

研究種目： 特別推進研究
研究期間： 2006 年度～2010 年度
課題番号： 18001001
研究課題名（和文） スーパー制限酵素による巨大 DNA の遺伝子操作

研究課題名（英文） Gene Manipulation of Huge DNA
by Super Artificial Restriction Enzyme

研究代表者

小宮山 眞 (KOMIYAMA MAKOTO)
東京大学・先端科学技術研究センター・教授
研究者番号：50133096

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：DNA、制限酵素、ペプチド核酸、遺伝子組換え、セリウム

1. 研究計画の概要

申請者らが開発してきた“スーパー制限酵素 (Artificial Restriction DNA CUTter; ARCUT)”を完成させ、さらにこれを用いた遺伝子操作法を確立する。また、「巨大 DNA を所望の位置で選択的に切断できる」という ARCUT の特長を生かし、天然酵素を使用する従来法では実施困難な遺伝子操作を実現し、ニュー・バイオテクノロジーを創成する。

2. 研究の進捗状況

ARCUT は、「二本鎖 DNA のターゲット配列を認識するペプチド核酸 (PNA)」と「DNA を切断する Ce(IV)/EDTA 錯体」から構成される。そこで、PNA や Ce(IV)錯体を化学修飾し、より高い選択性と切断活性を持つ ARCUT の構築を目指した。また、テロメア配列と選択的に結合する修飾核酸をターゲット配列認識部位として利用し、老化やガン化との関与が報告されているテロメアを選択的に切断する人工酵素の構築に着手した。

(1) 第一世代 ARCUT のミスマッチ認識能の評価 PNA と DNA との間に系統的にミスマッチを導入して切断効率への影響を検討した。その結果、ARCUT のミスマッチ認識能は極めて高く、各種のゲノムを所定位置で選択的に切断するのに十分な認識能を有することを確認した。

(2) ARCUT の機能向上 これまで用いていた PNA では、GC 含有量が極端に高い DNA 配列の認識は困難であった。本研究において、PNA の設計を精密化して、その中の所定位置に正電荷を導入することで、GC 含有量の非常に高い配列も効率的に認識させることに成功した。また、第一世代 ARCUT では、DNA 中の所定のターゲット

配列を認識するのに二本の PNA 鎖が必須であった。しかし、一本鎖 DNA 結合タンパク質 (SSB) を併用することにより、一本の PNA 鎖でも、二本鎖 DNA 中の所定位置に効率的にインベージョンすることを見出した。

リン酸基よりもさらに強く Ce(IV) と相互作用する多価リン酸配位子を開発し、これを切断サイトの近傍に導入した。モデル系を用いて配位子修飾の効果を検討したところ、DNA 切断の効率が飛躍的に向上することが明らかになった。

ARCUT で得られる DNA 断片の末端は、特異的な接着末端構造を持つ。これらの末端と相補的な末端を持つ DNA 断片を直接与える新たな PCR 法を開発した。また、新規 PCR 法で得られた DNA 断片と ARCUT による切断断片とをリガーゼにより効率的に結合することに成功した。

(3) ニュー・バイオツールとしての ARCUT の応用展開 ヒトゲノムのように巨大な DNA であっても、その中の所定の位置が、ARCUT により選択的に切断できることを実証した。

さらに、組換え標的部位の近傍を ARCUT で切断することにより、ヒト細胞内での相同組換えの頻度を大幅に上昇することに成功した。ARCUT は切断サイトが自在に設計できるので、ヒト細胞内において相同組換えを促進し、遺伝子挿入や遺伝子変異を人為的に誘起する新たなツールとして有用であることが明らかとなった。

また、染色体の末端に存在して重要な生体機能を担っているテロメアを、特異的に切断する人工カッターの開発にも成功した。ヒトテロメアに特異的に結合する多価リン酸配位子修飾オリゴヌクレオチドを合成し、ここに Ce(IV)/EDTA を加えると、ヒトテロメアのオーバーハング部分 (3 端にある一本鎖構造) の選択的な切断が実現した。

3. 現在までの達成度

本研究の現時点の達成度は、の「おおむね順調に進展している」であると考えている。ARCUT を用いた遺伝子操作は、従来の天然酵素を用いた遺伝子操作とは全くことなるため、研究の進展にともない当初予想していないような結果が得られることも多いが、研究は全般的にすべて順調に進展しており、さらに当初の予想を超えるような成果も得られている。

4. 今後の研究の推進方策

- (1) PNA に種々の化学修飾(多価リン酸配位子、主鎖修飾、糖鎖修飾など)を施し、ARCUT をさらに高機能化する。
- (2) 細胞内に ARCUT を導入し、そこでの選択的 DNA 切断を実現する。
- (3) ARCUT による相同組換えの生化学的応用を展開する。
- (4) G-カルテット構造などの特殊な DNA 構造をターゲットとした人工 DNA カッターを開発する。
- (5) これらの知見を総合評価し、ARCUT を用いたニュー・バイオテクノロジーの創成を目指す。

5. 代表的な研究成果

(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 51 件)

- (1) “Human Telomeric DNA Sequence-Specific Cleaving by G-Quadruplex Formation”, Y. Xu, Y. Suzuki, T. Lönnberg, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2871-2874. (査読有り)
- (2) “Origin of High Fidelity in Target-Sequence Recognition by PNA Ce(IV)/EDTA Combinations as Site-Selective DNA Cutters”, Y. Miyajima, T. Ishizuka, Y. Yamamoto, J. Sumaoka, M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 2657-2662. (査読有り)
- (3) “Strand Invasion of Conventional PNA to Arbitrary Sequence in DNA Assisted by Single-Stranded DNA Binding Protein”, T. Ishizuka, K. Otani, J. Sumaoka, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2009**, 1225-1227. (査読有り)
- (4) “Prompt Site-Selective DNA Hydrolysis by Ce(IV)-EDTA Using Oligonucleotide Multiphosphonate Conjugates”, T. Lönnberg, Y. Suzuki, M. Komiyama, *Org. Biomol. Chem.* **2008**, *6*, 3580-3587. (査読有り)
- (5) “Site-Selective Blocking of PCR by a Caged Nucleotide Leading to Direct Creation of Desired Sticky Ends in the Products”, K. Tanaka, H. Katada, N. Shigi, A. Kuzuya, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2008**, *9*, 2120-2126. (査読有り)
- (6) “Accommodation of a Single Protein Guest in Nanometer-Scale Wells Embedded in a “DNA Nanotape””, A. Kuzuya, K. Numajiri, M. Komiyama, *Angew. Chem., Int. Ed.* **2008**, *47*, 3400-3402. (査読有り)

(7) “Artificial Restriction DNA Cutter for Site-Selective Scission of Double-Stranded DNA with Tunable Scission Site and Specificity”, M. Komiyama, Y. Aiba, Y. Yamamoto, J. Sumaoka, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 655-662. (査読有り)

(8) “Solid-Phase Synthesis of Pseudo-Complementary Peptide Nucleic Acids”, M. Komiyama, Y. Aiba, T. Ishizuka, J. Sumaoka, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 646-654. (査読有り)

(9) “Chiral Introduction of Positive Charges to PNA for Double-Duplex Invasion to Versatile Sequences”, T. Ishizuka, J. Yoshida, Y. Yamamoto, J. Sumaoka, T. Tedeschi, R. Corradini, S. Sforza, M. Komiyama, *Nucleic Acids Res.* **2008**, *36*, 1464-1471. (査読有り)

〔学会発表〕(計 47 件)

- (1) 愛場 雄一郎 他、ジスルフィド結合を導入した PNA による DNA の認識とその制御、日本化学会第 89 春季年会、日本大学(2009 年 3 月)
- (2) 堅田 仁 他、人工制限酵素を用いたヒト細胞内での遺伝子組換え、日本化学会第 89 春季年会、日本大学(2009 年 3 月)
- (3) 石塚 匠 他、SSB および一本鎖 PNA を用いた二本鎖 DNA の配列特異的な認識、日本化学会第 89 春季年会、日本大学(2009 年 3 月)
- (4) 濱野 悠也 他、Ce(III) とリン酸系配位子修飾 DNA による位置特異的 DNA 切断、日本化学会第 89 春季年会、日本大学(2009 年 3 月)
- (5) 岡田 文徳 他、ポリメラーゼ反応の局所的阻害に適した新規ケージドヌクレオチドの開発、日本化学会第 89 春季年会、日本大学(2009 年 3 月)

〔図書〕(計 5 件)

- (1) 堅田仁、宮島佳孝、小宮山眞、エヌ・ティー・エス、超分子サイエンス、4 章 2 節、「人工ヌクレアーゼ」(印刷中)
- (2) 葛谷明紀、小宮山眞、エヌ・ティー・エス、希土類の材料技術、5 部第 38 章第 1 節、「希土類イオンによる RNA、DNA の切断」(2008)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

- (1) 標的核酸を位置選択的に切断する方法、小宮山眞・レンベルク トーマス・鈴木裕太、国立大学法人東京大学、2007-299747、出願、2007 年 11 月 19 日、国内
- (2) 粘着末端を有する DNA 断片の調製法、小宮山眞・葛谷明紀・田中啓太、国立大学法人東京大学、特願 2008-61678、出願、2008 年 3 月 11 日、国内

〔その他〕

ホームページ:

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