

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410171

研究課題名(和文) DNA結合ドメインの特長を生かしたDNA修飾酵素の開発とゲノム編集への応用

研究課題名(英文) Development of DNA modification enzymes based on sequence-specificity of DNA binding domains and their application for genome editing.

研究代表者

野村 渉 (Nomura, Wataru)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：80463909

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：CRISPR-Cas9などのゲノム編集技術の発展に伴い、ヒトゲノムへの理解を深化させる多様なゲノム機能改変ツールに関心が高まっている。分割型DNAメチル化酵素の酵素活性に与えるDNA結合活性の影響を明らかにし、酵素活性の向上につながる知見を得ることを目的とした。会合状態の分子モデリングよりZFPおよび分割型ドメイン同士が立体障害を起こす可能性が示唆された。標的配列上での会合様式やZFPと酵素ドメインを繋ぐリンカーの長さが与える酵素活性への影響について様々な変異体を用いて活性を評価した。異なるDNA鎖上に標的配列がある場合に高い活性を示し、複合体モデルからも実験結果を支持するデータが得られた。

研究成果の概要(英文)：Improvement of genome editing tools such as CRISPR-Cas9 system leads to the increased demands for other gene modification tools such as DNA recombination and methylation. The split DNA methylase bearing split M.HhaI domains and zinc finger domains show the potential for the highly specific DNA methylation. Structural modelling study suggested that the DNA-split methylase complex could contain steric hindrance in some parts. Thus altered DNA assembly of split methylase on the target gene and several linker mutations were tested to obtain the increased activity in DNA methylation without losing sequence specificity. As the results, the assembly pattern in which ZFPs bind to the different strand on the target DNA showed increased activity in DNA methylation. In addition, the extension of linker length between the domains also affected on the increased activity. Above all, the results give new insights into the assembly of split protein domains especially on the target DNA.

研究分野：生物化学

キーワード：タンパク質 メチル化 人工酵素 エピゲノム編集 核酸 ケミカルバイオロジー 合成生物学

1. 研究開始当初の背景

2003年のヒトゲノム全塩基配列の解読終了に始まるポストゲノム時代を迎えて以来、ゲノム情報を利用した医学研究、創薬(医薬品開発)研究が活発化してきている。ゲノム情報が広く汎用されている現在、ゲノムそのものを対象とした研究にも大きな関心が集まっている。例として、基礎医学研究においては新たな効率的な遺伝子編集方法を活用したノックアウト個体の作製方法などを利用することでこれまででは想像できないスピードと低いコストで個体の樹立が可能になりつつある。また、新興研究分野である Synthetic Biology または Synthetic Cell Biology の研究分野では、細胞を部品の集合であると考え、それらの部品を人工的なものに置き換えてみる、もしくは完全な人工物で集合体(細胞・広い意味での生物)を組み上げようという研究が行われているが、その中でも新たな遺伝子編集方法を利用した人工遺伝子回路の組み込みなどの試みが始められている。国外(欧米)ではこうした遺伝子編集方法に関するコンソーシアムがいくつも立ち上げられ、研究者間の連携を深める会合の開催も増えてきた。国内においても遺伝子編集方法の活用に関しては報告例が増えてきており、特に遺伝子機能解析を行う研究者の利用がさらに増えると予想される。この新たな遺伝子編集方法は主にジンクフィンガータンパク質と呼ばれる DNA 結合タンパク質を DNA 結合ドメインとして利用し、制限酵素 *FokI* の酵素ドメインとの融合タンパク質としたジンクフィンガーヌクレアーゼ(Zinc Finger Nuclease: ZFN)を用いる。ZFN はジンクフィンガードメインの DNA 配列特異的な結合様式を活用することで、標的とする遺伝子配列に変異を導入し、遺伝子機能の破壊(ノックアウト)を行うことができる。2005年以降、ZFN の細胞、個体での応用に関する研究が爆発的に増加している。また、ZFN に関してその DNA 結合様式の解析や DNA 結合親和性と DNA 切断活性の相関性について研究が国内外で進んでいる。本研究はそのような人工的なタンパク質設計による DNA 修飾酵素(DNA 切断・メチル化酵素)について、現在研究分野全体が直面している課題である酵素活性の効率化や非特異的な相互作用などによる off-target 効果の対策などを解決するために DNA 結合活性と酵素活性の相関と最適化に関して基盤構築を行う。

2. 研究の目的

ジンクフィンガー融合型 DNA 修飾酵素ではジンクフィンガードメインの DNA 認識パターンが完全でなく、配列によっては酵素の効率的な構築は難しかった。TALE ドメインは、ジンクフィンガーとはまったく異なる DNA 結合様式ながら、同様に認識ユニットとなるモジュール構造を連結することで標的配列に特異的に結合するドメインを構築できることが示唆されている。ヌクレ

ーゼに関しては TALE ドメインを用いた TALE ヌクレアーゼ(TALEN)に関する報告がされ始めており、ZFN よりも高い効率での変異導入と遺伝子ノックアウトが可能な例も示されている。しかし、それがどのような分子メカニズムによるのか明確になっていない。ZFN および TALEN について、同じ標的配列に作用するジンクフィンガーおよび TALE ドメインを構築し、DNA 結合を解析することで、分子メカニズムを明らかにする。また、DNA メチル化酵素に関して、DNA 結合ドメインに TALE ドメインを用いた分割型 DNA メチル化酵素(図 1)を構築し、DNA 結合の特性の違いによってメチル化反応にどのような影響があるか解析する。そのうえで、哺乳類細胞内で作用する DNA メチル化酵素の構築に取り組む。

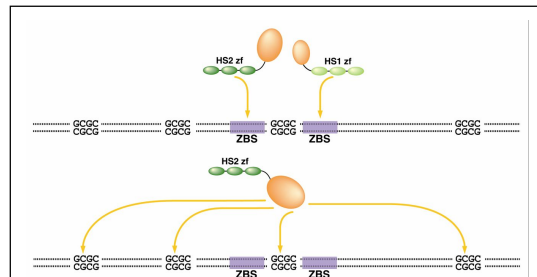


図 1. 分割融合型メチル化酵素(上)と融合型メチル化酵素(下)の機能比較について。分割融合型メチル化酵素ではジンクフィンガー結合サイト(ZBS)のみで酵素ドメインが会合しメチル化を行う。

本研究では今後遺伝子修飾・編集技術において主役になると考えられるジンクフィンガードメインと TALE ドメインについて、修飾酵素の DNA 結合ドメインとして用いた場合の違いに関する知識の体系化に取り組む。特に TALE ドメインを用いた DNA 修飾酵素は DNA 切断酵素に関する報告が徐々に増えているが、組換え酵素に関しては2012年に第一報が報告されたばかりである。DNA メチル化酵素に関してはこれまでに報告はない。応募者がこれまでに取り組んできたジンクフィンガードメインを利用したメチル化酵素の開発で得られた知識を利用することで、国内外の他の研究グループに先んじて開発を進める。応募者は酵素ドメインを分割化し、DNA 結合で酵素活性を制御できる DNA メチル化酵素を2007年に世界で初めて報告している。この DNA メチル化酵素は遺伝子の発現制御に重要なメチル化反応を標的配列特異的に行える酵素として注目されている。哺乳類細胞のゲノム遺伝子に対する DNA メチル化反応を行うには酵素活性の最適化が重要になる。ジンクフィンガードメインと異なる DNA 結合ドメインを併用することで、それぞれの特長を利用してこれまで未解決の課題もクリアできることが期待できる。

3. 研究の方法

酵素活性の検討には、より汎用性の高いヌクレ

アーゼと、哺乳類細胞内で活性を有する場合にエピジェネティクス研究に有用になるメチル化酵素を対象とする。初年度は TALE ドメインの構築と DNA 結合カイネティクス評価を行う。また、TALE を DNA 結合ドメインとする分割型 DNA メチル化酵素の構築も行う。次年度はジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) および TALE ヌクレアーゼの構築を行う。構築した酵素に関しては大腸菌内、および *in vitro* 翻訳系を用いた試験管内での活性評価を行う。特に TALE ドメインを用いた酵素に関しては DNA 結合カイネティクスの詳細な解析が行われていないことから、これまで応募者が推進してきたジンクフィンガードメインを用いた酵素を対照とすることで、ゲノム編集・修飾反応を行う場合に用いる酵素の理解を深化する。それらの結果から DNA 結合活性と酵素活性の相関関係について定量的に解析を行い、法則性を明らかにする。それらから、最終年度において最も活性の良い設計の酵素を用いることで哺乳類細胞内での活性評価を行う。結果をフィードバックすることでさらに良いデザインの酵素の構築を試みる。研究実施体制としては研究代表者がグループを総括し、3 名の大学院生が各研究項目を担当する。

4. 研究成果

CRISPR-Cas9 をはじめとするゲノム編集技術はヒトゲノムに対する理解をさらに深化させるツールとして関心が高まっている。既存の編集技術はヌクレアーゼ活性に基づく技術であるが、ジンクフィンガー融合型 DNA 修飾酵素によって配列特異的に DNA 組み換えや DNA メチル化を行える。これらはゲノム編集 / エピゲノム編集に利用できる技術として有用である。本研究では分割型 DNA メチル化酵素の酵素活性に与える DNA 結合活性の影響を明らかにすることに取り組んだ。初年度においては TALE ドメインの作製方法について効率的に構築するプロトコルを確立した。また、MBP 融合タンパク質として大腸菌内で発現し、抽出、精製を行い、各 TALE ドメインの DNA 結合活性評価を行うことを可能にした。これを利用して ASH1 エクソン領域、IL1-RN プロモーター領域を標的とする TALE を構築している。これまでに DNA 配列に応じて再会合する分割型メチル化酵素を構築し、DNA の片方の鎖に ZFP の認識配列を設定した場合にメチル化活性を示すことが確認されている。第二年度においては活性向上を目的としてこの DNA メチル化酵素の会合状態を分子モデリングで確認すると、ZFP および分割型ドメイン同士が混み合った状態で会合していることが示唆された。そこで標的配列上での会合様式や ZFP と酵素ドメインを繋ぐリンカーの長さが与える酵素活性への影響について様々な変異体を用いて明らかにし、酵素活性を最大化することを目指した。ZFP には 9 塩基を認識する結合親和性が明らかな HS1、HS2 を用いた。また分割型メチル化酵素ドメインには HhaI

methyltransferase (M.HhaI) を基に、アミノ酸配列を 1-240 (N 末端ドメイン) および 210-327 (C 末端ドメイン) に分割し、各 ZFP と異なる長さのリンカーで繋いだ組み合わせを用意してメチル化効率を大腸菌内で評価した。発現プラスミド pAra に分割型メチル化酵素ドメインの各遺伝子と標的配列を導入し、大腸菌内に形質転換後、一定培養時間を経てプラスミドを回収した。メチル化感受性制限酵素 HhaI によるプラスミド切断でメチル化反応効率を算出した。次にシトシンをウラシルに変換するパイサルファイト反応を行い、標的配列上でのメチル化を確認した。その結果、異なる DNA 鎖上に標的配列がある場合に高い活性を示すことが示され、複合体モデルからも実験結果を支持するデータが得られた。そこで分割型 DNA メチル化酵素について体系的に活性向上に必要な要素を抽出するために最終年度ではリンカーの長さやスペーサー配列の長さ特に焦点を当て、それまでに構築した酵素の変異体に加えてリンカーのバリエーションを増やした種々の変異体を構築し、異なるスペーサー配列に対する DNA メチル化活性の評価を行った。DNA メチル化酵素の活性向上において宵結果を得られたため、最終年度ではジンクフィンガー融合型酵素の活性評価に注力したため TALE 融合型酵素の構築までは至らなかったが、これまで報告されていない知見が得られ、今後の TALE 融合型酵素の構築においても有用になる知見であると考えられる。よって、今回得られた知見は哺乳類細胞内で機能する分割型 DNA メチル化酵素開発の基盤となると期待される。

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 12 件)

野村 渉. 人工酵素によるゲノム編集工学とその応用、可能性. *Yakugaku Zasshi* 2015 年, 135 巻, 頁 405-414. (査読有)
野村 渉, 玉村啓和. ターゲットタンパク質を特異的に認識するプローブ. *化学工業* 2014 年, 65 巻, 頁 8-14. (査読有)
Ohashi N, Nomura W, Minato N, Tamamura H. Screening for Protein Kinase C Ligands Using Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Chem. Pharm. Bull.* 2014 年, 62 巻, 頁 1019-1025. (査読有)
Yamamoto J, Maeda N, Komiya C, Tanaka T, Denda M, Ebisuno K, Nomura W, Tamamura H, Sato Y, Yamauchi A, Shigenaga A, Otaka A. Development of a fluoride-responsive amide bond cleavage device that is potentially applicable to a traceable linker. *Tetrahedron* 2014 年, 70 巻, 頁 5122-5127. (査読有)
Takano H, Narumi T, Ohashi N, Suzuki A, Furuta T, Nomura W, Tamamura H.

Development of the 8-Aza-3-bromo-7-hydroxy coumarin-4-ylmethyl Group as a New Entry of Photolabile Protecting Groups. *Tetrahedron* 2014 年, 70 巻, 頁 4400-4404 .(査読有)

Yamamoto J, Denda M, Maeda N, Kita M, Komiya C, Tanaka T, Nomura W, Tamamura H, Sato Y, Yamauchi A, Shigenaga A, Otake A. Development of a Traceable Linker Containing a Thiol-responsive Amino Acid for the Enrichment and Selective Labelling of Target Proteins. *Org. Biomol. Chem.* 2014 年, 12 巻, 頁 3821-3826 .(査読有)

Hashimoto C, Narumi T, Otsuki H, Hirota Y, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Ohashi N, Nomura W, Miura T, Igarashi T, Matsushita S, Tamamura H. A CD4 mimic as an HIV entry inhibitor: Pharmacokinetics. *Bioorg. Med. Chem.* 2013 年, 21 巻, 頁 7884-7889 .(査読有)

Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Nakahara T, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. CXCR4-derived synthetic peptides inducing anti-HIV-1 antibodies. *Bioorg. Med. Chem.* 2013 年, 21 巻, 頁 6878-6885 .(査読有)

Hashimoto C, Nomura W, Narumi T, Fujino M, Tsutsumi H, Haseyama M, Yamamoto N, Murakami T, Tamamura H. Anti-HIV-1 Peptide Derivatives Based on the HIV-1 Co-receptor CXCR4. *ChemMedChem* 2013 年, 8 巻, 頁 1668-1672 .(査読有)

Nomura W, Aikawa H, Ohashi N, Urano E, Metifiot M, Fujino M, Maddali K, Ozaki T, Nozue A, Narumi T, Hashimoto C, Tanaka T, Pommier Y, Yamamoto N, Komano JA, Murakami T, Tamamura H. Cell-Permeable Stapled Peptides Based on HIV-1 Integrase Inhibitors Derived from HIV-1 Gene Products. *ACS Chem. Biol.* 2013 年, 8 巻, 2235-2244 .(査読有)

Ohashi N, Nomura W, Narumi T, Tamamura H. Peptide-Based Ligand Screening and Function Analysis of Protein Kinase C. *Biopolymers (Pept. Sci.)* 2013 年, 100 巻, 頁 613-620 .(査読有)

Nomura W, Hashimoto C, Suzuki T, Ohashi N, Fujino M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Multimerized CHR-Derived Peptides as HIV-1 Fusion Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 2013 年, 21 巻, 頁 4452-4458 .(査読有)

[学会発表](計 23 件)

Wataru Nomura, Akemi Masuda, Hirokazu Tamamura. Efficient conversion of genomic promoter region by genome engineering systems. *Pacificchem* 2015. Honolulu, USA, Dec 15-20, 2015.

Wataru Nomura, Akemi Masuda, Hirokazu Tamamura. Simultaneous digestion by

site-specific nucleases for efficient gene deletion: Study of hTERT promoter function. *Conference on Transposition and Genome Engineering* 2015. 奈良春日野国際フォーラム (奈良県・奈良市), Nov 17-20, 2015.

Wataru Nomura, Akemi Masuda, Hirokazu Tamamura. Genome Deletion by ZFN and CRISPR-Cas Targeting Promoter Region for Analysis of hTERT Function. 「細胞を創る」研究会 8.0. 大阪大学吹田キャンパス (大阪府・吹田市), 2015 年 11 月 12-13 日.

杉井太亮, 野村 涉, 玉村啓和. 人工転写因子の協奏的な働きによる遺伝子発現調節機構の構築. 第 59 回日本薬学会関東支部大会. 日本大学薬学部 (千葉県・船橋市), 2015 年 9 月 12 日.

野村 涉, 大浦伊代, 玉村啓和. 配列特異的分割型 DNA メチル化酵素の作用機構解析. 第 59 回日本薬学会関東支部大会. 日本大学薬学部 (千葉県・船橋市), 2015 年 9 月 12 日.

野村 涉. ペプチド性機能分子のデザインと応用. 第 47 回若手ペプチド夏の勉強会特別講演. アステイカタおか (長野県・塩尻市), 2015 年 8 月 11 日.

野村 涉. 遺伝子を標的とした創薬ケミカルバイオロジー研究. 長浜バイオ大学大学院講義. 長浜バイオ大学 (滋賀県・長浜市), 2015 年 8 月 10 日.

野村 涉, 増田朱美, 玉村啓和. ゲノム編集技術を用いた複数箇所切断によるプロモーター領域の配列変換. 日本ケミカルバイオロジー学会 第 10 回年会. 東北大学川内キャンパス萩ホール (宮城県・仙台市), 2015 年 6 月 10-12 日.

野村 涉. 人工 DNA 修飾酵素の構築戦略とゲノム・エピゲノム編集への展開. シンポジウム「エピゲノム創薬技術の最前線」日本薬学会第 135 年会. 神戸学院大学 (兵庫県・神戸市), 2015 年 3 月 26-28 日.

野村 涉, 増田朱美, 玉村啓和. ゲノム編集法による効率的な配列欠損反応. 細胞を創る会 7.0. 東京大学弥生講堂 (東京都・文京区), 2014 年 11 月 13-14 日.

野村 涉, 増田朱美, 玉村啓和. プロモーター領域を標的とした DNA 二重鎖切断による配列欠損反応の解析. 第 4 回ゲノム編集研究会. 広島国際会議場 (広島県・広島市), 2014 年 10 月 6-7 日.

野村 涉, 増田朱美, 玉村啓和. ゲノム編集法による複数箇所同時切断が示す配列欠損反応効率の向上. 第 8 回バイオ関連化学シンポジウム. 岡山大学津島キャンパス (岡山県・岡山市), 2014 年 9 月 11-13 日.

Wataru Nomura, Akemi Masuda, Hirokazu Tamamura. Efficient Gene Disruption at hTERT Promoter Region by Simultaneous Digestion by Pairs of ZFNs or Guide RNAs of CRISPR/Cas System. The 28th annual

symposium of protein society. San Diego, USA, Jul 27-30, 2014.

Wataru Nomura, Akemi Masuda, Hirokazu Tamamura. Efficient Gene Disruption at Specific Promoter Region by Simultaneous Digestion of ZFN or CRISPR/Cas System. The Synthetic Biology: Engineering, Evolution & Design (SEED) conference 2014. Manhattan Beach, USA, Jul 14-17, 2014.

Wataru Nomura, Akemi Masuda, Hirokazu Tamamura. Enhanced Gene Disruption by Simultaneous Digestion of ZFN or CRISPR/Cas System at hTERT Promoter Region. FASEB SRC "Genome Engineering Cutting-Edge Research and Applications. Nassau, Bahamas, Jun 22-27, 2014.

野村 涉. 人工酵素によるゲノム編集工学とその応用、可能性. シンポジウム「薬学における生命指向型化学」日本薬学会第 134 年会. ホテル日航熊本(熊本県・熊本市), 2014 年 3 月 27-30 日.

野村 涉. ジンクフィンガーからゲノム編集ツールへの展開. 2013 年東日本スクrips会. ゆうぼうと五反田(東京都・品川区), 2013 年 12 月 7 日.

野村 涉, 増田朱美, 玉村啓和. テロメラーゼプロモーター領域を標的としたゲノム編集. 細胞を創る会 6.0. 慶応大学鶴岡タウンキャンパス(山形県・鶴岡市), 2013 年 11 月 14-15 日.

Wataru Nomura, Akemi Masuda, Hirokazu Tamamura. Creation of Zinc Finger Nucleases Targeting Telomerase Promoter Region. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/the 50th Japanese Peptide Symposium. ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市), Nov 6-8, 2013.

Wataru Nomura. Development of Peptide-derived Molecular Probes and Inhibitors Based on the Interactions with Biomacromolecules. The 4th Asia-Pacific International Peptide Symposium/the 50th Japanese Peptide Symposium. ホテル阪急エキスポパーク(大阪府・吹田市), Nov 6-8, 2013.

- 21 Wataru Nomura, Akemi Masuda, Hirokazu Tamamura. DNA Modification Enzymes Utilizing Sequence-Specificity of Zinc Finger Domains. CBI 学会 2013 年大会. 船堀タワーホール(東京都・江戸川区), 2013 年 10 月 28-31 日.

- 22 Wataru Nomura, Akemi Masuda, Hirokazu Tamamura. Effects of Zinc Finger Nucleases Targeting Telomerase Promoter Region. The 2nd Annual Conference of the International Chemical Biology Society. 京都大学紫蘭会館(京都府・京都市), Oct 7-9, 2013.

- 23 野村 涉, 増田朱美, 玉村啓和. ジンクフィンガーヌクレアーゼによるテロメア活性の制御. 第 7 回バイオ関連化学シンポジ

ウム. 名古屋大学東山キャンパス(愛知県・名古屋市), 2013 年 9 月 27-29 日.

〔図書〕(計 6 件)

Takano H, Narumi T, Ohashi N, Nomura W, Tamamura H. Development of 8-Azacoumarin-4-ylmethyl-type Photolabile Protecting Groups Based on Amide-alkene Isosterism. Peptide Science 2014, A. Otaka (Ed.) 2015 年, 頁 19-20 .

Nomura W, Koseki T, Mizuguchi T, Tamamura H. Design and Synthesis of Trivalent CXCR4 Ligands Utilizing Polyproline Linkers. Peptide Science 2014, A. Otaka (Ed.) 2015 年, 頁 75-76 .

Honda Y, Mizuguchi T, Nomura W, Tamamura H. Development of Dimeric Peptide Derivatives Based on gp41 Fragment as HIV-1 Fusion Inhibitors. Peptide Science 2014, A. Otaka (Ed.) 2015 年, 頁 103-104 .

Masuda A, Nomura W, Tamamura H. Quantitative Analysis of Sequence-Specific Reactions by Artificial DNA Recombinase. Peptide Science 2012 K. Sugimura (Ed.) 2013 年, 頁 21-22 .

Hashimoto C, Nomura W, Komano JA, Tamamura H. Synthesis of an Artificial gp41-C34 Trimer as an HIV-1 Fusion Inhibitor. Peptide Science 2012, K. Sugimura (Ed.) 2013 年, 頁 45-46 .

Nomura W, Narumi T, Aikawa H, Tamamura H. Development of Cell-Penetrating ZIP Tag-Probe Systems for Fluorescent Imaging of Protein Dynamics in Cells. Peptide Science 2012, K. Sugimura (Ed.) 2013 年, 頁 113-114 .

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

[http:// tamamura-tmd.sakura.ne.jp/](http://tamamura-tmd.sakura.ne.jp/)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

野村 涉 (NOMURA, Wataru)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准
教授

研究者番号：80364409