

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：特別推進研究

研究期間：2006～2009

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

研究成果の概要（和文）：我々が開発したスーパー制限酵素を使って、ヒトの全ゲノム DNA（30 億塩基対）の中の 1 カ所を選択的に切断することに成功した。DNA 切断はすべて天然酵素と同様にリン酸ジエステル結合の加水分解で進行するので、生成した DNA 断片を用いて組換え DNA を調製し、これを細胞内で発現することが可能である。さらに、スーパー制限酵素で切断した DNA をヒト細胞内に入れると、この切断が DNA 修復系により正確に認識され、所定の相同組換えが促進されることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We developed man-made tools (super artificial restriction enzyme) which cut double-stranded DNA at desired site with desired site-specificity. Even huge genomic DNA (e.g., the genome of human beings composed of 3×10^9 base-pairs) was selectively hydrolyzed at one target site. The scission fragments were connected with foreign DNA using DNA ligase, and the recombinant DNA was successfully expressed in mammalian cells. Furthermore, the site-selective scissions by the super artificial restriction enzyme were satisfactorily recognized by the repair system in human cells and promoted the desired homologous recombination. High potential of the super artificial restriction enzyme for future applications has been indicated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	87,300,000	26,190,000	113,490,000
2007 年度	61,100,000	18,330,000	79,430,000
2008 年度	61,100,000	18,330,000	79,430,000
2009 年度	61,100,000	18,330,000	79,430,000
総計	270,600,000	81,180,000	351,780,000

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. 研究開始当初の背景

バイオテクノロジーの著しい発展の中で、ゲノム DNA をはじめとする巨大 DNA を正確にマニピュレーションする技術の重要性が高まっている。ゲノム DNA から所定の遺伝

子（群）を切り出し、またゲノム DNA の所定位置に必要な遺伝子を自在に導入できれば、医療、物質生産、品種改良など幅広い分野に計り知れない効果をもたらすと期待される。そのため、巨大な DNA を所定の位置で選択

的に切断する人工ツールの開発が、世界中の多くの研究者により試みられていた。しかし、本研究を開始した時点においては、我々の開発したスーパー制限酵素 (**Artificial Restriction DNA CUTter**; ARCUT) が、天然酵素も含めて、巨大 DNA を設計通りに切断できる唯一のツールであった。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 巨大な二本鎖 DNA を所定の位置で選択的に切断する ARCUT を用いて、巨大 DNA のマニピュレーション法を確立すること、および (2) ARCUT による切断を活用してニュー・バイオテクノロジーを創出することの2つを目的とする。

3. 研究の方法

我々が開発した ARCUT は、「二本鎖 DNA 中のターゲット配列を認識する二本のペプチド核酸 (PNA)」と「DNA を切断する Ce(IV)/EDTA 錯体」から構成される (図 1)。そこで、本研究では、まず、ARCUT の選択性ならびに切断活性のさらなる向上を目指して、PNA と Ce(IV)錯体に種々の化学修飾を加えてその構造を最適化する。また、ARCUT を用いて、ヒトゲノム DNA の位置特異的な切断を実現するとともに、天然酵素のみに依存している従来技術では実施することが不可能なニュー・バイオテクノロジーを創成する。さらに、これらの知見を発展させて、染色体末端に存在して老化やガン化との重大な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ツールを開発する。こうして、次世代バイオツールとしての ARCUT の優位性を確立する。

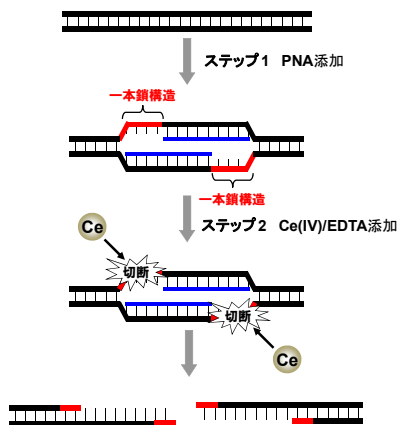


図 1 スーパー制限酵素 (ARCUT) による DNA の塩基配列選択的切断の模式図

4. 研究成果

(1) 第一世代 ARCUT のミスマッチ認識能の評価

ARCUT により巨大ゲノムを切断する際に

は、ターゲット配列と類似の配列が系中に多数混在する。もちろん、ターゲット配列だけが選択的に切断されなければならない。従って、ARCUT のミスマッチ認識能の基礎的データは、これを応用展開していく上で極めて重要である。そこで、PNA と DNA との間に系統的にミスマッチを導入し、これが切断効率にどのような影響を与えるかを検討した。結果の一例を図 2 に示す。典型的な ARCUT は、基質 DNA 中の少なくとも 16 塩基対を正確に認識することが明らかとなった。このミスマッチ認識能は、40 億塩基対にもおよぶ巨大 DNA 中の 1 カ所を正確に認識するのに十分な高さである ($4^{16} > 40$ 億)。すなわち、ARCUT が、ヒトゲノムを含む各種のゲノム DNA を所定位置で選択的に切断する能力を有することが確認された。

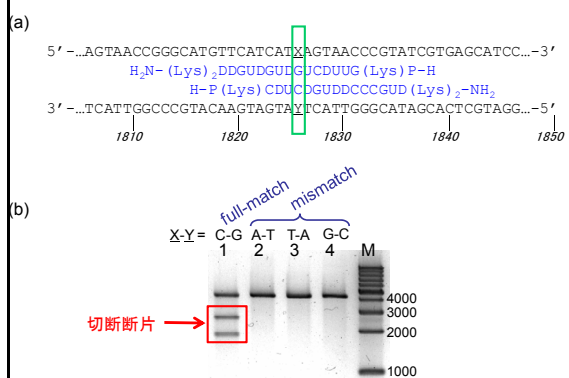


図 2 ARCUT のミスマッチ認識の一例

(a) ターゲット部位の塩基配列。(b) 緑枠部分の塩基配列を様々に変えた基質 DNA に対する ARCUT の切断。塩基配列が完全に相補的 (full-match) な場合のみ切断が進行して断片が生成する。

(2) ARCUT の機能向上

第一世代の ARCUT では、現在広く用いられている PNA (poly(N-ethylglycine) を主鎖骨格とするもの) を用いていた。しかし、この場合、GC 含有量が極端に高い DNA 配列の認識は困難で、このような場所は容易に切断できなかった。そこで、PNA の設計を精密化し、その中の所定位置に正電荷を導入した (図 3)。この修飾 PNA は非常に高い塩基配列認識能を持ち、GC 含有量の非常に高い配列でも効率的に認識することが明らかになった。

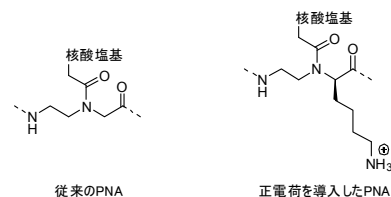


図 3 正電荷を導入した PNA の構造

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 鎖が必要であった。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 鎖のみを用いても二本鎖 DNA 中の所定位置に効率的にインベージョンさせることができることを見出した (図 4)。ここでは、SSB が、インベージョンで生成する一本鎖部位に結合し、系全体を安定化している。

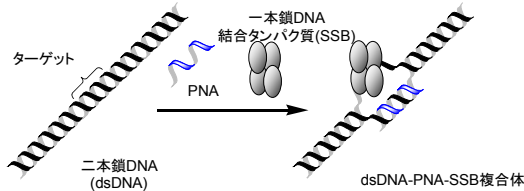


図 4 一本の PNA と SSB を併用した二本鎖 DNA へのインベージョンの模式図

一方、第一世代 ARCUT では、PNA の末端にホスホセリンの形でリン酸基を導入し、これと Ce(IV)/EDTA との相互作用を利用して触媒をターゲット部位に局在化して切断活性を向上してきた (図 5)。今回、この効果をさらに高めるために、リン酸基よりもさらに強く Ce(IV)/EDTA と相互作用する多価リン酸配位子を開発した。その有効性を確認するために、DNA の末端にこの多価リン酸配位子を結合し、これを切断サイトの近傍に導入した。その結果、DNA の位置選択的切断の効率が飛躍的に向上することが明らかになった (図 6)。

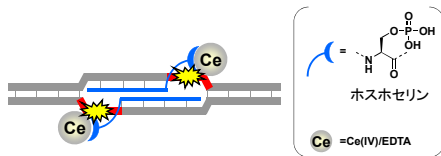


図 5 ホスホセリンによる PNA の修飾

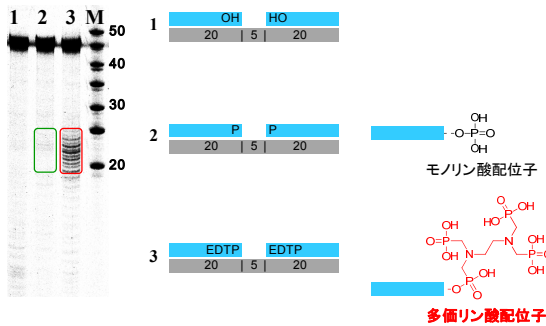


図 6 Ce(IV)/EDTA 錯体と多価リン酸配位子修飾 DNA を用いた一本鎖 DNA の効率的な切断。モノリン酸配位子の場合は、ほとんど切断されない条件であっても、多価リン酸配位子を使用すると効率的な選択的切断が観測される (赤枠部分)。
[基質 DNA] = 1 μ M、[Ce] = 50 μ M。

また、DNA 切断の活性種である Ce(IV)錯体の調製方法についても種々追究した。その結果、多価リン酸配位子に Ce(III)塩を加え、Ce(III)を多価リン酸に配位させた後に分子状酸素で酸化して Ce(IV)錯体を調製するという新たな方法を確立した (図 7)。明確な構造を持つ Ce(IV)錯体が調製できるのが最大の長所である。

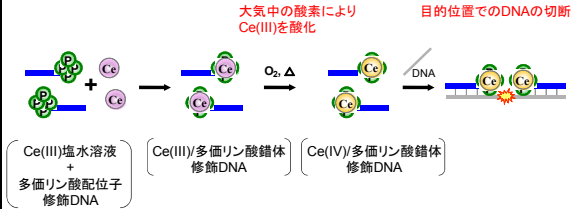


図 7 Ce(III)塩からスタートする Ce(IV)錯体-DNA ハイブリッドの新規調製法

実際に、この方法により Ce(IV)-DNA ハイブリッドを構築すると、Ce(IV)/EDTA を用いた系よりも、塩基配列特異的な DNA 切断能が飛躍的に向上した (図 8)。こうして調製される第二世代のスーパー制限酵素は、高活性でしかも構造が明確であり、さらに細胞内への導入も容易であると予想され、現在鋭意検討中である。

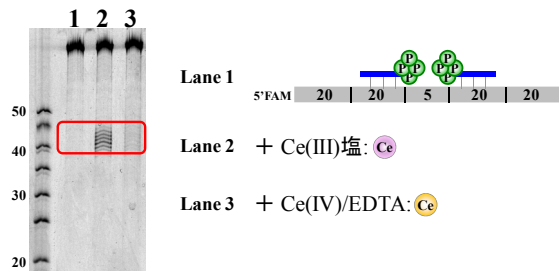


図 8 Ce(III)塩からスタートする Ce(IV)錯体-DNA ハイブリッドと Ce(IV)/EDTA 錯体を用いる系との比較。Ce(III)塩を用いた場合には、図 6 の条件と比較して、ごく低濃度の Ce で切断することが可能である。
[基質 DNA] = 1 μ M、[Ce] = 4 μ M。

ARCUT による切断で生成する DNA 断片と、他の DNA 断片とのリガーゼ反応の効率化にも成功した。ARCUT で得られる DNA 断片の末端は、特殊な接着末端構造を持つ。そこで、これらの末端と相補的な末端を持つ DNA 断片が直接に得られる新たな PCR 法を開発した。この PCR 法では、プライマーの中の特定の核酸塩基に、光により脱保護可能な保護基を導入する (図 9a)。すると、PCR 反応におけるポリメラーゼによる伸長反応が、保護基の入った核酸塩基の向かい側で停止する (図

9b)。したがって、PCR の後で生成物に光を照射して保護基を外すと、望み通りの末端構造を持つ PCR 断片が得られる (図 10)。この方法により、ARCUT を用いて調製した DNA 断片と相補的な接着末端構造を有する DNA 断片が容易に調製できる。この PCR 断片は、ARCUT 生成物と通常のリゲーション条件で容易かつ迅速に結合され、調製した組換え DNA は細胞内で正常に発現した。

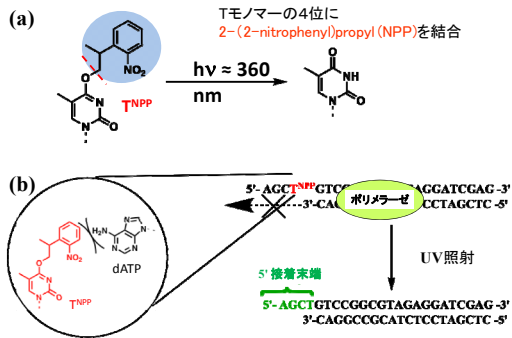


図 9 (a)光応答性塩基 (T^{NPP}) の構造と (b)保護基の入った核酸塩基の向かい側でのポリマーゼ反応の停止。保護基の立体障害のためにワトソン・クリック塩基対を形成することが出来ず、伸長が停止する。

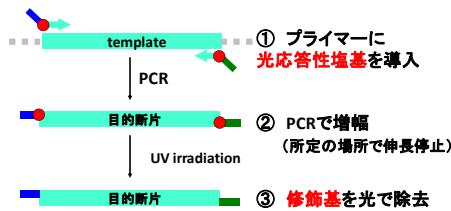


図 10 任意の粘着末端を持つ DNA 断片を直接に与える新たな PCR 法の概略

(3) ニュー・バイオツールとしての ARCUT の応用展開

まず、ARCUT の最大の特徴である“巨大 DNA の選択的切断能”を実証するために、各種のゲノムを選択的に切断した。図 11 はヒトゲノムの切断例である。切断場所の選択は全く自由であり、ここでは一例としてヒトゲノムの X 染色体に存在する FMR1 遺伝子付近を切断ターゲットとして ARCUT を設計した。ヒトの細胞から全ゲノムを抽出し、ARCUT で切断した後に、反応物をサザンブロッティングで解析した。その結果、ヒトゲノムの中の所定位置が選択的に切断されることを確認した。重要なことには、ヒトゲノムの中には、ターゲット配列と類似の配列が多数存在するが、これらの類似配列は全く切断されることがなく、ターゲット配列のみが切断されたことである。こうして、ARCUT がヒトゲノムの中の 1 カ所を選択的に切断できることを

明らかにし、この人工ツールが各種ゲノムのマニピュレーションに有用であることを確認した。

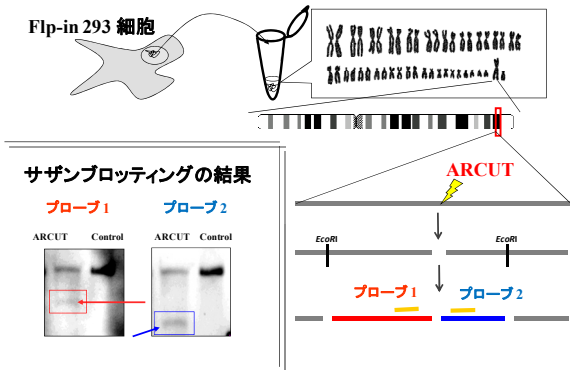


図 11 スーパー制限酵素 (ARCUT) によるヒトゲノム DNA の特異的な切断。ARCUT でターゲット部位を切断後、さらに制限酵素 (*EcoRI*) で切断。得られた赤と青の DNA 断片を、プローブ 1 とプローブ 2 を用いてサザンブロッティングにより解析。

さらに、ARCUT を用いることにより、ヒト細胞内での相同組換え (類似遺伝子同士の交換反応) の頻度を飛躍的に向上することに成功した。すなわち、この人工ツールを使って組換え標的部位の近傍を選択的に切断し、ヒト細胞内での DNA 修復能を活性化した。例えば、青色蛍光タンパク質遺伝子 (BFP) を持つプラスミド DNA 中の所定位置 (発光中心近傍) を ARCUT で切断し、緑色蛍光タンパク質 (GFP) の配列を持つドナー DNA 断片とともにヒト細胞に導入した (図 12a)。GFP と BFP は発光中心を除いて酷似しているため、実際に設計通りに非常に高い効率で相同組み換えがヒト細胞内で進行し、BFP の断点が GFP を鋳型として修復された。その結果、緑色蛍光を発するタンパクが効率的に産生した (図 12b)。既述のように、ARCUT は切断サイトが自在に設計でき、ヒトのゲノムの中の 1 カ所を選択的に切断することができる。こうして、ARCUT が、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などを人為的に誘起する新たなツールとして極めて有用であることが明らかとなった。

また、これらの知見を発展させて、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。ヒトテロメアは (TTAGGG)_n という繰り返し配列を持つので、これと G カルテットを形成して特異的に結合する修飾オリゴヌクレオチドを合成し、これに多価リン酸配位子を結合した。ここに Ce(IV)/EDTA を加えて反応させると、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）が選択的に切断された（図13）。

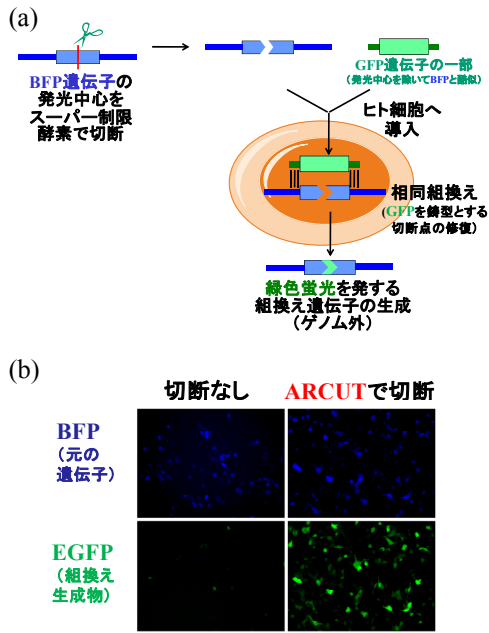


図12 スーパー制限酵素（ARCUT）で切断したBFP遺伝子のヒト細胞内での相同組換え。(a)実験の概略。(b)細胞導入2日後の蛍光顕微鏡写真。ARCUTで切断した場合のみ、明確な緑色の蛍光が観測される。

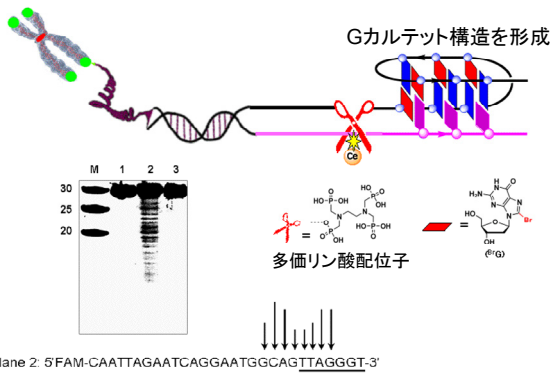


図13 ヒトロメア配列を選択的に切断する人工カッター

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51件）

- 1) “Oxidation of Oligonucleotide-bound Ce(III)/Multiphosphonate Complex for Site-Selective DNA Scission”, T. Lönnberg, Y. Aiba, Y. Hamano, Y. Miyajima, J. Sumaoka, M. Komiyama, *Chem. Eur. J.* **2010**, *16*,

855-859.

- 2) “Introduction of Disulfide Bond to the Main Chain of PNA to Switch Its Hybridization and Invasion Activity”, Y. Aiba, M. Komiyama, *Org. Biomol. Chem.* **2009**, *7*, 5078-5083.
- 3) “Precise Site-Selective Termination of DNA Replication by Caging The 3-Position of Thymidine and Its Application to Polymerase Chain Reaction”, A. Kuzuya, F. Okada, M. Komiyama, *Bioconjugate Chem.* **2009**, *20*, 1924-1929.
- 4) “Homologous Recombination in Human Cells using Artificial Restriction DNA Cutter”, H. Katada, H. J. Chen, N. Shigi, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2009**, 6545-6547.
- 5) “Site-Selective Scission of Human Genome by Artificial Restriction DNA Cutter”, K. Ito, H. Katada, N. Shigi, M. Komiyama, *Chem. Commun.* **2009**, 6542-6544.
- 6) “SSB-Assisted Duplex Invasion of Preorganized PNA into Double-Stranded DNA”, T. Ishizuka, T. Tedeschi, R. Corradini, M. Komiyama, S. Sforza, R. Marchelli, *ChemBioChem*, **2009**, *10*, 2607-2612.
- 7) “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.
- 8) “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.
- 9) “Artificial Restriction DNA Cutters as New Tools for Gene Manipulation”, H. Katada, M. Komiyama, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 1279-1288. (DOI)
- 10) “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.
- 11) “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.
- 12) “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.
- 13) “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.
- 14) “Solid-Phase Synthesis of Pseudo-Complementary Peptide Nucleic Acids”, M. Komiyama, Y. Aiba, T. Ishizuka, J. Sumaoka, *Nat. Protoc.* **2008**, *3*, 646-654.
- 15) “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.
- [学会発表] (計 78 件)
- 1) Makoto Komiyama, “Artificial Restriction DNA Cutter for Manipulation of Huge DNA”, BIOCHEMISTRY and MEDICAL CHEMISTRY: BIOMEDCH'10, University of Cambridge, Cambridge, UK (February 23-25, 2010, Plenary Lecture)
- 2) Makoto Komiyama, “Genome manipulation using artificial restriction DNA cutter (ARCUT)”, International Symposium on "Multifunctional Organic Materials and Devices", Chiba (December 11-12, 2009).
- 3) Makoto Komiyama, “Molecular design and application of artificial restriction nuclease”, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC 14), Nagoya (July 25-30, 2009)
- 4) 嶋成実、堅田仁、陳萱容、伊藤健一郎、野口恵理、小宮山眞、”Artificial Restriction DNA CUTter (ARCUT): a powerful tool for gene targeting in human cell mediated by homologous recombination”, 第 32 回分子生物学会年会、3P-0848、横浜 (2009 年 12 月 11 日)
- 5) 伊藤健一郎、堅田仁、嶋成実、小宮山眞、”人工制限酵素を用いたヒトゲノムの位置特異的切断”、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、1P-117、福岡 (2009 年 9 月 14 日)
- 6) 岡田文徳、葛谷明紀、小宮山眞、”ポリメラーゼ反応を局所的に停止させる新規ケージドヌクレオチドの合成と PCR への応用”、第 24 回生体機能関連化学シンポジウム、1P-123、福岡 (2009 年 9 月 14 日)
- 7) 愛場雄一郎、濱野悠也、河邊明博、鈴木裕太、Tuomas Lönnberg、徐岩、須磨岡淳、小宮山眞、”リン酸系配位子による人工 DNA カッター ARCUT の高効率化”、第 19 回バイオ・高分子シンポジウム、23、東京 (2009 年 7 月 30 日)
- 8) 須磨岡淳、”希土類錯体のバイオテクノロジーへの応用”、第 26 回希土類討論会、奨

励賞 (足立賞) 受賞講演、札幌 (2009 年 5 月 29 日)

- 9) 伊藤健一郎、堅田仁、嶋成実、小宮山眞、”人工制限酵素を用いたヒトゲノムの位置特異的切断”、日本化学会第 89 春季年会、2H6-16、千葉 (2009 年 3 月 28 日)

[図書] (計 2 件)

- 1) 小宮山眞、須磨岡淳、”スーパー人工制限酵素”、酵素利用技術体系、小宮山眞編、株式会社エヌ・ティー・エス (2010 年 4 月)、第 4 編第 5 章第 5 節 pp370-375
- 2) 小宮山眞、堅田仁、宮島佳孝、”人工ヌクレアーゼ”、超分子サイエンス&テクノロジー、国武豊喜編、株式会社エヌ・ティー・エス (2009 年 5 月)、第 4 章第 2 節、pp904-912

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称：標的核酸を位置選択的に切断する方法
発明者：小宮山眞、レンベルク・トーマス、鈴木啓太

権利者：東京大学

番号：2007-299747(P C T08-0059)

出願年月日：2007.11.19

名称：粘着末端を有する DNA 断片の調製方法

発明者：小宮山眞、葛谷明紀、田中啓太

権利者：東京大学

番号：特願 2008-61678

出願年月日：2007.3.11

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

浅沼 浩之 (ASANUMA HIROYUKI)

名古屋大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号：20282577

須磨岡 淳 (SUMAOKA JUN)

東京大学・先端科学技術研究センター・

講師

研究者番号：10280934