

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14032

研究課題名(和文) 原核生物のArgonauteタンパクを利用したケミカルバイオロジー

研究課題名(英文) DNA scission activity of *Thermus thermophilus* Argonaute with artificial nucleic acids

研究代表者

愛場 雄一郎 (Aiba, Yuichiro)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：10581085

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Argonaute (Ago) はRNA干渉の中心タンパクであるが、近年の研究から原核生物のAgoでは通常用いられるRNAではなくDNAをガイド鎖として用い、相補的なDNA鎖を切断可能なことが明らかにされた。本研究課題では、原核生物の一種である高度好熱菌*Thermus thermophilus*由来のAgo (TtAgo) に着目し、配列特異的なDNA切断ツールおよび新たなゲノム編集技術として利用することを目指した。DNA認識能を詳細に解析し、ガイド鎖への化学修飾導入や人工核酸への置換を行うことで、その導入位置に応じてTtAgoの切断活性を制御出来ることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：RNA interference (RNAi) is a gene regulation mechanism, in which small RNA molecules inhibit the translation by targeting messenger RNA. For their wide applications including a nucleic acid therapeutics, a eukaryotic Argonaute (Ago), a key protein in RNAi pathway, has been intensively studied. However, it was found that a *Thermus thermophilus* Ago (TtAgo) shows DNA scission activity with a guide DNA (not RNA). This TtAgo works as a DNA-guided endonuclease and it could be a potential tool for genetic engineering.

In this study, we have succeeded in the expression of TtAgo, and its DNA scission activity was controlled by using guide strands with artificial nucleic acids. Furthermore, it was also found that the effect of the modification on the DNA scission activity depends on the modification position. This simple and easily-available strategy should be useful and widen the possibility of TtAgo applications.

研究分野：生体関連化学

キーワード：Argonaute RNA干渉 核酸 バイオテクノロジー 蛋白質

1. 研究開始当初の背景

特定遺伝子に対する発現制御機構として、siRNA (small interfering RNA) や miRNA (micro RNA) による RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) がある。RNAi は、鋳型となるガイド鎖 RNA を用いて、その相補的な配列を持つ標的 mRNA を分解し、翻訳を選択的に抑制する機構である。生体内では、RNAi を介して遺伝子発現が厳密に制御されており、非常に重要な生命現象の一つとして盛んに研究が行われている。また実験室レベルでも、合成 2 本鎖 RNA を導入するだけで目的遺伝子の発現抑制が可能であり、ノックアウトマウスのようなゲノム編集技術と比べ容易に実験系を構築出来ることから、バイオテクノロジーの最重要技術の一角を担っている。

RNAi には様々なタンパクが関与しているが、中でも一番重要なのが RISC complex (RNA-induced silencing complex) の中心となる Argonaute タンパク (Ago) である。これまでは、*in cell, in vivo* での応用に向け、真核生物由来の Ago が主に研究対象とされ、原核生物由来の Ago は結晶化の簡便さによる構造面での比較などに限られていた。しかしながら、近年の研究から原核生物由来の Ago は、通常真核生物由来の Ago が示す「RNA ガイド鎖を鋳型に標的の RNA を切断する」という機能だけではなく、「DNA を鋳型のガイド鎖として利用し、標的 DNA を切断する」機能を示すことが明らかとなった。

2. 研究の目的

RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) の中心タンパクである Argonaute (Ago) は、鋳型となるガイド鎖 RNA を利用して相補的な配列を持つ標的 RNA の分解、それに伴う選択的な翻訳阻害が可能である。一方で、近年の研究から原核生物の Ago では DNA をガイド鎖として相補的な DNA の切断が可能であることが明らかとなった。ここでの DNA 切断活性は、切断が比較的容易な構造的にひずみのかかった supercoil 状態のプラスミドに対しての報告であったので、Ago の認識能や切断効率を高めることが出来れば、汎用的な DNA 切断ツールとして非常に広範な応用が期待される。そこで、本申請課題では、原核生物由来の Ago に着目し、DNA の代わりに種々の化学修飾核酸や人工核酸をガイド鎖 DNA として導入し、通常 DNA よりも結合力を高めることで DNA 切断活性を飛躍的に上昇させ、DNA 切断ツール特にゲノム編集ツールとして応用展開することを目指した。

本申請課題では、原核生物の一種である高度好熱菌 (*Thermus thermophilus*) の Ago (TtAgo) に着目し、その認識能・切断活性を向上させ、TtAgo を新たな配列特異的な DNA 切断ツールとして応用展開することを

目指した。

3. 研究の方法

本申請課題では、鋳型となるガイド DNA への化学修飾や人工核酸の導入に向け、TtAgo の核酸認識様式についてどの程度厳密に認識されているか、もしくは許容性があり認識がどのくらい寛容かという基礎的な情報が非常に重要となる。これまでの結晶構造解析などから、鋳型となるガイド DNA と TtAgo との結合では、3'側が強く相互作用していることが報告されているが、その検討は十分とは言えない。そこで、結晶構造解析の情報に基づき、認識がそれほど厳密でないことが予想される位置、および厳密に認識されている位置それぞれに化学修飾を順次導入し、比較検討を行うこととした。

用いる人工核酸の候補として、安定性は比較的高いものの天然の DNA に構造に近い部分的に修飾された化学修飾核酸と、DNA との結合力が非常に高いが、骨格構造は天然の DNA とは全く異なる PNA (Peptide Nucleic Acid) を検討した。また、ガイド鎖 DNA と基質 DNA の Ago への取り込みに関しては、各種分光的手法を利用して評価を行った。その後、未修飾の DNA や RNA をコントロールとして用いながら、切断効率について詳細に検討を進めた。また、修飾核酸を取り込んだ Ago の結晶構造解析を併せて行うことで、詳細な結合様式を解明することを目指した。

4. 研究成果

<TtAgo の発現・精製>

TtAgo の調製に向け、過去の報告を参考に、大腸菌による発現系の構築を行った (Fig. 1)。

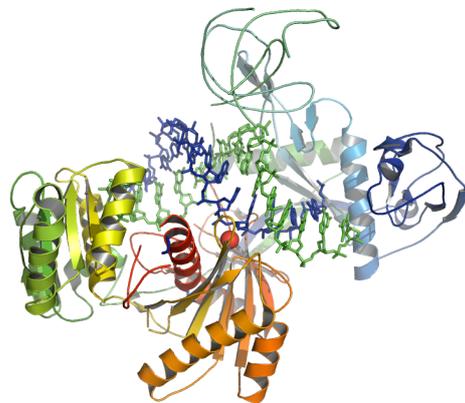


Fig. 1. TtAgo の構造

TtAgo は大腸菌にコドン最適化した人工遺伝子を用い、一部操作の簡便化のために、可溶性タグやプロテアーゼの変更を行い、ベクターを作成した。大量培養後、各種カラムによる精製を行い、TtAgo を得た。精製 TtAgo の

活性は、人工核酸を導入していない DNA をガイド鎖として用い、完全に相補的な配列を持つターゲット鎖の切断を行い確認した。ターゲット部位での切断に由来する切断断片が選択的に生じたことから、この TtAgo を用いて以下の実験を進めることとした。

<各種化学修飾核酸の取込と DNA 切断>

まず、骨格が天然 DNA と近い化学修飾核酸を用いて検討を進めた。鋳型となるガイド鎖中への化学修飾の導入位置は、X 線結晶構造解析による構造情報に基づき、ガイド鎖と TtAgo の結合・認識がそれほど厳密でないと予想される位置と、厳密に認識されていると予想される位置をいくつかピックアップした。選択した位置に対し、それぞれの 1 つだけ化学修飾を行い、比較検討を行った。ガイド鎖の取り込みについては、円二色性スペクトル解析を用いて検討したところ、取り込みが確認された。そこで、相補的な配列を持つターゲット鎖を用いて切断実験を行った。コントロールである未修飾の DNA と比較したところ、ガイド鎖中への化学修飾が DNA 切断活性に影響し、さらにその導入位置によってその効果が大きく変化することが明らかとなった。そこで、シード領域とその周辺である 2-14 番目に順次人工核酸を導入し、その切断活性を評価した。結果を Fig. 2 に示す。

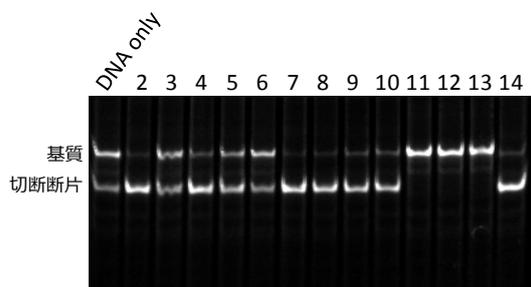


Fig. 2 TtAgo による DNA 切断

また、異なる種類の化学修飾を導入することで、本知見の一般性について確認を行ったところ、程度の差はあるものの同様の傾向が確認された。一方で後述するように骨格を大きく改変した場合には取込が阻害されるような知見も確認されており、ガイド鎖の最適化についてはより詳細な検討が必要である。上記の知見は、TtAgo のガイド鎖認識においてだけでなく、配列特異的な DNA 切断ツールとしての応用という観点からも非常に重要なものと言える。

<PNA ガイド鎖の TtAgo への取り込み>

続いて、骨格が大きく異なるペプチド核酸 PNA をガイド鎖として用い、TtAgo への取り込みを検討した。PNA は、2-アミノエチルグリシンを骨格からなり、リン酸基の負電荷がないため、DNA との 2 本鎖形成時に静電反発を生じず、非常に強い DNA 結合力を示す。

これにより、効率的なターゲット DNA 認識および高い切断効率を期待した。ここで、TtAgo へのガイド鎖の取り込みには、ガイド鎖の 5'側がリン酸化されている必要がある。しかしながら、PNA は水酸基を骨格に持たないため、通常のリン酸化を行うことは出来ない。そこで、DNA の 5'に相当する PNA の N 末端側に、リン酸基の代わりにホスホセリン（側鎖をリン酸化したセリン）を導入した。これを用いて DNA 切断実験を行ったところ、残念ながら DNA 切断効率は確認出来なかった。この結果から、骨格の違いが大きすぎるために TtAgo が許容できなかった、リン酸基の導入方法が適切でなかった、といったことが予想され、TtAgo への PNA の取り込みにはさらなる検討が必要である。

<TtAgo の結晶構造解析>

切断効率の変化に関する知見を得るために、各種人工核酸をガイド鎖として導入した場合に、TtAgo の構造がどのように変化しているかを確認すべく、X 線結晶構造解析を試みた。もともと TtAgo はヒトの Argonaute のモデル系として多くの結晶構造解析が報告されている。これらの報告を参考に結晶化条件を用いて結晶化を行ったところ、いくつかの結晶が得られた。これらを用いて X 線結晶構造解析を行ったところ、保管中に結晶の質が低下してしまったためか、良質な回折像は得られなかった。しかしながら、タンパク結晶であることが確認できたので、解析のタイミングや詳細な結晶化条件の検討により、今後結晶構造解析が可能であると考えられる。

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 0 件)

[学会発表] (計 1 3 件)

- (1) 山口 華苗、愛場 雄一郎、庄司 長三、渡辺 芳人
"高度好熱菌由来 Argonaute タンパク質への人工核酸を取り込みと効率的な DNA 切断"
日本化学会第 98 春季年会
2017 年
- (2) Y. Aiba, K. Yamaguchi, O. Shoji, Y. Watanabe
"Improved DNA scission activity of Thermus thermophilus Argonaute with artificial nucleic acids"

- The 44th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry 2017
2017年
- (3) 山口 華苗、愛場 雄一郎、荘司 長三、渡辺 芳人
"原核生物由来 Argonaute タンパク質と人工核酸を用いたDNA切断ツールの開発"
第11回バイオ関連化学シンポジウム
2017年
- (4) 山口 華苗、愛場 雄一郎、荘司 長三、渡辺 芳人
"高度好熱菌由来 Argonaute タンパク質と人工核酸を用いたDNA切断ツールの開発"
第5回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム
2017年
- (5) 愛場 雄一郎
"高度好熱菌由来 Argonaute (TtAgo)への人工核酸導入によるDNA切断の高活性化"
第30回生物無機化学セミナー
2017年、招待講演
- (6) 愛場 雄一郎、山口 華苗、荘司 長三、渡辺 芳人
"高度好熱菌由来 Argonaute(TtAgo)への人工核酸導入によるDNA切断の高活性化"
第27回バイオ・高分子シンポジウム
2017年
- (7) 愛場 雄一郎、山口 華苗、荘司 長三、渡辺 芳人
"高度好熱菌由来 Argonaute による位置選択的DNA切断"
生体機能関連化学部会若手の会 第29回サマースクール
2017年
- (8) 愛場 雄一郎
"核酸を対象とした遺伝子発現制御技術の開発"
先導物質化学研究所講演会
2016年、招待講演
- (9) 山口 華苗、愛場 雄一郎、荘司 長三、渡辺 芳人
"人工核酸を用いた高度好熱菌由来 Argonaute (TtAgo) の高活性化"
第10回バイオ関連化学シンポジウム
2016年
- (10) 山口 華苗、愛場 雄一郎、荘司 長三、渡辺 芳人
"人工核酸による高度好熱菌由来 Argonaute (TtAgo) の高活性化"
第4回バイオ関連化学シンポジウム若手フォーラム
2016年
- (11) 愛場 雄一郎、山口 華苗、荘司 長三、渡辺 芳人
"人工核酸を用いた高度好熱菌由来 Argonaute (TtAgo) による効率的なDNA切断"
第10回バイオ関連化学シンポジウム
2016年
- (12) 愛場 雄一郎
"人工核酸導入を用いた遺伝子発現制御" 米ちのく分析科学シンポジウム 2016
2016年、招待講演
- (13) 山口 華苗、愛場 雄一郎、荘司 長三、渡辺 芳人
"人工核酸を用いた高度好熱菌由来 Argonaute (TtAgo) の活性化向上"
第6回CSJ化学フェスタ 2016
2016年
- [図書] (計 0件)
- [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://profs.provost.nagoya-u.ac.jp/view/html/100008621_ja.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

愛場 雄一郎 (AIBA, Yuichiro)

名古屋大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：10581085