

【目的】ヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (HTLV-1) は、成人 T 細胞白血病や HTLV-1 関連脊髄症などの難病を引き起こすレトロウイルスである。HTLV-1 に感染すると、ウイルス由来の遺伝子 (プロウイルスゲノム) が宿主 DNA に組み込まれるため、HTLV-1 が半永久的に産出される。現在、HTLV-1 感染性疾患に対する治療法として、複数種の抗がん剤を組み合わせた多剤併用療法が適用されているが、その効果は一過性であり、根治には至らない。そこで我々は、2 重鎖 DNA に対して配列特異的に結合する 3 重鎖形成核酸が、DNA の複製過程を阻害することで二重鎖切断 (double-strand break : DSB) を誘導する現象に着目した。本研究では、この現象に着目し、光応答性分子であるソラレンを導入した 3 重鎖形成核酸 (Light-Scissors) を設計・合成し、ゲノム DNA に対する光架橋効率ならびに DSB 誘導能を検証・最適化することで、光をトリガーとした新規ゲノム編集技術を開発し、プロウイルス遺伝子のノックアウト (無効化) と HTLV-1 感染性疾患の根治を目指す。具体的には、Light-Scissors を用いた『人為的ゲノム DNA 損傷』の作製、それに続く DSB の誘導、DSB 修復機構によるゲノム編集の誘導を目指す。本法より、外来タンパク質酵素を用いず、DNA 切断配列に制限の無いゲノム編集技術の実現が可能となる。さらには、その時空間的制御技術を *in vivo* で可能にする光照射技術を開発することに挑戦する。

【方法】ソラレンは DNA 中のピリミジン塩基と架橋する性質を持つ。このため、まず、DNA 中のチミン塩基に対する架橋選択性を向上させるため、ソラレンをアデノシン糖環 2' 位に導入するリンカーの化学構造に着目し、従来型の柔軟なエトキシメチレンリンカーに代わり、比較的剛直なアミドメチレンリンカーを採用した新しいヌクレオシドの開発を行った。次に、HTLV-1 プロウイルス遺伝子の無効化効率の迅速アッセイ系の構築ならびに Light-Scissors の機能評価を行った。実験系として、HTLV-1 のプロモーター下流にホタルルシフェラーゼならびにオワンクラゲルシフェラーゼ遺伝子をコードするプラスミドを構築し、293FT (ヒト胎児腎臓細胞) にトランスフェクション後、トランスフォーマントを樹立した。

【結果】まず、合成した Light-Scissors と標的 DNA あるいは RNA とを混合し、それぞれの架橋効率を評価した。その結果、Light-Scissors は一塩基の違いをも認識して標的 DNA 特異的に架橋する性質を持つことが見出された。次に、上述の迅速アッセイ系で Light-Scissors のゲノム編集効率を評価した。我々が樹立した細胞系では、HTLV-1 プロモーター遺伝子に DSB が起こり、ホタルルシフェラーゼ遺伝子の 1 部が欠損して、ゲノム DNA 配列が組変わると、オワンクラゲルシフェラーゼ遺伝子が発現するシステムとして機能する (細胞樹立後、CRISPR/Cas9 システムを用いてコントロール実験を行うことで想定した系が動くことを確認している)。この系を用いて合成した Light-Scissors のゲノム編集効率を評価したところ、光照射を行った系にのみ、ホタルルシフェラーゼ活性が減少し、オワンクラゲルシフェラーゼ活性が上昇することが確認された。以上の結果より、Light-Scissors がゲノム DNA 中の HTLV-1 プロモーター遺伝子に結合した後、細胞内の遺伝子修復機構が働くことによって DSB が起こり、ゲノム編集が誘起されることが示された。

開発した Light-Scissors と標的 DNA/RNA の架橋効率の評価

