

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02189

研究課題名(和文) 化学ツールを活用したヒトゲノムの修飾・損傷の精密検出とニュー・ゲノム科学の創成

研究課題名(英文) Creation of new genome science using chemical tools to precisely detect modification and damage of human genome

研究代表者

小宮山 眞 (Komiya, Makoto)

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・NIMS招聘研究員

研究者番号：50133096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 33,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々が既に開発したスーパー制限酵素に、さらにアフィニティー分離能を付加し、第2世代のスーパー制限酵素を構築した。スーパー制限酵素の構成成分であるPNAにビオチンを付加することで、31億塩基対あるヒトゲノムから、数千塩基対の所定のDNA断片を高純度かつ高収率に抽出することに成功した。さらに、このビオチン修飾PNAとS1ヌクレアーゼを組み合わせることで、ワンポットでのヒトゲノムからの所定DNA断片抽出にも成功した。

研究成果の概要(英文)：We already developed super artificial restriction enzyme. In this research, we added affinity separating ability to this tool, and constructed the second-generation super artificial restriction enzyme. By modifying biotin to PNA which is a constituent of super restriction enzyme, we successfully extracted desired DNA fragments of several thousand base pairs in high purity and high yield from the human genome with 3 billion base pairs. Furthermore, by combining this biotin-modified PNA with S1 nuclease, we also succeeded in extracting desired DNA fragments from the human genome in one pot.

研究分野：化学

キーワード：ゲノム PNA インベージョン ゲノム断片分離 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

ゲノムの化学修飾(メチル化、ピリミジンダイマー形成など)や酸化的損傷(8-オキソグアニンの生成など)が生体機能に大きな影響を与えることは広く知られており、種々の検出法が開発されていた。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、「ゲノムのどの辺に修飾・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かった。種々の最新鋭の分析法も提案されていたが、信頼性が未だ不十分であると言われていた。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かった。すなわち、ゲノムの化学修飾や酸化損傷等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。

我々はすでにヒトゲノムを所定の位置で切断できるスーパー制限酵素を開発していた(図1)。これは2本のペプチド核酸(PNA)とCe(IV)/EDTA錯体から構成される()。PNAはワトソンクリック則により、ゲノムの相補的配列の部分にインベージョンする。この時、2本のPNAをずらして設計しておくことで、ゲノムの所定の位置に一本鎖部分を生じさせる。Ce(IV)/EDTA錯体はPNAインベージョンにより生成した1本鎖DNA部分を選択的に切断する。Ce(IV)/EDTA錯体の代わりに、1本鎖DNAを特異的に切断するS1ヌクレアーゼも非常に有効であることを見出した()。そしてこれを新たなゲノム解析ツールとして使用することを考えていた。

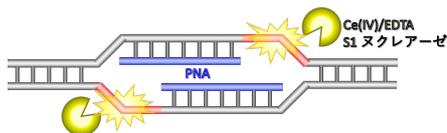


図1 スーパー制限酵素

2. 研究の目的

本研究では、我々がすでに開発したスーパー制限酵素を活用して、“分子情報に基づくニュー・ゲノム科学”を構築することを目的とした。すなわち、ヒトゲノムから所定の小断片を正確に切り出し、これを詳細に解析して、「ゲノム中の、どの核酸塩基がどのような化学修飾や酸化損傷を受けているか?」を明らかにする。ゲノムの修飾や損傷が生体機能に多大な影響を与えることは良く知られているが、分子レベルの情報は皆無に近く、関連分野の進展に大きな障害となっていた。

本研究は、この難問に対して直接で強力な解決策を提示し、ニュー・ゲノム科学の創成に寄与する。

3. 研究の方法

本研究では、スーパー制限酵素を使用して調製したゲノム断片を、如何にして効率的に分離精製するかが最重要課題と考えられた。そこで我々はこの課題を解決するために、スーパー制限酵素に使用する2本のPNAのうちの一方にビオチンを結合し、ストレプトアビジン・ビーズによるアフィニティー分離が可能となるような、第2世代のスーパー制限酵素(図2)の構築を行った。

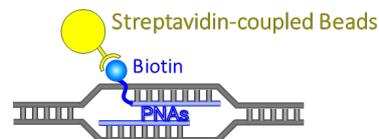


図2 アフィニティー分離能を付加した第2世代スーパー制限酵素

この過程で、抽出断片の化学修飾や酸化損傷等を詳細に解析するには、選択性を高め、より高純度な抽出断片を得る必要が顕在化した。そこでスーパー制限酵素の改良と、アフィニティー分離法の最適化を追求した。

4. 研究成果

(1) ビオチン修飾 PNA を用いたアフィニティー分離

PNAのビオチン化修飾は、PEG2リンカーを介し、ビオチン化リジンが付加して合成した。N端側、C端側への付加を試みたが、N端側への付加は難しく、C端側へ付加したものを使用し、アフィニティー分離法の構築を行った。ビオチン修飾 PNA の末端構造を図3に示す。

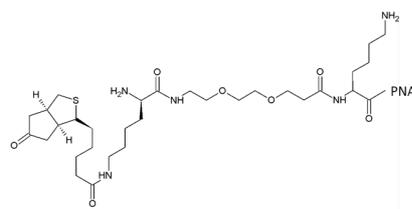


図3 ビオチン修飾 PNA の末端構造

次に、このビオチン修飾 PNA を用いたゲノム断片のアフィニティー分離法を開発した。あらかじめヒトゲノムを制限酵素で断片化しておき、そこに2本のPNA(片方はビオチン修飾 PNA)を加え、目的の DNA 断片に結合させた。そしてストレプトアビジンが結合した磁気ビーズを使用して目的のゲノム断片をアフィニティー抽出した。

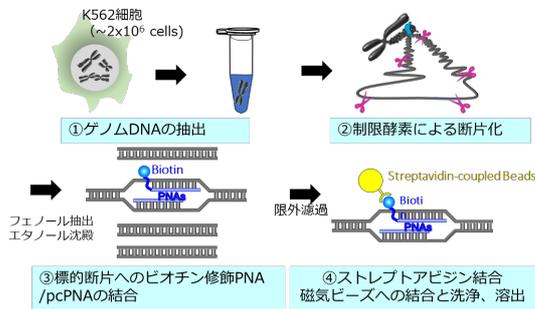


図4 ビオチン修飾 PNA を用いたヒトゲノムからの標的断片の抽出法の概要

この方法で 31 億塩基対という巨大なヒトゲノムから、数百から数千 bp の目的領域の DNA 断片を、およそ 40% の効率で抽出することに成功した。PNA は設計が自由であり、ヒトゲノムから取得する断片の種類に制約はない。この方法で得られるゲノム断片は PCR 法と異なり、ゲノムの修飾、損傷などは保存されている。抽出断片を詳細に解析することで、全ゲノム（31 億塩基対）のスケッチ像を与える従来法では得られない、ターゲット部位の正確かつ精緻な分子情報が入手できると考えられる。

(2) アフィニティー分離法の最適化

本研究で構築したビオチン化 PNA を用いたアフィニティー分離法により、高効率で目的断片の回収に成功した。しかし塩基分析など広範な用途に使用するには選択性をさらに高める必要があった。そこで分離精製断片のアフィニティー分離の際の吸着、脱着条件のさらなる改良を目指した。解析の結果、分離断片中の不純物（目的物以外のゲノム断片）は、主として PNA による断片の非特異的吸着によるものであることが判明した。そこで非特異的吸着の抑制および非特異的吸着断片の洗浄除去に最適な反応条件を探索するため、PNA/DNA 複合体形成、およびその安定性について解析を行った。その結果、PNA/DNA の複合体形成時は、塩濃度、温度の影響を受けやすいが、複合体形成されると塩濃度、温度、変性剤等の影響はあまりなく、安定に存在することが明らかとなった。この基礎的データは本研究のアフィニティー分離法の改良だけでなく、PNA の様々な分野への応用の際の条件検討に有用なデータとなると考えられる。

(3) 1 本の PNA による 2 本鎖 DNA 認識

アフィニティー分離系において PNA による非特異吸着の抑制が抽出断片の純度向上に有効と考えられたため、使用する PNA を 2 本から 1 本に減らした系の構築を考えた。そこで 1 本の PNA のみで 2 本鎖 DNA を認識する系の開発を行った。通常、2 本の PNA を使用するのとは、DNA の 2 本鎖それぞれに結合させて、両鎖を安定化させるためである。そこで PNA

が結合していない方の DNA 鎖を安定化させる方法として、1 本鎖 DNA に結合する性質を持つリボヌクレアーゼ A の添加を行ったところ、1 本の PNA のみでの 2 本鎖 DNA との複合体形成に成功した（図 5 a）。また、PNA に修飾塩基（2,6-ジアミノプリンと 2-チオウラシル）を導入することにより、1 本鎖結合性タンパク質が無くても、1 本の PNA のみで複合体形成が可能であることを見出した（図 5 b）。

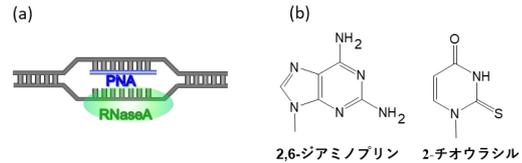


図5 1 本の PNA による 2 本鎖 DNA との複合体形成

1 本の PNA のみで 2 本鎖 DNA が認識できれば、PNA 合成の手間も省け、系も簡略化されるため、様々な分野への応用が期待される。

(4) ビオチン化 PNA と S1 ヌクレアーゼの組み合わせによる所定ヒトゲノム断片のワンポット抽出法の開発

前述のヒトゲノムからの所定 DNA 断片の抽出は、アフィニティー分離の前に、適当な制限酵素でのヒトゲノム断片化が必要である（図 4）。しかし制限酵素は認識配列に限られるため、適当な制限酵素がない場合も多い。一方で当研究室が開発したスーパー制限酵素は、認識配列を自由にデザインすることができ、S1 ヌクレアーゼなどと組み合わせることで DNA の 2 本鎖切断が可能である。そこで、配列認識に使用する PNA にビオチンを付加させ、S1 ヌクレアーゼと組み合わせることで、一度にゲノム切断と所定 DNA 断片の抽出を可能とした（図 6）。

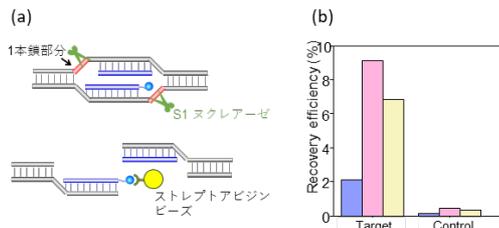


図6 ヒトゲノムからのワンポット法による所定断片の抽出

(a)ワンポット法の概要 (b)DNA 断片の抽出効率の 3 回の実験（3 色）結果

この方法は、前述のアフィニティー抽出法と比較し、まだ効率、純度に改善の余地があるものの、アフィニティー抽出法では適応できないような領域でも抽出が可能であることから、これらの方法を組み合わせることで、ヒトゲノム全域の解析に対応できると考えられる。

(5)ヒトゲノムの所定領域に結合したタンパク質因子の同定

本研究で開発したアフィニティー分離系を用いて抽出した分離断片の分子情報の解析も行った。ヒトゲノムから所定断片をアフィニティー分離し、溶出させずビーズに固定化した状態のまま核抽出液と反応させることで、所定断片に結合するタンパク質画分を得た。得られたタンパク質画分をウエスタン解析や質量分析することにより、今後精査する必要はあるが、結合タンパク質の一部を同定することができた。本系の構築は、ゲノムの所定の領域に結合するタンパク質因子を明らかにし、ゲノム機能の全容解明に寄与するものである。

<引用文献>

Makoto Komiyama, Yuichiro Aiba, Yoji Yamamoto and Jun Sumaoka, Artificial restriction DNA cutter for site-selective scission of double-stranded DNA with tunable scission site and specificity, *Nature Protoc.*, 2008, 3, 655-662

Kenichiro Ito, Hitoshi Katada, Narumi Shigi and Makoto Komiyama, Site-selective scission of human genome by artificial restriction DNA cutter, *Chem Commun.*, 2009, 43, 6542-6544.

Xia Li, Satoshi Muneoka, Narumi Shigi, Jun Sumaoka and Makoto Komiyama, Clipping of predetermined fragments from the human genome by S1 nuclease-PNA combinations., *Chem Commun.*, 2014, 50, 8674-8676.

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 15件)

Arivazhagan Rajendran, Narumi Shigi, Jun Sumaoka, and Makoto Komiyama, One-Pot Isolation of a Desired Human Genome Fragment by Using a Biotinylated pcPNA/S1 Nuclease Combination, *Biochem.*, 査読あり, 2018, 57, 2908-2912

DOI: 10.1021/acs.biochem.8b00202

Narumi Shigi, Jun Sumaoka, and Makoto Komiyama, Applications of PNA-Based Artificial Restriction DNA Cutters, *Molecules*, 査読あり, 2017, 22, 1586

DOI: 10.3390/molecules22101586

Makoto Komiyama, Keitaro Yoshimoto, Masahiko Sisido, Katsuhiko Ariga, Chemistry Can Make Strict and Fuzzy Controls for Bio-Systems: DNA Nanoarchitectonics and Cell-Macromolecular Nanoarchitectonics, *Bull. Chem. Soc. Japan*, 査読あり, 2017, 90, 967-1004

DOI: 10.1246/bcsj.20170156

Makoto Komiyama, Design of Highly Active Ce(IV) Catalysts for DNA Hydrolysis and Their Applications, *Chem. Lett.*, 査読あり, 2016, 45, 1347-1355

DOI: 10.1246/cl.160786

Makiko Tanaka, Narumi Shigi, Makoto Komiyama, Ribonuclease A as Effective Promoter for Unimolecular Invasion of Peptide Nucleic Acid to Double-stranded DNA, *Chem. Lett.*, 査読あり, 2016, 45, 767-769

DOI: 10.1246/cl.160340

Kazuki Futai, Jun Sumaoka, and Makoto Komiyama, Fabrication of DNA/RNA Hybrids Through Sequence-Specific Scission of Both Strands by pcPNA-S1, Nuclease Combination, *Nucleos. Nucleot. Nucl.*, 査読あり, 2016, 35, 233-244

DOI: 10.1080/15257770.2015.1131294

Narumi Shigi, Arivazhagan Rajendran, Xiaohui Wang, Hiroko Kunifuda, Jun Sumaoka, Makoto Komiyama, Affinity Isolation of Desired Restriction Fragment 90723122o-complementary PNA, *Chem. Lett.*, 査読あり, 2015, 44, 1569-1571

DOI: 10.1246/cl.150682

Yuichiro Aiba, Junpei Ohyama, Makoto Komiyama, Transfection of PNA-NLS Conjugates into Human Cells Using Partially Complementary Oligonucleotides, Nuclease Combination, *Chem. Lett.*, 査読あり, 2015 44, 1547-1549

DOI: 10.1246/cl.150733

[学会発表](計 6件)

Makoto Komiyama, Chemical Tools To Isolate a Desired Fragment from Human Genome., The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii (USA), Dec. 15-21 (2015)

Makoto Komiyama, Covalent and Non-covalent Approaches to Promote PNA Invasion for In Vivo Applications., The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Hawaii (USA), Dec. 15-21 (2015)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小宮山 眞 (KOMIYAMA, Makoto)
物質・材料研究機構・国際ナノアーキテク
トニクス研究拠点・NIMS 招聘研究員
研究者番号：50133096

(2) 研究分担者

須磨岡 淳 (SUMAOKA, Jun)
東京工科大学・工学部・教授
研究者番号：10280934

徐 岩 (XU, Yan)
宮崎大学・医学部・教授
研究者番号：40506763

(3) 連携研究者

嶋 成実 (SHIGI, Narumi)
物質・材料研究機構・国際ナノアーキテク
トニクス研究拠点・NIMS 特別研究員
研究者番号：00396780

田仲 真紀子 (Tanaka, Makiko)
電気通信大学，大学院情報理工学研究科
助教
研究者番号：90397703

Arivazhagan Rajendran
京都大学，エネルギー理工学研究所，
講師
研究者番号：90723122