

平成27年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書
〔追跡評価用〕

平成27年4月20日現在

研究代表者 氏名	小宮山 眞	所属研究機関・ 部局・職 (研究期間終了時)	東京大学・先端科学技術研究センター・教授
研究課題名	スーパー制限酵素による巨大DNAの遺伝子操作		
課題番号	18001001		
研究組織 (研究期間終了時)	研究代表者 小宮山 眞（東京大学・先端科学技術研究センター・教授） 研究分担者 浅沼 浩之（名古屋大学・大学院工学系研究科・教授） 須磨岡 淳（東京大学・先端科学技術研究センター・講師）		

【補助金交付額】

年度	直接経費
平成18年度	87,300 千円
平成19年度	61,100 千円
平成20年度	61,100 千円
平成21年度	61,100 千円
総計	270,600 千円

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか

特別推進研究によってなされた研究が、どのように発展しているか、次の(1)～(4)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究の概要

(研究期間終了後における研究の実施状況及び研究の発展過程がわかるような具体的内容を記述してください。)

本特別推進研究では、巨大DNAを望みの位置で選択的に切断する人工ツールを開発し、これを巨大DNAの組み換えに適用してマニピュレーションすることを目標とした。採択時点において、(i)合成核酸であるPNAを切断ターゲット箇所にインベージョンさせて1本鎖構造にし、(ii)所定場所に形成した1本鎖部分をDNA切断触媒Ce(IV)/EDTA(1本鎖特異的)で切断することに世界に先駆けて成功していた。本研究では、このツールによるDNA切断の実用の可能性を追究するとともに、ゲノム組み換え工学を創生することを目指した。まず、このツールにより、実際に、ヒトゲノムを所定位置で選択的に切断できることを、Southern blotting法により実証した。ミスマッチ認識能は極めて高く、例えば、20塩基対の中の1、2塩基対が異なるだけでも、切断は全く起こらない。ヒトゲノム中にはターゲットと類似した配列が多数存在するが、このツールは、これらの微小な差異を厳密に見分けて、ターゲット部位だけを選択的に切断できる。ヒトゲノムを選択的に切断する化学ツールはそれまでには開発例がなく、我々のスーパー制限酵素が唯一の成功例である。また、スーパー制限酵素の高い配列認識能がPNAのインベージョン過程に起因すること、すなわち、ミスマッチがある場合にはインベージョンが起きず、そのために切断が起きないことを証明した。さらに、選択的切断で調製したDNA断片と他の切断断片や合成DNAとを、酵素リガーゼを用いて結合することに成功した。こうして、スーパー制限酵素が、巨大DNAの操作ツールとして極めて高いポテンシャルを持つことを実証した。一方、この化学ツールが、ヒト細胞内で、十分な機能を発揮することも明らかにした。すなわち、これを使ってヒト細胞中でゲノムの所定位置を切断し、別箇に細胞に導入したドナー断片(所定部位近傍と相同的な配列を持つDNA小断片)との間で相同組み換えを起こさせることに成功した。

以上の成果に基づいて、さらなる研究の発展を図るために、当該特別推進研究の第4年度が終了した時点で、これをさらに発展させた形態での特別推進研究“スーパー制限酵素を用いたゲノム・マニピュレーション工学の創成”を申請し、幸いなことにこれを採択していただいた。この特別推進研究では、それまでに開発したスーパー制限酵素の機能ならびに応用手法をさらに展開し、ゲノム・マニピュレーション法を完成することを目標とした。まず、ヒトゲノムの選択的切断が、広範な内在性遺伝子を所定位置で選択的に切断できることをSouthern blotting法により確認した。さらに、このゲノム切断法を用いて、ヒト細胞中の個々の染色体のテロメアの長さを決定した。テロメアは細胞分裂や細胞死を左右する“細胞内時計”であり、ガン、老化などと関連するために大いに注目されている。しかし、汎用のテロメア長決定法では、全ての染色体の末端のテロメアの長さが重ね合わせとして検出されるのみである。我々は、“細胞中のすべての染色体のテロメアの長さは同一か?”という基本的な疑問を持った。この課題は、すでに他の研究者によって指摘されてはいたが、個々の染色体のテロメアを入手する手法がないために明確な解答が得られないままであった。そこで、我々は、スーパー制限酵素を使って、テロメアの連続配列が終了した部分(この部分の配列はそれぞれの染色体により異なる)を染色体ごとに別個に選択的に切断して、対応する染色体のテロメアを切り出した。この部分の塩基配列はそれぞれの染色体に固有であるので、それぞれに対応したスーパー制限酵素を用いることにより、異なる染色体のテロメアを選択的に取得することが出来る。これらのテロメアの長さをゲル電気泳動で測定したところ、「ヒトの細胞中のテロメアの長さは、染色体によりそれぞれ異なる」という非常に興味深い事象を発見した。すなわち、同一数の細胞分裂を経ているにもかかわらず、染色体によりテロメアの長さが異なるという結果が得られたわけであり、細胞寿命とテロメア長との相関に関する概念そのものを変える可能性が示唆された。これ以外にも、スーパー制限酵素なしでは得られない種々の重要なゲノム情報を入手することができた。生命科学の重要課題に対してスーパー制限酵素という強力な武器を提示できたわけであり、さらに広範な目的にも有用であることは確実である。

また、スーパー制限酵素を使ってヒト細胞内での相同組み換えを促進することに成功した。まずヒトゲノム中にBFP(青色蛍光タンパク質)の遺伝子を導入しておき、ここにスーパー制限酵素とGFP(緑色蛍光タンパク質)遺伝子を含むドナー断片とを導入した。すると、細胞内で相同組み換えが起こり、BFP由来の青色蛍光を発光していた細胞が、GFP由来の緑色蛍光を発するように改造された。こうして、ヒト細胞内で、スーパー制限酵素によりゲノム中のBFPの所定位置が選択的に切断され、ドナー断片中のGFP遺伝子との間で相同組み換えが顕著に進行することを確認した。さらに、これらの研究の過程で、スーパー制限酵素を改良する必要が生じたので、これについても追究し、さらに効率的かつ選択的なニュー・ツールの開発に成功した。例えば、核局在タンパク質をPNAに結合すると、PNAが細胞内の核に積極的に輸送されるとともに、ゲノムの所定位置へのインベージョン能が飛躍的に高まる。このような化学修飾を加えても、配列認識能(すなわちミスマッチ認識能)は損なわれることがない。実際に、これらのスーパー制限酵素をエレクトロポレーション法によりヒト細胞内に導入し、この化学ツールがヒト細胞内で有効に機能することを明らかにした。

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(2) 論文発表、国際会議等への招待講演における発表など（研究の発展過程でなされた研究成果の発表状況を記述してください。）

原著論文

- 1) Click-conjugation of binuclear terbium(III) complex for real-time visualization of tyrosine phosphorylation. H. Akiba, J. Sumaoka, K. Tsumoto, and M. Komiyama, *Anal. Chem.*, DOI: 10.1021/ac5045466. (2015)
- 2) Clipping of Telomere from Human Chromosomes using Chemistry-based Artificial Restriction DNA Cutter. T. Ishizuka, Y. Xu, and M. Komiyama, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, **61**, 6.13.1-6.13.13. (2015)
- 3) Promotion of Double-Duplex Invasion of Peptide Nucleic Acids through Conjugation with Nuclear Localization Signal Peptide. Y. Aiba, Y. Honda and M. Komiyama, *Chemistry*, **21**, 4021-4026 (2015)
- 4) Molecular Crowding Facilitates Double-duplex Invasion of Pseudo-complementary Peptide Nucleic Acid in High-salt Medium. J. Sumaoka and M. Komiyama, *Chem. Lett.*, **43**, 1581-1583 (2014)
- 5) Finding a human telomere DNA-RNA hybrid G-quadruplex formed by human telomeric 6-mer RNA and 16-mer DNA using click chemistry: a protective structure for telomere end. Y. Xu, Y. Suzuki, T. Ishizuka, CD. Xiao, X. Liu, T. Hayashi, and M. Komiyama, *Bioorg. Med. Chem.*, **22**, 4419-4421 (2014)
- 6) Clipping of predetermined fragments from the human genome by S1 nuclease-PNA combinations. X. Li, S. Muneoka, N. Shigi, J. Sumaoka and M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **50**, 8674-8676 (2014)
- 7) Thiazole orange-conjugated peptide nucleic acid for fluorescent detection of specific DNA sequences and site-selective photodamage. M. Tanaka, N. Shigi, J. Sumaoka and M. Komiyama, *RSC Adv.* **4**, 2957-2964 (2014)
- 8) Orthogonal enzyme arrays on a DNA origami scaffold bearing size-tunable wells. T. Yamazaki, J. G. Heddle, A. Kuzuya, and M. Komiyama, *Nanoscale*, **6**, 9122-9126 (2014).
- 9) Conjugation-free, visual, and quantitative evaluation of inhibitors on protein tyrosine kinases and phosphatases with a luminescent Tb(III) complex. H. Akiba, J. Sumaoka, T. Hamakubo, and M. Komiyama, *Anal. Bioanal. Chem.*, **406**, 2957-2964 (2014).
- 10) Conjugation of Peptide Nucleic Acid with a Pyrrole/Imidazole Polyamide to Specifically Recognize and Cleave DNA. W. Kameshima, T. Ishizuka, M. Minoshima, M. Yamamoto, H. Sugiyama, Y. Xu and M. Komiyama, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **52**, 13681-13684 (2013)
- 11) Site-selective Scission of Double-stranded DNA by Combining a Triplex-forming bis-PNA and Ce(IV)/EDTA. Y. Aiba, K. Yasuda and M. Komiyama, *Chem. Lett.*, **42**, 1300-1302 (2013)
- 12) PNA-NLS conjugates as single-molecular activators of target sites in double-stranded DNA for site-selective scission. Y. Aiba, Y. Hamano, W. Kameshima, Y. Araki, T. Wada, A. Accetta, S. Sforza, R. Corradini, R. Marchelli and M. Komiyama, *Org. Biomol. Chem.*, **11**, 5233-5238 (2013)
- 13) A Chemistry-Based Method to Detect Individual Telomere Lengths at a Single Chromosome Terminus. T. Ishizuka, Y. Xu, and M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 14-17 (2013).
- 14) An artificial restriction DNA cutter for site-selective gene insertion in human cells. K. Ito, N. Shigi and M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **49**, 6764-6766 (2013)
- 15) Artificial site-selective DNA cutters to manipulate single-stranded DNA. Y. Aiba and M. Komiyama, *Polym. J.*, **52**, 413-435 (2012) (Award Account).
- 16) Chemical and biological approaches to improve the efficiency of homologous recombination in human cells mediated by artificial restriction DNA cutter. H. Katada, T. Harumoto, N. Shigi, and M. Komiyama, *Nucleic Acids Res.*, **40**, e81 (2012).
- 17) Intracellular localization of PNA in human cells upon its introduction by electroporation. N. Shigi, E. Noguchi, and M. Komiyama, *Nat. Product Commun.*, **7**, 349-352 (2012).
- 18) Clear-cut Observation of PNA Invasion using Nanomechanical DNA Origami Devices. T. Yamazaki, Y. Aiba, K. Yasuda, Y. Sakai, Y. Yamanaka, A. Kuzuya, Y. Ohya, and M. Komiyama, *Chem. Commun.*, **48**, 11361-11363 (2012).
- 19) G-rich Sequence-specific Recognition and Scission of Human Genome by PNA/DNA Hybrid G-quadruplex Formation. T. Ishizuka, M. Komiyama, and Y. Xu, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 7198-7202 (2012).
- 20) Enzyme Treatment-Free and Ligation-Independent Cloning Using Caged Primers in Polymerase Chain Reaction. A. Kuzuya, K. Tanaka, H. Katada, and M. Komiyama, *Molecules*, **17**, 328-340 (2012).
- 21) Sensitive RNA detection by combining 3-way junction formation and primer generation-rolling circle amplification. T. Murakami, J. Sumaoka, and M. Komiyama, *Nucleic Acids Res.*, **40**, e22 (2012)
- 22) Introduction of multiphosphonate ligand to peptide nucleic acid for metal ion conjugation. Y. Aiba, Y. Honda, Y. Han, and M. Komiyama, *Artificial DNA: PNA & XNA*, **3**, 73-79 (2012).
- 23) Nanomechanical DNA Origami 'Single-Molecule Beacons' Directly Imaged by Atomic Force Microscopy. A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki, Y. Xu, and M. Komiyama, *Nature Commun.*, **2**, 449 (2011)
- 24) Inhibition of translation by small RNA-stabilized mRNA structures in human cells. K. Ito, S. Go, M. Komiyama, and Y. Xu, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 19153-19159 (2011).
- 25) Manipulation of single-stranded DNA using artificial site-selective DNA cutter composed of Ce(IV)/EDTA and phosphonate-oligonucleotide conjugates. Y. Aiba, T. Lonnberg, and M. Komiyama, *Chem. Asian J.* **6**, 2407-2411 (2011).

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

- 26) Photo-Switching of Site-Selective RNA Scission by Sequential Incorporation of Azobenzene and Acridine Residues in a DNA Oligomer, A. Kuzuya, K. Tanaka, and M. Komiyama, *J. Nucl. Acids*, Article ID 162452, 8 pages (2011).
- 27) Recognition of photoresponsive polymer targets by protein fused with cis-form azobenzene-binding peptide. J. Chen, T. Serizawa, and M. Komiyama, *Chem. Lett.*, 40, 482-483 (2011).
- 28) Binding analysis of peptides that recognize the isomer of azobenzene groups of synthetic polymers. J. Chen, T. Serizawa, and M. Komiyama, *J. Peptide Sci.*, 17, 163-168 (2011).
- 29) Programmed nanopatterning of organic/inorganic nanoparticles using nanometer-scale wells embedded in a DNA origami scaffold. A. Kuzuya, N. Koshi, M. Kimura, K. Numajiri, T. Yamazaki, T. Ohnishi, F. Okada, and M. Komiyama, *Small*, 6, 2664-2667 (2010).
- 30) Dethreading of deoxyribonucleotides through α -cyclodextrin A. Kuzuya, T. Ohnishi, T. Yamazaki, and M. Komiyama, *Chem. Asian J.*, 5, 2177-2180 (2010).
- 31) Discrete and active enzyme nanoarrays on DNA origami scaffolds purified by affinity tag separation. K. Numajiri, T. Yamazaki, M. Kimura, A. Kuzuya, and M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 9937-9939 (2010).
- 32) Telomeric repeat-containing RNA structure in living cells. Y. Xu, Y. Suzuki, K. Ito, and M. Komiyama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 14579-14584 (2010).
- 33) Stepwise and reversible nanopatterning of proteins on a DNA origami scaffold. K. Numajiri, M. Kimura, A. Kuzuya, and M. Komiyama, *Chem. Commun.*, 46, 5127-5129 (2010).
- 34) A U-tetrad stabilizes human telomeric RNA G-quadruplex structure. Y. Xu, T. Ishizuka, T. Kimura, and M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 7231-7233 (2010).
- 35) A 6-mer photocontrolled oligonucleotide as an effective telomerase inhibitor. Y. Xu, K. Ito, Y. Suzuki, and M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, 132, 631-637 (2010).
- 36) Asymmetric secondary and tertiary streptavidin/DNA complexes selectively formed in a nanometer-scale DNA well. K. Numajiri, A. Kuzuya, and M. Komiyama, *Bioconjugate Chem.*, 21, 338-344 (2010).
- 37) Oxidation of an oligonucleotide-bound Ce(III)/multiphosphonate complex for site-selective DNA scission. T. Lönnberg, Y. Aiba, Y. Hamano, Y. Miyajima, J. Sumaoka, and M. Komiyama, *Chem. Eur. J.*, 16, 855-859 (2010).
- 38) Molecular imprinting of cyclodextrin to physiologically active oligopeptides in water S. Song, K. Shirasaka, H. Asanuma, T. Wada, J. Sumaoka, and M. Komiyama, *Supramol. Chem.*, 22, 149-155 (2010)

総説

- 1) Covalent and non-covalent conjugates of oligonucleotide as artificial restriction DNA cutters. M. Komiyama, Y. Xu, and J. Sumaoka, "DNA conjugates and sensors", the RSC Biomolecular Sciences Series, in press.
- 2) Evidence for G-quadruplex DNA in human cells. Y. Xu and M. Komiyama, *Chembiochem.*, 14, 927-928 (2013).
- 3) DNAを切る唯一の触媒 —セリウムとの幸運な出会い—
小宮山眞、別冊化学“ケミストを魅了した元素と周期律表”、12(2013)
- 4) Cut-and-paste of DNA using artificial restriction DNA cutter. M. Komiyama, *Int. J. Mol. Sci.* 14, 3343-3357 (2013)
- 5) Structure, function and targeting of human telomere RNA. Y. Xu and M. Komiyama, *Methods*, 57, 100-105 (2012).
- 6) Design and applications of artificial restriction DNA cutters for site-selective scission of genomes. M. Komiyama and J. Sumaoka, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 85, 533-544 (2012) (Award Account)
- 7) 高等生物を対象とした新しいバイオテクノロジー —スーパー制限酵素（化学合成ツール）の活用—
小宮山眞、未来材料、12(10), 64-66 (2012).
- 8) 目標を定めたらそれに向けてひたむきに突っ走る（私の自慢）
小宮山眞、化学と工業、65, 551-553 (2012).
- 9) Site-selective scission of human genome using PNA-based artificial restriction DNA cutter. K. Ito and M. Komiyama, "Peptide Nucleic Acids. Methods and Protocols", in press.
- 10) Artificial DNA cutters for DNA manipulation and genome engineering. Y. Aiba, J. Sumaoka, and M. Komiyama, *Chem. Soc. Rev.*, 40, 5657 - 5668 (2011).
- 11) Artificial restriction DNA cutters to promote homologous recombination in human cells H. Katada and M. Komiyama, *Current Gene Therapy*, 11, 38-45 (2011).
- 12) スーパー制限酵素を用いた遺伝子改変
須磨岡淳、嶋成実、小宮山眞、高分子、60, 204-208 (2011)
- 13) DNA Origami: Fold, Stick, and Beyond
A. Kuzuya and M. Komiyama, *Nanoscale*, 2, 310-322 (2010).
- 14) 人工酵素の歴史と将来
小宮山眞、「酵素利用技術体系」(小宮山眞監修)、NTS, 第4編1章、pp 265-268 (2010).
- 15) 化学修飾による特異性の改変
堅田仁・小宮山眞、「酵素利用技術体系」(小宮山眞監修)、NTS, 第4編2章3節、pp 289-295 (2010).

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

16) スーパー人工酵素

須磨岡淳・小宮山眞、「酵素利用技術体系」（小宮山眞監修）、NTS、第4編5章5節、pp 370-375（2010）。

17) 希土類イオンによるRNA、DNAの切断

葛谷明紀、小宮山眞、希土類の材料技術（2010）

18) 分子認識系（非生体系 ホスト・ゲスト化学）

池田宰、小宮山眞、「自己組織化ハンドブック」、NTS（2010）

国際会議での招待講演

1) Second-generation Artificial DNA cutter for Analysis and Manipulation of Human Genome.

9th WSEAS International Conference on CELLULAR and MOLECULAR BIOLOGY, BIOPHYSICS and BIOENGINEERING, Chania, Aug. 27-29（2013）.

2) Manipulation of Human Genome Using Chemistry-based DNA Cutter.

MANA International Symposium 2013, Tsukuba, Feb. 27-Mar. 1（2013）.

3) Manipulation of Human Genome Using Completely Chemistry-based DNA Cutter.

8th WSEAS International Conference on CELLULAR and MOLECULAR BIOLOGY, BIOPHYSICS and BIOENGINEERING, Montreax, Dec. 29-31（2012）.

4) Manipulation of Huge DNA by Artificial Restriction DNA Cutter (ARCUT)

6th Cambridge Symposium on Nucleic Acids Chemistry and Biology, Cambridge, Sept. 4-7（2011）.

5) Artificial DNA cutter to manipulate huge genome.

15th Symposium on Chemistry of Nucleic Acid Compounds, Cesky Krumlov, June 5-10（2011）.

6) Pinpoint Manipulation of Human Genome Using Artificial DNA Cutter.

G-COE symposium in Nagoya on Biochemistry and Bionanotechnology, Nagoya, Jan. 12, 2011

7) DNA hydrolysis by Ce(IV) complex prepared from Ce(III) precursor

The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, Dec. 15-20（2010）.

8) Artificial restriction DNA cutter (ARCUT) for homologous recombination in human cells.

The 2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii, Dec. 15-20（2010）.

9) Design of artificial receptors for peptides.

MIP2010, Aug. 9-12, New Orleans（2010）

10) Artificial conversion of a gene in human genome.

Workshop on Nucleic Acid Chemistry, Telluride, Aug. 2-6（2010）

11) Manipulation of human genome using artificial restriction DNA cutter.

BIOMEDCH'10, May 23-25, Cambridge（2010）.

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(3) 研究費の取得状況（研究代表者として取得したもののみ）

研究代表者：小宮山 眞

研究種目：文部科学省科学研究補助金：特別推進研究

期間：平成 22～26 年度（2011～2015）

（研究課題名：スーパー制限酵素を用いたゲノム・マニピュレーション工学の創成

研究期間全体の配分額：計 400,400 千円

(4) 特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見

スーパー制限酵素はヒトの全ゲノム（30億塩基対）の中のある場所を選択的に切断できるので、関連科学の強力な武器となる。そこで、(1) 項の研究概要で記載した通りに、ヒト細胞中の個々の染色体の末端に存在するテロメアの長さの決定にこれを適用した。テロメア配列自体はどの染色体でも同一である（ヒトの場合は GGGTTA の繰り返し配列）が、この繰り返しが終了した部分の塩基配列は、それぞれの染色体に固有である。そこで、それぞれの染色体に対応したスーパー制限酵素を設計し、これをヒトの全ゲノムに対して作用させた。図 1 に、性染色体の短腕（Xp/Yp）のテロメアと 11 番染色体の長腕（11q）のテロメアに関するゲル電気泳動の結果を示す。性染色体のテロメアは、11 番染色体のテロメアよりも 1.6 倍も長いことが明らかとなった。従来法では、これらを含めて全てのテロメア長の重ね合わせが求まるだけである（右端）。現在、この事象の原因を解明すべく鋭意検討しているところであるが、これが明らかになれば、テロメア長と細胞寿命の関係について新たな概念が提示できるものと期待される。

一方、スーパー制限酵素を用いると、細胞内のゲノムを所定位置で切断し、相同組み換えによりゲノムを改変できることも実証した。これは、このようなゲノム・エディティングに使用できる唯一の化学ツールとして注目されている。化学修飾を施すことにより、さらなる新機能の付与も可能である。ゲノムを所定位置で選択的に切断する化学ツールの重要性は世界の科学者に広く認識されていたが、その開発は困難をきわめ、ほとんど不可能なものとされていた。しかし、我々が実際にスーパー制限酵素を開発し、学会ならびに学会誌を通じてこれを報告したことにより、この課題に携わる研究者が数多く現れてきた。現時点までには、我々のスーパー制限酵素に匹敵するものは報告されていないが、これからも競争の激化が予想され、我々も気を引き締めて鋭意研究を進めているところである。

ところで、我々が当該研究を進めている途中で、天然の細胞防御系を改造したゲノム・エディティング法（CRISPR-Cas 法）が独立に開発された。この手法は天然材料に由来しているので、細胞内への導入の容易さに関しては、我々の化学ツールよりも有利であることは認めざるを得ない。しかし、天然材料であるだけに、切断できる配列には制限があり、またこれを解決することも容易ではない。それに対して、我々のスーパー制限酵素は完全に化学材料であり、任意の配列が切断できる。しかも自由な分子設計により化学修飾して自在に機能改変・増強が可能であるという長所を有する。

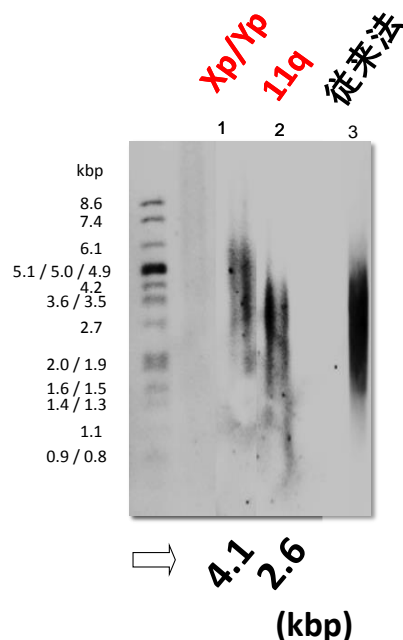


図1 スーパー制限酵素による
テロメア長の決定

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況

特別推進研究の研究成果が他の研究者に活用された状況について、次の(1)、(2)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 学界への貢献の状況（学術研究へのインパクト及び関連領域のその後の動向、関連領域への関わり等）

“ヒトゲノムのような巨大DNAを所定位置で選択的に切断する化学ツールを開発し、これを自由に操作したい“、これは世界の科学者の長年の願望であった。我々は、この課題に関して、化学の側面からアタックし、(1) Ce(IV)が効率的にDNAを加水分解することを見出し、(2) EDTAと錯体を組ませることによりCe(IV)に1本鎖DNA選択性を付与し、(3) ゲノム中の所定位置にPNAを使って1本鎖部分を形成して目的を実現した。そのために、スーパー制限酵素は、分子設計の自在性、安定性をはじめとする化学ツールの特色を生かした上で、ゲノムを所定位置で選択的に切断する。そのために、我々が開発したスーパー制限酵素は学会で多大な注目を集め、また大きな衝撃を与えることができた。実際に、国の内外から多くの招待講演の依頼を受け、そのたびに多くの質問を受けるとともに共同研究の申し出を受けた。我々の成果に触発されて、さらに優れたDNA切断ツールを開発しようとする試みも数多くなされた（幸か不幸か成功例が少ないので、実際に文献として報告されているものは数少なく、個人的に情報を得た場合が多い）。また、我々も含めた化学者と生化学者ならびに分子生物学者との関わりを大いに強めたことも明らかである。その意味で、学術研究へのインパクトは十分に大きかったと考える。今後も、PNAの化学修飾などを通じて、さらなる高機能のスーパー制限酵素が開発できるものと確信している。

本研究で開発したスーパー制限酵素を用いることにより、これなしには容易に得ることができない種々のゲノム情報を正確に得ることができ、これらは学会に大きな影響を与えた。既述（図1参照）の“ヒト細胞中の各染色体のテロメアの別個取得とその長さの測定”はその典型例である。スーパー制限酵素という新規な化学ツールを提示することにより、従来けっして得られなかった“それぞれの染色体のテロメアの長さの精密測定”に成功したわけである。こうして得られた「染色体によりテロメアの長さは異なる」という知見は、テロメアの存在意義の根幹に関わるものであり、関連科学自体の一大革新に貢献するものと考えている。現在、(i) 細胞誕生の時から染色体によりテロメア長が異なるのか、あるいは(ii) 細胞が外部刺激を受け、それが染色体の種類に依存した影響を与えるのか？ のいずれが正しいのかを解明すべく鋭意検討している。また、このテロメアの成果を発表するとすぐに、この論文を読んだ内外の研究者から、ゲノムの他の場所をターゲットにしたスーパー制限酵素の活用に関する共同研究の依頼を受けている。これらの共同研究もさらなる新規なゲノム情報を生み、ゲノム科学の発展に大いに寄与できるものと期待している。一方、スーパー制限酵素を細胞内で使用する場合には、化学ツールならではの困難があった。特に、細胞への導入方法は、細胞の持つ複雑さ、多様性、個性などのために、最適のプロトコルを求めて試行錯誤的なアプローチをとらざるを得なかった。しかし、エレクトロポレーション法による導入により、細胞内での相同組み換えを促進することができた。今後は、さらに多くの方にスーパー制限酵素を広く使用してもらうために、そのキット化を検討している。すなわち、ヒトゲノムの中の主要遺伝子に対応した一連のPNA群の水溶液と、Ce(IV)/EDTA溶液とを準備し、両者を単に混ぜ合わせるだけでヒトゲノムの所定位置を切断できるようにする。さらに、PNAにビオチンを結合しておき、所定のゲノム断片のアフィニティー分離が容易にできるようにもする。また、リポフェクションにより簡便に細胞に導入できるようにして、細胞内応用を簡素化する。このようなキットが完成できれば、化学ツールとしての特性（特に、化学修飾により必要な機能を自由に導入できること）を活用して、ゲノム・マニピュレーション工学のツールとしてさらに有用に活用してもらえるものと考えている。

また、本特別推進研究においてスーパー制限酵素の作用機構を解明している段階で、核酸化学・生命科学に関するさまざまな基礎的知見を蓄積することができ、これらも学会で非常に高く評価されている。例えば、PNAが二本鎖DNAにインページョンする過程を、ゲノム切断条件でかつ視覚的に検出する手法を開発した。ここでは、PNAのインページョンに伴って構造を変化するDNAオリガミ構造体を構築し、インページョン複合体の形成を定量的かつ視覚的に検出した。従来は、インページョン複合体の形成は、ゲル電気泳動における移動度の変化から類推されていたが、はるかに直接的な情報を得ることができたわけである。また、ポリアミドと呼ばれる合成分子とPNAとを結合して両者の長所をハイブリッド化することにより、高塩濃度条件でも効率的にインページョンを起こす新規なDNA結合高分子を開発することにも成功した。細胞内での応用の可能性をさらに高めた成果である。さらに、染色体の末端にあるテロメア部分の化学構造に関しても詳細な検討を行い、種々の重要情報を得ることができた。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況（続き）

(2) 論文引用状況（上位10報程度を記述してください。）

【研究期間中に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	H. Asanuma, X. Liang, H. Nishioka, D. Matsunaga, M. Liu, M. Komiyama Synthesis of azobenzene-tethered DNA for reversible photo-regulation of DNA functions: hybridization and transcription. <i>Nat. Protoc.</i> , 2, 203-212, 2007	アゾベンゼンをオリゴヌクレオチドの自由な位置に導入する手法を開発した。アゾベンゼンを持つオリゴヌクレオチドは DNA と結合するが紫外線照射するとアゾベンゼンの異性化により解離する。これを利用して転写反応を光照射で制御することに成功した。	107
2	A. Kuzuya, M. Komiyama Design and construction of a box-shaped 3D-DNA origami. <i>Chem. Commun.</i> , 28, 4182-4184, 2009	箱型の 3D DNA 折り紙の作成に成功した。開いた構造体と、閉じて箱型の構造体の両者とも、原子間力顕微鏡で明瞭に観察された。	74
3	Y. Xu, K. Kaminaga, M. Komiyama G-quadruplex formation by human telomeric repeats-containing RNA in Na ⁺ solution. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 130, 11179-11184, 2008	NMRによりヒトテロメア RNA の構造解析研究を行った結果、テロメア RNA が四重鎖構造を形成することを明らかにした。	72
4	A. Kuzuya, M. Kimura, K. Numajiri, N. Koshi, T. Ohnishi, F. Okada, M. Komiyama Precisely programmed and robust 2D streptavidin nanoarrays by using periodical nanometer-scale wells embedded in DNA origami assembly. <i>Chembiochem</i> , 10, 1811-1815, 2009	DNA 折り紙の技術でウェル構造をもつナノ構造体を構築した。ウェル中に 2 分子のビオチンを修飾することで、ストレプトアビジン 4 量体を取り込むことに成功した。	67
5	Y. Xu, T. Ishizuka, K. Kurabayashi, M. Komiyama Consecutive formation of G-quadruplexes in human telomeric-overhang DNA: a protective capping structure for telomere ends. <i>Angew. Chem. Int. Ed. Engl.</i> , 48, 7833-7836, 2009	ヒトテロメアの 1 本鎖オーバーハングは構造解析の結果、連続的な 4 重鎖構造をとっており、この構造は 2 本鎖 DNA 末端を、分解や傷害から保護するキャップとして機能していることが示唆された。	57
6	A. Kuzuya, M. Komiyama DNA origami: fold, stick, and beyond. <i>Nanoscale</i> , 2, 310-22, 2010	長い 1 本鎖 DNA を折りたたんでつくるナノ構造体、DNA 折り紙は、2 次元のみならず 3 次元のナノ構造体を構築できる。この DNA 折り紙のアプリケーションについて解説した総説である。	54
7	M. Komiyama, Y. Aiba, Y. Yamamoto, J. Sumaoka Artificial restriction DNA cutter for site-selective scission of double-stranded DNA with tunable scission site and specificity. <i>Nat. Protoc.</i> , 3, 655-662, 2008	2 本鎖 DNA を切断する人工制限酵素 ARCUT を開発した。これは PNA で標的部位を認識し、Ce(IV)/EDTA 錯体で切断する。ARCUT によって切断された断片は DNA ライゲースにより認識され他断片と結合することができた。	51
8	T. Murakami, J. Sumaoka, M. Komiyama Sensitive isothermal detection of nucleic-acid sequence by primer generation-rolling circle amplification. <i>Nucleic Acids Res.</i> , 37, e19, 2009	環状 DNA プローブと DNA 合成酵素・ニック酵素を利用し、一定温度下にて Linear rolling circle amplification (LRCA 反応) とニック反応を相互に連鎖的に誘発することにより、微量サンプルから指数関数的に増幅する PG-RCA 法を開発した。	48
9	H. Kashida, H. Asanuma, M. Komiyama Insertion of two pyrene moieties into oligodeoxyribonucleotides for the efficient detection of deletion polymorphisms. <i>Chem. Commun.</i> , 26, 2768-2770, 2006	欠損型の遺伝子多型の検出プローブとして、2 つのピレンの間に 1 塩基挟まった形のオリゴヌクレオチドを作成した。このプローブのエキシマー発光により 1 ~ 2 塩基の欠損の検出に成功した。	44
10	H. Katada, M. Komiyama Artificial Restriction DNA Cutters as New Tools for Gene Manipulation. <i>Chembiochem</i> , 10, 1279-1288, 2009	我々が開発した完全に化学ベースの DNA 切断ツール ARCUT とタンパク質ベースの Zinc Finger Nuclease を中心に DNA 切断ツールの種類とその応用について解説した総説である。	39

【研究期間終了後に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Y. Xu, Y. Suzuki, K. Ito, M. Komiyama Telomeric repeat-containing RNA structure in living cells. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> , 107, 14579-14584, 2010	哺乳動物のテロメアに存在する TERRA RNA について、生細胞中の構造を、ピレンプローブを用いて解析し、TERRA RNA が G カルテット構造ととること、そしてテロメア DNA と同じ場所に局在することを見出した。	61
2	Y. Aiba, J. Sumaoka, M. Komiyama Artificial DNA cutters for DNA manipulation and genome engineering <i>Chem. Soc. Rev.</i> , 40, 5657-68, 2011	我々が開発した人工核酸 PNA によりターゲット配列を認識し、Ce(IV)/EDTA 錯体により切断する、化学ベースの DNA 切断ツールについての総説である。	39
3	A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki, Y. Xu, M. Komiyama Nanomechanical DNA origami 'single-molecule beacons' directly imaged by atomic force microscopy. <i>Nat. Commun.</i> , 2, 449, 2011	ペンチのような形状をしたナノメートルサイズの動く道具「DNA 折り紙ペンチ」を作成した。これは、タンパクを始めとする標的分子と結合すると構造が自発的に変化する。この構造変化を原子間力顕微鏡で観察することで、分子数の増幅を一切行わなくても、標的分子の存在を正確に検出することに成功した。	37
4	K. Numajiri, T. Yamazaki, M. Kimura, A. Kuzuya, M. Komiyama Discrete and Active Enzyme Nanoarrays on DNA Origami Scaffolds Purified by Affinity Tag Separation <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 132, 9937-9939, 2010	長鎖の一本鎖 DNA を折りたたんで自在な二次元ナノ構造体を作成する DNA Origami の技術を応用し、ナノメートルサイズのウェルが複数組み込まれた棒状ナノ構造体の作成を行った。ウェルの中を修飾することで、特定のたんぱく質を特定のウェルに結合させることのできる、タンパクナノアレイの作成に成功した。	36
5	K. Numajiri, M. Kimura, A. Kuzuya, M. Komiyama Stepwise and reversible nanopatterning of proteins on a DNA origami scaffold. <i>Chem. Commun.</i> , 46, 5127-5129, 2010	DNA 折り紙で作ったウェルをもつ構造体において、一部を鎖交換することで、ウェルにタンパク質を段階的に結合させたり、それを除去したりすることができる技術を開発した。	28
6	Y. Xu, T. Ishizuka, T. Kimura, M. Komiyama A U-tetrad stabilizes human telomeric RNA G-quadruplex structure. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> , 132, 7231-7233, 2010	ヒトテロメア RNA の構造を解析した。G カルテット構造の 3' 末端にはウラシルが 4 分子体を形成しており、それが G カルテットの安定化することを明らかにした。	24
7	H. Katada, M. Komiyama Artificial restriction DNA cutters to promote homologous recombination in human cells. <i>Curr. Gene. Ther.</i> , 11, 38-45, 2011	我々の開発した DNA 切断ツールで DNA を切断することで、ヒト細胞の中で遺伝子組換えを誘発させることができた。	17
8	A. Kuzuya, N. Koshi, M. Kimura, K. Numajiri, T. Yamazaki, T. Ohnishi, F. Okada, M. Komiyama Programmed nanopatterning of organic/inorganic nanoparticles using nanometer-scale wells embedded in a DNA origami scaffold. <i>Small</i> , 6, 2664-2667, 2010	DNA 折り紙の技術でウェル構造をもつナノ構造体のウェル中にチオール修飾することで、金微粒子を取り込むことに成功した。またウェルごとに施す修飾を変えることで、タンパク質と金微粒子を交互に並べることに成功した。	13
9	T. Murakami, J. Sumaoka, M. Komiyama Sensitive RNA detection by combining three-way junction formation and primer generation-rolling circle amplification. <i>Nucleic Acids. Res.</i> , 40, e22, 2012	我々が開発した高感度でダイナミックレンジの広い PG-RCA 法に、3-way junction プローブを組み合わせ、微量 RNA の検出法を開発した。	12
10	K. Ito, S. Go, M. Komiyama, Y. Xu Inhibition of Translation by Small RNA-Stabilized mRNA Structures in Human Cells. <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 133, 19153-19159, 2011	mRNA の 5' 非翻訳領域または翻訳領域の G リッチな配列と結合し、G カルテット構造を形成するような短鎖 RNA を導入することで、細胞内での翻訳を阻害することに成功した。	12

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報

次の(1)、(2)の項目ごとに、該当する内容について具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究成果の社会への還元状況（社会への還元の程度、内容、実用化の有無は問いません。）

バイオテクノロジーの急激な進歩とともに、巨大DNAを自在に操作する技術の重要性は広く認識されていた。我々が研究を開始した時点で、プラスミドを主とする小DNAの操作技術はすでに確立していたが、それらの技術は、より大きなDNA、特にヒトゲノムの操作には全く無力であった。本特別推進研究で開発したスーパー制限酵素は、(i) 切断ターゲット箇所に合成核酸であるPNAをインベージョンさせて1本鎖部分を形成し、(ii) こうして所定場所に形成した1本鎖部分を1本鎖特異的なDNA切断触媒 Ce(IV)/EDTA で切断するものである。したがって、(1) PNAの長さや配列を選ぶことにより、切断配列の長さならびに配列が自由に選択できること、(2) DNA切断がすべてリン酸ジエステル結合の加水分解で進行するために、調製断片が酵素リガーゼにより自在に結合できること、ならびに(3) 化学ツールであるために、必要に応じて自在に化学修飾を導入できることなどの様々な特色を有する。実際に、スーパー制限酵素を“切断位置と特異性が自由な人工制限酵素”として活用し、“天然制限酵素にまったく依存しない遺伝子工学”が実現されている。この場合、天然の制限酵素の切断サイトを探す必要がないので、ゲノムの中のどの位置でも自由に選択して自在に組み替えることができるのが大きな長所である。また、スーパー制限酵素をヒト細胞内で用いてゲノムを改変する(ゲノム・エディティング) ことにも成功した。ゲノムを選択的に切断する化学合成ツールはスーパー制限酵素のみであるので、当然のことながら、この目的に使用可能な唯一の化学合成ツールであり、大いなる注目を集めた。

一方、スーパー制限酵素は、ゲノムの解析ツールとしても多大な注目を集めている。生命化学の進展につれて、ゲノム情報の必要性が急速に増しており、その解析手段も種々開発されている。しかし、いずれの手法も巨大なゲノムをそのまま分析するために、「ゲノムのどの辺に化学修飾や損傷が局在化しているか？」という俯瞰的な全体像は得られるものの、「ある遺伝子の中の特定の塩基が修飾・損傷を受けているか否か？」に関する詳細な分子情報は得られない。種々の最新鋭の分析法も提案されているが、信頼性が未だ不十分であると言われている。一方、PCR法は、増幅過程で化学修飾や酸化損傷の情報が失われるので適用できない。すなわち、これまでは、ゲノムの化学修飾や酸化損傷に関する分子情報を正確に求める手段がなく、そのために、これらがゲノム機能に及ぼす役割を分子レベルで解明することはできなかった。それに対して、本申請研究で開発したスーパー制限酵素はヒトゲノムを選択的に切断できるので、ゲノムから所定断片を分離してこれを解析することができる。調製されるゲノム断片は小さく(数千塩基対以下)、現状の分析技術でも十分に詳細な構造解析ができる。実際に、ゲノムから小断片を入手することに成功しており、これを分子レベルで解析している。今後は、ゲノム科学者との共同研究を促進して、上記の特性をさらに活用していく予定である。

我々が開発したスーパー制限酵素は、使用目的に応じて自由に分子設計ができて、望みの機能が自在に付与でき、しかも化学的ならびに生化学的に安定であるという特性を有する。分子設計の妥当性と優秀さ、ならびに、将来的な応用の広さと可能性の大きさについては化学会、分子生物学会をはじめとする内外の諸学会で高く評価されており、ゲノムを切断する化学ツールとして完成の域にあると自負している。2項で述べたようなスーパー制限酵素のキット化が実現すれば、スーパー制限酵素はさらに使いやすくなり、その応用例は飛躍的に増加するものと考えられる。こうして、スーパー制限酵素は、ゲノムのマニピュレーション・ツールとして医療や分子生物学の革新的発展に寄与できるものと確信している。

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報（続き）**(2) 研究計画に関与した若手研究者の成長の状況（助教やポスドク等の研究終了後の動向を記述してください。）**

1. 東京大学・先端科学技術研究センター・講師
現 東京工科大学工学部応用化学科の教授
2. 東京大学 工学研究科 助教
現 宮崎大学医学部医学科の教授
3. 東京大学 工学研究科 助教
現 関西大学化学生命工学部の准教授
4. 東京大学 先端科学技術研究センター特任助教
現 University of Texas, Southwestern Medical Center の博士研究員
5. 東京大学博士後期課程
現 宮崎大学医学部医学科の特任助教