

科学研究費補助金（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成18年度採択分

平成21年 3月31日現在

研究課題名（和文）

スーパー制限酵素による巨大 DNA の遺伝子操作

研究課題名（英文） Gene Manipulation of Huge DNA

by Super Artificial Restriction Enzyme

研究代表者

小宮山 眞 (Komiyama Makoto)

東京大学・先端科学技術研究センター・教授



研究の概要：申請者らが開発してきた“スーパー制限酵素 (Artificial Restriction DNA CUTter; ARCUT)”を完成させ、さらにこれを用いた遺伝子操作法を確立する。また、「巨大 DNA を所望の位置で選択的に切断できる」という ARCUT の特長を生かし、天然酵素を使用する従来法では実施困難な遺伝子操作を実現し、ニュー・バイオテクノロジーを創成する。

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：DNA、制限酵素、ペプチド核酸、遺伝子組換え、セリウム

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA から所定の遺伝子(群)を切り出し、またゲノム DNA の所定位置に必要な遺伝子を自在に導入できれば、医療、物質生産、品種改良など幅広い分野に計り知れない効果をもたらすと期待される。そのため、巨大な DNA を所定の位置で選択的に切断する人工ツールの開発が、世界中の多くの研究者により試みられていた。しかし、本研究を開始した時点においては、我々の開発した ARCUT が、天然酵素も含めて、巨大 DNA を設計通りに切断できる唯一のツールであった。

2. 研究の目的

(1) 巨大な二本鎖 DNA を所定の位置で選択的に切断する ARCUT を用いて、巨大 DNA のマニピュレーション法を確立すること、および(2) ARCUT による切断を活用してニュー・バイオテクノロジーを創出することの2つを目的とする。

3. 研究の方法

我々が開発した ARCUT は、「二本鎖 DNA のターゲット配列を認識するペプチド核酸(PNA)」と「DNA を切断する Ce(IV)/EDTA 錯体」から構成される。そこで、PNA や Ce(IV)錯体を化学修飾し、より高い選択性と切断活性を持つ ARCUT を構築し、次世代バイオツールとしての有用性をさらに高める。また、テロメア配列と選択的に結合する修飾核酸をターゲット配列認識部位として利用して、老化やガン化との関与が報告されているテロメアを選択的に切断する人工酵素を構築する。さらに、ARCUT を用いてヒトゲノムの位置特異的な切断を実現するとともに、天然

酵素のみに依存した従来技術では実施不可能であった新たなバイオテクノロジーを創成する。

4. これまでの成果

(1) 第一世代 ARCUT のミスマッチ認識能の評価

ARCUT により巨大ゲノムを切断する際には、ターゲット配列と類似の配列が系中に多数混在する。そこで、PNA と DNA との間に系統的にミスマッチを導入して切断効率への影響を検討した。その結果、ARCUT のミスマッチ認識能は極めて高く、各種のゲノムを所定位置で選択的に切断するのに十分な認識能を有することを確認した。

(2) ARCUT の機能向上

これまで用いていた PNA では、GC 含有量が極端に高い DNA 配列の認識は困難であった。そこで、PNA の設計を精密化してその中の所定位置に正電荷を導入し、GC 含有量の非常に高い配列も効率的に認識させることに成功した。また、第一世代 ARCUT では、DNA 中の所定のターゲット配列を認識するのに二本の PNA 鎖が必要である。しかし、一本鎖 DNA 結合タンパク質(SSB)を併用すると、一本の PNA 鎖でも、二本鎖 DNA 中の所定位置に効率的にインベージョンさせることができることも見出した。

第一世代 ARCUT では、PNA の末端にリン酸基を導入し、これと Ce(IV)との相互作用を利用して触媒をターゲット部位に局在化して切断活性を向上してきた。今回、この効果をさらに高めるために、リン酸基よりもさらに強く Ce(IV)と相互作用する多価リン酸配位子を開発し、これを切断サイトの近傍に導入した。その結果、DNA 切断の効率が飛躍的に向上した。

また、ARCUT による切断で生成する断片と、他の DNA 断片とのリガーゼ反応の効率化にも成功した。ARCUT で得られる DNA 断片の末端は、特異的な接着末端構造を持つ。そこで、これらの末端と相補的な末端を持つ DNA 断片を直接に与える新たな PCR 法を開発した。この PCR 法により得られた DNA 断片は、ARCUT 生成物と、通常のリグーション条件で容易かつ迅速に結合されて細胞内で正常に発現した。

さらに、ヒテロメアをターゲットとする DNA カッターの開発を志向して、この部位に選択的に結合する分子を追究した。その結果、G カルテットを形成してヒテロメア配列に結合する修飾 DNA や RNA を開発するとともに、分子構造の安定化に成功した。

(3) ニュー・バイオツールとしての ARCUT の応用展開

まず、ヒトゲノムのように巨大な DNA であっても、その中の所定の位置が ARCUT により選択的に切断できることを実証した。例えば、ヒトゲノムの X 染色体に存在する FMR1 遺伝子付近を切断ターゲットとして ARCUT を設計した。ヒトの細胞から全ゲノムを抽出し、ARCUT で切断した後、反応物をそのまま天然制限酵素で処理した。サザンブロッティングで生成断片を解析し、ヒトゲノムの選択的切断を確認した。

さらに、組換え標的部位の近傍を ARCUT で切断することにより、ヒト細胞内での相同組換えの頻度を大幅に上昇することに成功した。まず青色蛍光タンパク質遺伝子 (BFP) を所定位置で ARCUT で切断し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の配列を持つドナー DNA 断片とともにヒト細胞に導入した。すると、非常に高い効率で BFP が GFP へと変換された。ARCUT は切断サイトが自在に設計できるので、ヒト細胞内において相同組換えを促進して、遺伝子挿入や遺伝子変異を人為的に誘起する新たなツールとして有用であることが明らかとなった。

また、染色体の末端に存在して重要な生体機能を担っているテロメアを、特異的に切断する人工カッターの開発にも成功した。ヒテロメアは $(TTAGGG)_n$ という繰り返し配列を持つので、これと G カルテットを形成して特異的に結合する修飾オリゴヌクレオチドを合成し、これに多価リン酸配位子を結合した。ここに Ce(IV)/EDTA を加えて反応させると、ヒテロメアのオーバーハンク部分 (3' 端にある一本鎖構造) が選択的に切断された。

5. 今後の計画

- (1) PNA に種々の化学修飾 (多価リン酸配位子、主鎖修飾、糖鎖修飾など) を施し、ARCUT をさらに高機能化する。
- (2) 細胞内に ARCUT を導入し、そこでの選択的 DNA 切断を実現する。
- (3) ARCUT による相同組換えの生化学的応用を展開する。

- (4) G-カルテット構造などの特殊な DNA 構造をターゲットとした人工 DNA カッターを開発する。
- (5) これらの知見を総合評価し、ARCUT を用いたニュー・バイオテクノロジーの創成を目指す。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

(研究代表者は太字、研究分担者は二重下線、連携研究者は一重下線)

1) “Human Telomeric DNA Sequence-Specific Cleaving by G-Quadruplex Formation”, Y. Xu, Y. Suzuki, T. Lönnberg, **M. Komiyama**, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2871-2874.

2) “Origin of High Fidelity in Target-Sequence Recognition by PNA Ce(IV)/EDTA Combinations as Site-Selective DNA Cutters”, Y. Miyajima, T. Ishizuka, Y. Yamamoto, J. Sumaoka, **M. Komiyama**, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2657-2662.

3) “Strand Invasion of Conventional PNA to Arbitrary Sequence in DNA Assisted by Single-Stranded DNA Binding Protein”, T. Ishizuka, K. Otani, J. Sumaoka, **M. Komiyama**, *Chem. Commun.* **2009**, 1225-1227.

4) “Prompt Site-Selective DNA Hydrolysis by Ce(IV)-EDTA Using Oligonucleotide Multiphosphonate Conjugates”, T. Lönnberg, Y. Suzuki, **M. Komiyama**, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3580-3587.

5) “Site-Selective Blocking of PCR by a Caged Nucleotide Leading to Direct Creation of Desired Sticky Ends in the Products”, K. Tanaka, H. Katada, N. Shigi, A. Kuzuya, **M. Komiyama**, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2120-2126.

6) “Accommodation of a Single Protein Guest in Nanometer-Scale Wells Embedded in a “DNA Nanotape””, A. Kuzuya, K. Numajiri, **M. Komiyama**, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 3400-3402.

7) “Artificial Restriction DNA Cutter for Site-Selective Scission of Double-Stranded DNA with Tunable Scission Site and Specificity”, **M. Komiyama**, Y. Aiba, Y. Yamamoto, J. Sumaoka, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 655-662.

8) “Solid-Phase Synthesis of Pseudo-Complementary Peptide Nucleic Acids”, **M. Komiyama**, Y. Aiba, T. Ishizuka, J. Sumaoka, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 646-654.

9) “Chiral Introduction of Positive Charges to PNA for Double-Duplex Invasion to Versatile Sequences”, T. Ishizuka, J. Yoshida, Y. Yamamoto, J. Sumaoka, T. Tedeschi, R. Corradini, S. Sforza, **M. Komiyama**, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1464-1471.

ホームページ等

<http://www.mkomi.rcast.u-tokyo.ac.jp/index.html>