

科学研費補助金研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：新学術領域研究（研究課題提案型）

研究期間：2009～2011

課題番号：21200058

研究課題名（和文） DNA相同組換え制御系を利用した人工タンパク質作製技術の構築

研究課題名（英文） A novel technique producing hybrid proteins by using homologous recombination in vitro

研究代表者

美川 務 (MIKAWA TSUTOMU)

独立行政法人理化学研究所・遺伝制御科学特別研究ユニット・専任研究員

研究者番号：20321820

研究成果の概要（和文）：本研究課題の目的は、試験管内で相同組換えを制御して利用することにより、人工的に新規遺伝子、新規タンパク質を創出する基盤技術を構築することである。そこで本課題では、まず相同組換えに必要と考えられるすべてのタンパク質群の大量調製を行った。続いて、それらタンパク質群を用いて、相同組換えの素過程を試験管内に再構成し、その最適化を図った。そして最終的には、すべてのタンパク質群を試験管内に混合し、相同組換え系全体を再構成することに成功した。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study is to reconstitute homologous recombination in vitro, which can be used to produce hybrid genes and proteins. In this study, all proteins which participate in homologous recombination were prepared. Using these proteins, each step of homologous recombination was reconstituted in vitro. After optimization of each step, whole homologous recombination system was successfully reconstituted in vitro.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 8,400,000 | 2,520,000 | 10,920,000 |
| 2010年度 | 7,700,000 | 2,310,000 | 10,010,000 |
| 2011年度 | 7,700,000 | 2,310,000 | 10,010,000 |
| | | | |
| | | | |
| 総計 | 23,800,000 | 7,140,000 | 30,940,000 |

研究分野：タンパク質科学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：バイオテクノロジー、タンパク質工学、タンパク質

1. 研究開始当初の背景

有性生殖において、父方、母方由来の遺伝子を混合するDNA相同組換え（相同組換え）は、卵や精子などの配偶子を形成する際に必

ず行われ、生命に遺伝的多様性を付与する重要な生命現象である。この反応は時に互いに似た配列を持つ領域でDNAを組換え、DNAに含まれる情報を混合し、新しい遺伝子、新し

いタンパク質を創製する。現代まで動植物の新しい品種などを生み出してきた交配や育種技術は、まさにこの現象を利用したものといえる。さらに研究開始当時においては、生誕時には持ち得ない抗体に対応する遺伝子も、相同組換えによって創出されることが明らかになっており (Nature Biotech., 23, 731-735, 2006)、相同組換え反応が、もともと存在する遺伝子同士を掛け合わせ、新しい機能を持った遺伝子やタンパク質の創出に直結した非常に重要な現象だと考えられるようになっていた。

2. 研究の目的

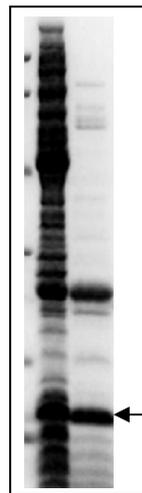
本研究課題の目的は、試験管内で上述の相同組換えを制御して利用することにより、人工的に新規遺伝子、新規タンパク質を創出する基盤技術を構築することであった。この技術の確立は、世の中に存在しない新たな生理活性分子や酵素を創出することを意味しており、医学、農学、生物学など多分野においてブレークスルーになることは間違い無いと考え、その発案に至った。

当時は、上述の相同組換えを模して新しい遺伝子を人工的に創出するというと、PCR を利用したキメラ遺伝子 (由来が異なる複数の遺伝子から構成されるハイブリッド遺伝子) の作製があげられることが多かった。この方法でも、新しい形質を持ったタンパク質を探索することは不可能ではなかったが、非効率で、ブレークスルーを生み出す手法にはなっていない。実は、PCR がまだ一般的でない時代にはキメラ遺伝子は相同組換えを利用して作製されていた (J. Mol. Biol., 226, 651-660, 1992)。これは、混ぜ合わせた一対の似た遺伝子をプラスミドにのせて大腸菌内に挿入し、大腸菌内で大腸菌が自然に行う相同組換えを利用するというものであった。しかしながら、本手法は生細胞を用いた DNA 組換え実験を伴うため、バイオエンジニアリングなどの分野で活用されることなく PCR に取って代られるようになった。

研究開始当初、細胞内での相同組換えに関与するタンパク質群とその機能が明らかになりつつあり、試験管内で相同組換えを効率よく起こせる可能性が見えてきていた。そこで、本研究課題では、相同組換えに必要なすべてのタンパク質群を試験管内に混合し、試験管内で相同組換えを起こすことを大きな目的とした。

3. 研究の方法

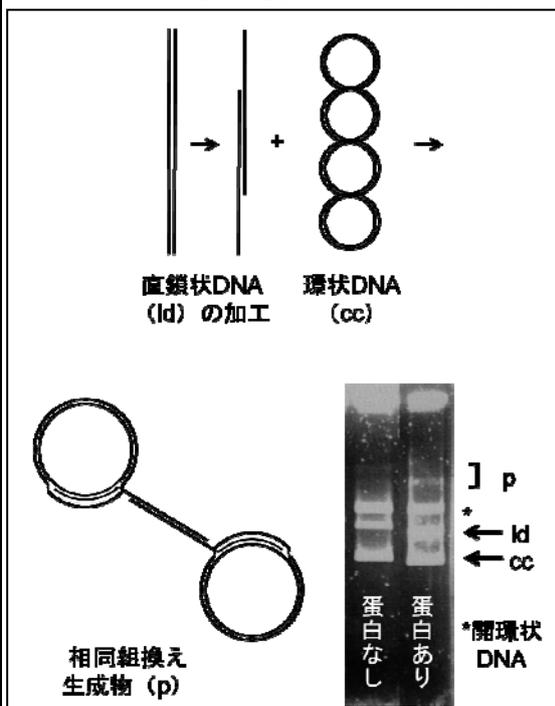
本研究課題では、まず、試験管内での相同組換えに必要なと考えられるタンパク質群 (RecA, RecF, RecJ, RecO, RecQ, RecR, RecX,



RuvA, RuvB, RuvC, SSB, DNA ポリメラーゼ, DNA リガーゼなどを全て単離精製する必要があった。その際、常温下の試験管内で相同組換えを進行させること、また、将来的には産業的にも応用することを考慮し、使用するタンパク質は常温で安定であり、精製が容易で大量調製しやすい高度好熱菌 *Thermus thermophilus* (tt) 由来のものを採用した (好熱菌タンパク質は大腸菌内で大量発現させた後、熱処理で大半の大腸菌由来のタンパク質を除くことが可能である、左図、レーン 1 : 菌体破砕液, レーン 2 : 熱処理後の上清, 矢印 : ttRecX)。

タンパク質の精製が完了次第、それらタンパク質による試験管内での相同組換え反応を各ステップに分割して観察した。その際、タンパク質濃度や濃度比などを変化させ、その最適化を行なっていった。同時に、機能を欠損させた各タンパク質の変異タンパク質を調製し、それらを系に添加するなどして反応の可逆性を抑制し、これら相同組換え系の綿密な制御法に対する知見を得た。

最終的に、すべてのタンパク質群を一同に試験管内に混合し、相同組換え反応全体の再構成を試みた。モデル系としてプラスミド DNA を使用し、組換えられる方を直鎖状二本鎖 DNA、組換えられる DNA に配列を提供するテンプレートとして環状二本鎖 DNA を用意した (下図参照)。RecJ, SSB を用いて直鎖状二



本鎖 DNA の末端を 3 端突出単鎖 DNA に加工し、そこに 3 端突出単鎖 DNA 領域を相同な二本鎖 DNA に対合させる活性を持つ RecA、また SSB で覆われた単鎖 DNA 領域を RecA に受け渡す役割を持つ RecF、RecO、RecR を加え、その試験管内での生成物をアガロース電気泳動により解析した。

4. 研究成果

試験管内相同組換えに必要と考えられるタンパク質群 (RecA, RecF, RecJ, RecO, RecR, RecX, SSB) の大量調製に成功し、1) RecJ, SSB を用いて試験管内で二本鎖 DNA を 3 端突出単鎖 DNA へ加工することに成功した (上述のアガロース電気泳動において、蛋白ありのレーンの直鎖上 DNA が蛋白なしのレーンのものよりも短くなっているのは、直鎖上 DNA が 3 端突出単鎖 DNA へ加工されたためである)。2) その際、必要と考えられていたヘリカーゼは必要ないことを明らかにした。3) RecO, RecR を用いて、SSB で覆われた単鎖 DNA 領域を RecA に受け渡すことに成功した。4) その際、必要と考えられていた RecF も必要でないことを明らかにした。さらに、5) これら素過程を詳細に解析し、各過程における最適なタンパク質の濃度比の決定に成功した。最終的にすべてのタンパク質を試験管内に混合し、6) 直鎖状二本鎖 DNA の両 3 端突出単鎖 DNA 領域がそれぞれ環状二本鎖 DNA の相同領域に対合した、三量体プラスミド DNA の生成に成功した (アガロース電気泳動の図参照)。このことは、試験管内に用意した二対の DNA 間で相同組換えが生じたことを示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- (1) Yoshinori Shingu, Takeshi Tokai, Yasuo Agawa, Kentaro Toyota, Selina Ahamed, Makiko Kawagishi-Kobayashi, Akira Komatsu, Tsutomu Mikawa, Masa-Toshi Yamamoto, Kyo Wakasa, Takehiko Shibata and Kohji Kusano, The double-stranded break-forming activity of plant SPO11s and a novel rice SPO11 revealed by a Drosophila bioassay, BMC molecular biology, 査読有, vol.13, 2012, pp. 1
- (2) Naoto Arai, Wataru Kagawa, Kengo Saito, Yoshinori Shingu, Tsutomu Mikawa, Hitoshi Kurumizaka and Takehiko Shibata, Vital Roles of the Second DNA-binding Site of Rad52 Protein in Yeast Homologous

Recombination, Journal of Biological Chemistry, 査読有, Vol.286, No.20, 2011, pp.17607-17617

- (3) Jin Inoue, Takayuki Nagae, Masaki Mishima, Yutaka Ito, Takehiko Shibata and Tsutomu Mikawa, A mechanism for SSB displacement from single-stranded DNA upon SSB-RecO interaction, Journal of Biological Chemistry, 査読有, Vol.286, No.8, 2011, pp.6720-6732
- (4) Feng Ling, Tsutomu Mikawa and Takehiko Shibata, Enlightenment of yeast mitochondrial homoplasmy: diversified role of gene conversion, Genes, 査読有, Vol.2, 2011, pp.169-190
- (5) Teppei Ikeya, Atsuko Sasaki, Daisuke Sakakibara, Yoshiki Shigemitsu, Junpei Hamatsu, Tomomi Hanashima, Masaki Mishima, Masatoshi Yoshimasu, Nobuhiro Hayashi, Tsutomu Mikawa, Daniel Nietlispach, Markus Wälchli, Brian O. Smith, Masahiro Shirakawa, Peter Güntert and Yutaka Ito, NMR protein structure determination in living E. coli cells using non-linear sampling, Nature Protocols, 査読有, Vol.5, No.6, 2011, pp.1051-1060
- (6) Yoshinori Shingu, Tsutomu Mikawa, Mariko Onuma, Takashi Hirayama and Takehiko Shibata, A DNA-binding surface of SPO11-1, an Arabidopsis SPO11 orthologue required for normal meiosis, FEBS journal, 査読有, Vol.277, No.10, 2010, pp.2360-2374
- (7) 柴田 武彦, 美川 務, 相同DNA組換えの機構理解から新規蛋白質創出へ、酵素工学ニュース, 査読有, Vol.63, 2010, pp.16-22
- (8) Tokiha Masuda, Feng Ling, Takehiko Shibata and Tsutomu Mikawa, Analysis of DNA-binding sites on Mhr1p, a yeast mitochondrial ATP-independent homologous pairing protein, FEBS journal, 査読有, Vol.277, No.6, 2010, PP.1440-1452
- (9) Tokiha Masuda, Yutaka Ito, Tohru Terada, Takehiko Shibata and Tsutomu Mikawa, A non-canonical DNA structure enables homologous recombination in various genetic systems, Journal of Biological Chemistry, 査読有, Vol.284, No.44, 2009, pp.30230-30239
- (10) Tsutomu Mikawa, Jin Inoue and Yasushi Shigemori, Single-stranded DNA binding protein facilitates specific enrichment of circular DNA molecules using rolling circle amplification, Analytical biochemistry, 査読有, Vol.391, No.2, 2009, pp.81-84
- (11) Takako Ishida, Yoshimasa Takizawa,

Takashi Kainuma, Jin Inoue, Tsutomu Mikawa, Takehiko Shibata, Hidekazu Suzuki, Satoshi Tashiro and Hitoshi Kurumizaka, DIDS, a chemical compound that inhibits RAD51-mediated homologous pairing and strand exchange, *Nucleic Acids Research*, 査読有, Vol. 37, No. 10, 2009, pp. 3367-3376
(12) 美川 務, RecA-based PCRの開発と応用, 月刊バイオインダストリー, 査読有, Vol. 26, 2009, pp. 58-64
(13) Tsutomu Mikawa, Masayuki Ikeda and Takehiko Shibata, Epitope mapping by region-specified PCR-mutagenesis, *Methods in Molecular Biology*, 査読有, Vol. 524, 2009, pp. 305-313

[学会発表] (計 38 件)

(1) 井上 仁, Reconstitution of homologous recombination in vitro by using *Thermus thermophilus* RecF pathway proteins, 第 33 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 16 日, 神奈川県横浜市
(2) 奥居 沙弥, A novel mechanism for the inhibition of RecA filament extension by RecX, 第 33 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 15 日, 神奈川県横浜市
(3) 新井 直人, 出芽酵母 Rad52-Rad51 による D-loop 形成における Rad52 の C 端ドメインの必要性, 第 33 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 15 日, 神奈川県横浜市
(4) 篠原 赴, Analysis of the functions of recombination mediators in homologous pairing, 第 33 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 15 日, 神奈川県横浜市
(5) 美川 務, Local folding of the N-terminal domain of RecA upon protein-protein / protein-DNA interactions and its role, 第 33 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 14 日, 神奈川県横浜市
(6) 重森 康司, 酵素結晶固定化電極を用いたバイオ電池の高出力化, 第 33 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 13 日, 神奈川県横浜市
(7) 井上 仁, バクテリアにおける DNA 組換え修復系, 第 21 回 DNA 複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ, 2011 年 10 月 25 日, 福岡県福津市
(8) 美川 務, 天然変性領域としての RecA の N 末端ドメイン: その機能と役割, 第 84 回日本生化学会大会, 2011 年 9 月 23 日, 京都府京都市
(9) 井上 仁, 高度好熱菌蛋白質を用いた in vitro DNA 相同組換えの再構築, 第 1 回モデル生物丸ごと一匹学会, 2011 年 8 月 20 日, 兵庫県佐用郡

(10) 奥居 沙弥, RecA の組換え反応に対する RecX の阻害機構, 第 1 回モデル生物丸ごと一匹学会, 2011 年 8 月 19 日, 兵庫県佐用郡
(11) 篠原 赴, 組換えメディエーターによる D-loop 反応制御, 第 1 回モデル生物丸ごと一匹学会, 2011 年 8 月 19 日, 兵庫県佐用郡
(12) 井上 仁, 蛋白質間相互作用により生じる単鎖 DNA 結合蛋白質 (SSB/RPA) の ssDNA からの解離の一般的機構, 第 11 回日本蛋白質科学会年会, 2011 年 6 月 8 日, 大阪府吹田市
(13) 井上 仁, Displacement mechanism for SSB from single-stranded DNA by a recombination mediator: SSB-RecO interaction at the atomic resolution, International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities, 2011 年 1 月 24 日, 兵庫県淡路市
(14) 新井 直人, 出芽酵母 Rad51 による D-loop 形成促進のための Rad52 第二 DNA 結合部位の機能, 第 28 回染色体ワークショップ, 2011 年 1 月 12 日, 石川県加賀市
(15) 柴田 武彦, Mitochondrial DNA homoplasmy as gene homogenization of repeated sequences by rolling circle replication, 7th ASMRM and 10th J-mit, 2010 年 12 月 16 日, 福岡県福岡市
(16) 井上 仁, ssDNA 上での SSB の置換における SSB-蛋白質相互作用の役割, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (BMB2010), 2010 年 12 月 9 日, 兵庫県神戸市
(17) 増田 ときは, RecA/Rad51 ファミリーのフィラメント形成は相同 DNA 対合反応には必要ない, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (BMB2010), 2010 年 12 月 7 日, 兵庫県神戸市
(18) 新井 直人, 出芽酵母 Rad52 の第二 DNA 結合部位も相同組換えに必要である, 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 (BMB2010), 2010 年 12 月 7 日, 兵庫県神戸市
(19) 井上 仁, A mechanism for SSB displacement from single-stranded DNA upon SSB-protein interaction, The 7th International 3R Symposium, 2010 年 10 月 27 日, 富山県富山市
(20) Tokiha Masuda, A mechanism of DNA homology search, based on the structure of DNA bound to proteins that promote homologous recombination, The 12th IUBMB (OzBio2010), 2010 年 9 月 27 日, Melbourne, Australia
(21) 井上 仁, A general mechanism for SSB displacement from ssDNA upon SSB-protein interaction, 「高度好熱菌丸ごと一匹プロジ

エクト」第9回連携研究会、2010年8月20日、兵庫県佐用郡

(22) 篠原 昶、Direct interaction of RecO with RecA is involved in regulation of RecA function、「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第9回連携研究会、2010年8月20日、兵庫県佐用郡

(23) 奥居 沙弥、Analysis of the inhibition mechanism of extension of RecA filament by RecX、「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第9回連携研究会、2010年8月20日、兵庫県佐用郡

(24) Tsutomu Mikawa、The universal DNA structure in homologous recombination、The24th Symposium of the Protein Society、2010年8月3日、San Diego, CA, USA

(25) 柴田 武彦、相同組換え開始制御に働く天然変性タンパク質の機能、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月18日、北海道札幌市

(26) 井上 仁、SSB-C 末端酸性領域と RecO の相互作用による SSB の ssDNA からの解離機構の解明、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月17日、北海道札幌市

(27) 笠置 原央、RecA はなぜフィラメントを形成する必要があるのか? -単量体及び二量体の活性をもとに-、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月17日、北海道札幌市

(28) Yoshinori Shingu、A novel rice SPO11homologue, SPO11D, induces meiotic chromosome aberration and DNA double-stranded breaks in the fruit-fly、EMBO Conference Series on Recombination & Connections to SUMO and Ubiquitin Modifications、2010年5月19日、Lucca, Italy

(29) 柴田 武彦、相同 DNA 組換えにおける2種の相同 DNA 対合蛋白質の役割分担、第27回染色体ワークショップ、2010年1月22日、静岡県御殿場市

(30) 新宮 良宣、イネの減数分裂組換え開始酵素「Spo11」、第27回染色体ワークショップ、2010年1月22日、静岡県御殿場市

(31) 増田 ときは、The universal structure of ssDNA in homologous recombination、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、神奈川県横浜市

(32) 奥居 沙弥、RecA に対する RecX の阻害効果は種特異的である、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、神奈川県横浜市

(33) 井上 仁、NMR analyses of interactions of RecO with SSB and ssDNA、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、神奈川県横浜市

(34) 笠置 原央、RecA の最小機能単位 -単

量体及び二量体の活性-、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、神奈川県横浜市

(35) 新井 直人、出芽酵母 Rad52-Rad51 複合体による D-loop 形成において Rad52 は二本鎖 DNA の結合に働く、第32回日本分子生物学会年会、2009年12月11日、神奈川県横浜市

(36) 柴田 武彦、相同 DNA 組換えにおける天然変性領域の機能、第82回日本生化学会大会、2009年10月21日、兵庫県神戸市

(37) 美川 務、Thermus thermophilus HB8 の DNA 相同組換え系、「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第8回連携研究会、2009年8月22日、兵庫県佐用郡佐用町

(38) 井上 仁、Identification of the SSB binding site on RecO by NMR analysis、「高度好熱菌丸ごと一匹プロジェクト」第8回連携研究会、2009年8月22日、兵庫県佐用郡佐用町

〔産業財産権〕

○出願状況 (計2件)

1. 名称: 酵素結晶固定化電極及び酵素結晶固定化電極の製造方法、並びにこれを備えるバイオ燃料電池及びバイオセンサー

発明者: 重森康司、美川 務

権利者: (独) 理化学研究所、アイシン精機(株)

種類: 国際特許

番号: PCT/JP2011/069060

出願年月日: 2011年8月24日

国内外の別: PCT

2. 名称: 酵素結晶固定化電極及び酵素結晶固定化電極の製造方法、並びにこれを備えるバイオ燃料電池及びバイオセンサー

発明者: 重森康司、美川 務

権利者: (独) 理化学研究所、アイシン精機(株)

種類: 特許

番号: 特願 2010-189788

出願年月日: 2010年8月26日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計2件)

1. 名称: 高度好熱菌由来の改変型一本鎖 DNA 結合タンパク質、及び該タンパク質を用いた核酸の等温増幅方法

発明者: 美川 務、柴田武彦、重森康司

権利者: (独) 理化学研究所、アイシン精機(株)

種類: 特許

番号：特許 4860199
取得年月日：2011年11月11日
国内外の別：国内

2. 名称：高度好熱菌由来の改変型一本鎖 DNA
結合タンパク質、及び該タンパク質を用いた
核酸の等温増幅方法

発明者：美川 務、柴田武彦、重森康司
権利者：(独) 理化学研究所、アイシン精機
(株)

種類：特許
番号：US Patent 7973131
取得年月日：2011年7月5日
国内外の別：米国

6. 研究組織

(1) 研究代表者

美川 務 (MIKAWA TSUTOMU)
独立行政法人理化学研究所・遺伝制御科学特
別研究ユニット・専任研究員
研究者番号：20321820

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし