないことから, 新しい抗ウイルス剤としての応用が期待される.

9. おわりに

以上, ウイルス防除に関して, 我々の研究室で開発した2つの手法を紹介させていただいた. 一つ目は, DNAウイルスの複製メカニズムに基づいた, 人工DNA結合タンパク質による複製の阻害と, 二つ目は, そのメカニズムが不明でもウイルスゲノム配列さえわかれば複製を阻害できるよう, 人工ヌクレアーゼを用いた手法である. 現在, これらの技術の汎用性を高めるため, さらなる改良を行なっているところである. 植物に関しては, 食糧増産に資するため, 穀物へ応用し, 安全性も含めて, 社会実装へ向けた研究を行なっている.

ウイルスとして, RNAをゲノムとして有するウイルスがより多く存在している. 植物では世界で1兆円以上の被害を出しているプラムボックウイルスや, 動物ではインフルエンザウイルスやヒト免疫不全ウイルス, 最近アフリカを中心に猛威を振るって大問題となっているエボラウイルスがRNAウイルスである. 農林水産省のご支援(競争的研究資金:「革新的技術創造促進事業(異分野融合共同研究)」¹³⁾の「理学・工学との連携による革新的ウイルス

対策技術の開発」分野)のもと, 今後対象ウイルスをRNAウイルスへ拡大していく予定である.

参考文献

- 1) Sera T, Uranga C.: Rational design of artificial zinc-finger proteins using a nondegenerate recognition code table. *Biochemistry* 41:7074-7081, 2002.
- 2) Tachikawa K, Schröder O, Frey G, Briggs SP, Sera T.: Regulation of the endogenous VEGF-A gene by exogenous designed regulatory proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15225-15230, 2004.
- 3) Mineta Y, Okamoto T, Takenaka K, Doi N, Aoyama Y, Sera T.: Enhanced cleavage of double-stranded DNA by artificial zinc-finger nuclease sandwiched between two zinc-finger proteins. *Biochemistry* 47:12257-12259, 2008.
- 4) Mino T, Aoyama Y, Sera T.: Efficient double-stranded DNA cleavage by artificial zinc-finger nucleases composed of one zinc-finger protein and a single-chain FokI dimer. *J Biotechnol* 140:156-161, 2009.
- 5) Mino T, Hatono T, Matsumoto N, Mori T, Mineta Y, Aoyama Y, Sera T.: Inhibition of DNA replication of human papillomavirus by artificial zinc-finger proteins. *J Virol* 80:5405-5412, 2006.
- 6) Mino T, Mori T, Aoyama Y, Sera T.: Gene- and protein-delivered zinc finger-staphylococcal nuclease hybrid for inhibition of DNA replication of human papillomavirus. *PLOS ONE* 8: e56633, 2013.
- 7) Sera T.: Inhibition of virus DNA replication by artificial zinc-finger proteins. *J Virol* 79:2614-2619, 2005.

- 8) Mori T, Takenaka K, Domoto F, Aoyama Y, Sera T.: Inhibition of binding of Tomato yellow leaf curl virus Rep to its replication origin by artificial zinc-finger protein. *Mol Biotechnol* 54:198-203, 2013.
- 9) Mino T, Mori T, Aoyama Y, Sera T.: Cell-permeable artificial zinc-finger proteins as potent antiviral drugs for human papillomaviruses. *Arch Virol* 153:1291-1298, 2008.
- 10) Wener PA, Mitchell DJ, Pattabiraman K, Pelkey KT, Steinman L, Rothbard JB.: The design, synthesis, and evaluation of molecular that enable or enhance cellular uptake: Peptoid molecular transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13003-13008, 2000.
- 11) Andrei G, Snoeck R, Piette J, Delvenne P, De Clercq E.: Antiproliferative effects of acyclic nucleoside phosphonates on human papillomavirus (HPV)-harboring cell lines compared with HPV-negative cell lines. *Oncol Res* 10:523-531, 1998.
- 12) Mino T, Mori T, Aoyama Y, Sera T.: Inhibition of DNA replication of human papillomavirus by using zinc finger-single chain FokI dimer hybrid. *Mol Biotechnol* 56:731-737, 2014.
- 13) <http://www.naro.affrc.go.jp/brain/ibunyakyodo/news/2014/053183.html>

Application of artificial DNA-binding proteins and artificial nucleases to prevention of virus infection: development of virus-resistant plants and protein-based anti-viral drugs

Takashi SERA

Department of Applied Chemistry and Biotechnology, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University

Various DNA viruses are known to cause severe infectious diseases in both plants and mammals, including humans. For many of these infectious diseases, we have yet to find an effective prevention or treatment. Therefore, new methodologies for the prevention of virus infections in both agricultural crops and humans have been vigorously sought for a long time. One attractive approach to the prevention is inhibition of virus replication. We first inhibited virus replication by blocking binding of a viral replication protein, which initiates virus replication, to its replication origin, with using an artificial DNA-binding protein. We demonstrated that this new methodology was very effective in plants and mammalian cells: especially, we created transgenic plants that were immune to a geminivirus. We also developed novel protein-based antiviral drugs by fusing a cell-penetrating peptide to an artificial DNA-binding protein. Furthermore, we successfully generated a more effective protein-based antiviral, which was one hundred thousand times more active than the antiviral chemical drug Cidofovia, by alternatively fusing an DNA-cleaving enzyme to an artificial DNA-binding protein. Since this artificial protein has little cytotoxicity, it is expected that it will be used as a new antiviral drug.

