

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料
〔研究進捗評価用〕

平成22年度採択分

平成25年5月28日現在

研究課題名（和文） **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**
研究課題名（英文） **CREATION OF GENOME MANIPULATION TECHNOLOGY
USING SUPER RESTRICTION ENZYME**

研究代表者

小宮山 眞 (KOMIYAMA MAKOTO)

筑波大学・生命領域学際研究センター・教授



研究の概要：すでに我々は、純粋な化学ツールであるスーパー制限酵素（ARCUT）を開発し、DNA を所定の位置で選択的に切断することに成功した。選択的切断の位置と特異性は、使用目的に沿って自在に設計できる。本研究では、このツールを用いて、ヒトをはじめとする高等生物の巨大ゲノムを自在に操作する手法を開発することを目的とした。

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：ゲノム、マニピュレーション、スーパー制限酵素

1. 研究開始当初の背景

生物のゲノムを自在に操作できれば、医学や生物学のみならず幅広い応用が期待される。しかし、天然の制限酵素では認識の特異性が低いために、巨大なゲノムを所定位置で選択的に切断できない。そこで、「どのように巨大な DNA でも望み通りに切断できる人工ツール」の開発が強く望まれていた。我々はすでに、人工核酸であるペプチド核酸（PNA）と Ce(IV)/EDTA 錯体より、DNA を所定位置で選択的に切断するスーパー制限酵素 ARCUT を世界に先駆けて開発した。

2. 研究の目的

本研究では、化学ツール ARCUT を用いて、ヒトをはじめとする高等生物のゲノムを操作する技術の創成を追究する。すなわち、ゲノムから所定の断片を自在に取得する技術、ならびにゲノムを望み通りに改変する技術を確立し、関連科学の進歩に寄与することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

ARCUT の調製、ならびにこれを用いる DNA 切断は、すでに我々が確立した手法で行った。またヒト細胞の培養、ゲノム抽出、切断の解析評価などはいずれも常法によった。

4. これまでの成果

(1) ヒトゲノムからの所定部分の切り出し
ヒトゲノムを ARCUT で所定の位置で選択的に切断し、所望の DNA 断片を切り出す手法

を追究した。今回は、主たる切り出し対象として、ガンや老化との深い関わりで注目されているテロメアを選択した。ARCUT がヒトゲノムのどの位置でも選択的に切断できるという特性を活用し、ヒト細胞中のそれぞれの染色体から別々にテロメアを取得した（図1）。テロメアはどの染色体でも全て同じ配列である（ヒトの場合は(TTAGGG)_n 配列の繰り返し）が、この繰り返しが終了した場所の配列はそれぞれの染色体に固有であるので、ここを選択的切断のターゲットとした。それぞれの染色体に対応した ARCUT を調製し、ヒト細胞から抽出した全ゲノムを処理して当該テロメアを入手した。その結果、例えば、染色体 11q のテロメアは、性染色体 Xp/Yp のテロメアよりも 1.6 倍も長いことが分かった。染色体ごとにテロメアの長さが異なるということは従来の常識とは大きく異なる事象である。これらのサンプルをより詳細に解析してメチル化を含めた種々のエピゲノム情報を取得することにより、テロメアに関する理解が格段に深まるものと期待される。

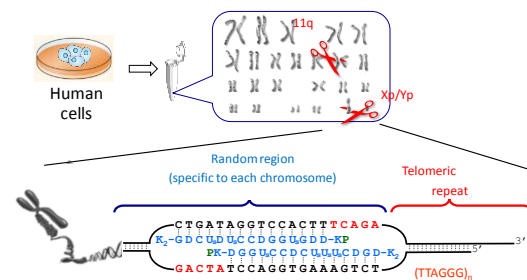


図1 ヒトの各染色体のテロメアを選択的に取得するためのARCUT

(2) ヒト細胞内でのゲノム改変 ヒト細胞内における ARCUT の機能を追究した結果、

(i) この人工ツールが細胞内で相同組換えを誘導すること、(ii) 選択的切断位置に大きなサイズの遺伝子でも正確に挿入できること、(iii) 相同組換え効率が DNA ドナーの長さに顕著に依存すること、(iv) 細胞周期を制御することで相同組換え効率が向上できることなどが明らかとなった。そこで、ヒト細胞のゲノムに青色蛍光タンパク質の遺伝子を導入し、その発色団形成部位を ARCUT で切断し、相同組換えにより緑色蛍光タンパク質型に変換する系を構築した。ARCUT の構成成分 (PNA と Ce(IV)/EDTA) とドナー-DNA をエレクトロポレーションでヒト細胞に導入したところ、緑色蛍光を発するヒト細胞が生成した。導入したドナー-DNA は単独で発現することではなく、また ARCUT なしではヒト細胞内での相同組換えはほとんど進行しない。このように、ヒト細胞内で目的の相同組換えを進行させ、ゲノム中の所定の遺伝子の配列を望みの塩基配列に変換することに成功した。ただし、組換え効率は、細胞の種類や細胞周期、ARCUT の導入時期、導入方法をはじめとする様々な要因にかなり依存しており、これを正確に制御するのが現在の緊急課題である。

(3) 第2世代 ARCUT の開発 ARCUT は選択的切断の対象となる塩基配列の自在性が特徴であるが、それでも一部の配列は認識が困難であった。そこで、DNA 認識部位を工夫することにより、(i) 極端に GC リッチな配列、ならびに (ii) ホモプリン・ホモピリミジン配列を切断できる第2世代ツールを開発した。こうして、ヒトゲノムの中のほぼすべての配列を認識して切断できるようになった。また、PNA に核局在化シグナル・ペプチドを結合することにより、DNA 切断能を一層向上するとともに、細胞内で核に局在化して有効にゲノムの所定部位を切断するように改良した。

(4) その他の関連技術 ゲノムを対象とするマニピュレーションでは、1 個の細胞の中には当該 DNA 断片は 1 分子しか存在しない。そこで、切断断片の分析操作の精密化を追究し、DNA オリガミ技術を活用して単分子検出手法を開発した。

5. 今後の計画

(1) ゲノムの所定断片の取得法の確立 ARCUT による切断断片を効率的に分離する方法を確立するとともに、ゲノム断片を詳細に解析する。正常なヒト組織細胞からテロメアサンプルを調製し、「テロメアの長さは染色体により異なる」という結論の普遍性を明らかにする。また、サンプルのメチル化について解析する。さらに、タンパク質や

non-coding RNA とゲノム断片との複合体をゲノムより取得して解析する。

(2) ヒト細胞内における相同組換え 組換え効率を支配する因子を特定する。また、これまでに開発した第2世代 ARCUT を活用して効率の向上を図る。こうして、安定した効率で相同組換えを起こす系を構築し、ゲノム科学の進展における ARCUT の有用性を実証する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)
(研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

- 1) T. Ishizuka, Y. Xu, M. Komiyama. "A Chemistry-Based Method to Detect Individual Telomere Lengths at a Single Chromosome Terminus", *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 14-17 (2013).
- 2) T. Ishizuka, M. Komiyama, Y. Xu. "G-rich Sequence-specific Recognition and Scission of Human Genome by PNA/DNA Hybrid G-quadruplex Formation", *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 7198-7202 (2012).
- 3) H. Katada, T. Harumoto, N. Shigi, M. Komiyama. "Chemical and biological approaches to improve the efficiency of homologous recombination in human cells mediated by artificial restriction DNA cutter", *Nucleic Acids Res.*, **40**, e81 (2012).
- 4) T. Yamazaki, Y. Aiba, K. Yasuda, Y. Sakai, Y. Yamanaka, A. Kuzuya, Y. Ohya, M. Komiyama. "Clear-cut Observation of PNA Invasion using Nanomechanical DNA Origami Devices", *Chem. Commun.*, **48**, 11361-11363 (2012).
- 5) Y. Aiba, T. Lönnberg, M. Komiyama. "Manipulation of single-stranded DNA using artificial site-selective DNA cutter composed of Ce(IV)/EDTA and phosphonate-oligonucleotide conjugates", *Chem. Asian J.* **6**, 2407-2411 (2011).
- 6) A. Kuzuya, Y. Sakai, T. Yamazaki, Y. Xu, M. Komiyama. "Nanomechanical DNA Origami 'Single-Molecule Beacons' Directly Imaged by Atomic Force Microscopy", *Nature Commun.*, **2**, 449 (2011)

受賞等: (1) 小宮山 眞、日本化学会賞 (2011 年)。(2) 小宮山 眞、高分子学会高分子功績賞 (2011 年)。

ホームページ

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