

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04849

研究課題名（和文）TALEの高いDNA配列認識特性を利用した遺伝子変異検査法の開発

研究課題名（英文）Development of genetic test method utilizing DNA sequence recognition characteristics of TALE.

研究代表者

迫野 昌文（Sakono, Masafumi）

富山大学・学術研究部工学系・准教授

研究者番号：50391959

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：特定の位置にミスマッチを故意に導入したTALEを作製（ミスマッチ法）すると、DNAの1塩基の違いを明確に区別し、劇的に解離定数が変化した。ミスマッチ法で作製したTALENは、ターゲット配列を選択的に切断し、1塩基異なる非ターゲット配列は切断されなかった。この結果は、ミスマッチ法で作製したTALEが、従来法で作製したTALEよりも、高い配列特異性と正確性があることを意味している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノム編集技術は細胞の特定の遺伝子を塩基配列特異的に編集できる技術だが、類似の塩基配列をもつ目的外の遺伝子の編集リスクが存在する。オフターゲット効果の低減は、発がんリスクの低減において極めて重要である。現在の塩基配列分析法において、in vivo遺伝子修正による目的遺伝子以外の遺伝子改変が生じた際の、改変部位の特定は非常に難しいといわれている。オフターゲット変異はゲノムワイドに生じることから、精度の高い全ゲノムシーケンス解析が要求される。したがって、意図しない編集が行われた際の部位特定は現状困難であり、治療の安全性を担保するには、正確性の高い遺伝子編集技術の開発が極めて重要であるといえる。

研究成果の概要（英文）：When TALE was prepared by deliberately introducing a mismatch at a specific position, the difference in one base of DNA was clearly distinguished, and the dissociation constant changed dramatically. TALEN produced by the mismatch method selectively cleaved the target sequence, and did not cleave non-target sequences that differed by one base. This result means that the TALE prepared by the mismatch method has higher sequence specificity and accuracy than the TALE prepared by the conventional method.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：遺伝子検査 TALEN ゲノム編集

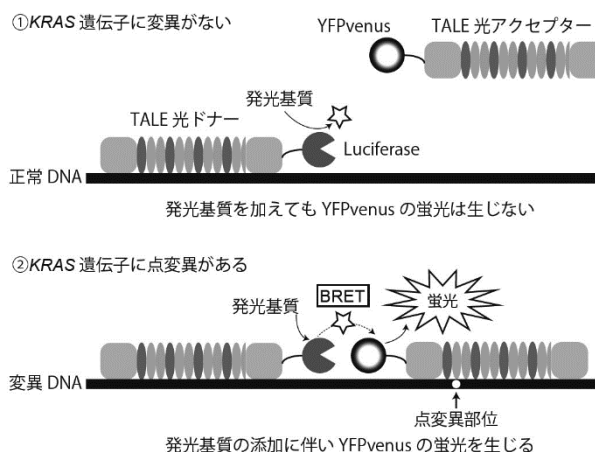
## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌の治療において、抗 EGFR 抗体を用いた化学療法が有効であるが、一部の患者の癌細胞で生じる *RAS* 遺伝子の点変異により治療効果が大きく低減することが知られている。したがって、化学療法の有効性を高めるために、患者ごとに *RAS* 遺伝子の変異の有無を検査することが求められている。*RAS* タンパク質には、*KRAS*、*NRAS*、*HRAS* の 3 種のアイソフォームが存在し、大腸癌においては *KRAS* 遺伝子のエクソン 2 (コドン 12, 13) に高頻度に変異が現れることから、*KRAS* 遺伝子検査が主に実施されている。しかし、検査対象である *KRAS* エクソン 2 (コドン 12,13) 以外に、他のアイソフォームやエクソンにおいても薬理効果予測因子となる変異が明らかになっている。よって、将来的には、現在よりも多様な *RAS* 遺伝子変異を検査する要求が高まると予想される。

*RAS* 遺伝子検査は、サンガー法による DNA シークエンス解析をもとにしたダイレクトシークエンス法が多く用いられてきた。本手法は、検出可能な変異の数が多いという利点を有するが、測定感度が低いという問題がある。腫瘍部位から遺伝子検査用に癌細胞を回収する際に、正常細胞のコンタミネーションにより偽陰性を招くことが感度低下の要因となり、正確な診断には癌細胞を高純度で回収する高度な外科技術が要求される。現在、Luminex 法に代表される DNA タイピングによる高感度検出法が開発されており、測定感度限界の向上が実現している。しかし、DNA 断片を固定した蛍光ビーズの調製や、ハイブリダイゼーション後の洗浄を必要とするため測定が煩雑になることや、測定にフローサイトメトリーが用いられるなど高度な測定技術が要求される。これらは、検査費用の高額化を招く要因となることから、測定感度の高い、操作の簡便な遺伝子検査法の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究は、DNA 結合タンパク質 TALE と変異 DNA の複合体形成を、生物発光共鳴エネルギー転移 (BRET) で検出するシステムを構築し、簡便かつ高感度な遺伝子検査法を実現することが目的である。TALE は、CRISPR/Cas9 と並ぶゲノム編集のツールとして近年注目されている。図 1 に示すように、TALE はチミンを先頭とする 10-20 塩基の二本鎖 DNA に対して配列依存的に相互作用することができる。DNA に対する解離定数は nM オーダーであり、配列認識が厳密であるため、ターゲット DNA に対して強く、正確に相互作用することができる。例えば、変異配列に結合する TALE を作製することで、正常 DNA とは相互作用せず、変異 DNA と複合化することが可能となるため、この複合体形成を検出することで遺伝子変異の存在を明らかにできる。



そこで、2 つの TALE を用いて、ターゲット DNA と三者複合体を形成したときのみ、BRET を生じる光学的検出手法を適応する。BRET は、発光基質の発光エネルギーが近傍の蛍光タンパク質に移動する現象であり、蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) と同様にそれぞれの分子間距離が蛍光発現に影響する。検査対象となる変異部位の上流に発光タンパク質融合 TALE (TALE 光ドナー) を配置し、蛍光タンパク質融合 TALE (TALE 光アクセプター) が DNA に結合したときに BRET が生じるようにデザインする。したがって、本手法は、PCR による検査遺伝子断片の増幅後、TALE と発光基質を添加し、マイクロプレートリーダーで蛍光測定することで検査可能であり、簡便な操作性、および、必要とする機器・試薬類にかかるコストは、現在の技術よりも大きく利点があると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) TALE (光ドナー、光アクセプター) の調製、および BRET の最適化  
*KRAS* 遺伝子のコドン 12 (GGT) が GAT に変異した配列と相互作用する TALE を光アクセプターとする。認識配列の異なる光ドナーを複数種類作製し、光ドナーと光アクセプター間の距離が三者複合体形成に及ぼす影響と、BRET のシグナル強度の変化を検討する。

## (2) 点変異ヌクレオチドの同定

変異の有無だけでなく、どのヌクレオチドに変異しているかを明らかにする。マイクロプレートを用いて PCR を行い、各種点変異ヌクレオチドに対応する TALE 光アクセプターをウェルに添加し BRET を測定する。蛍光が観察されたウェルに添加した光アクセプターの認識配列より、変異配列を推定する。

## (3) 正常遺伝子が混在したサンプルの遺伝子検査

ダイレクトシーケンス法において問題となる、正常遺伝子のコンタミネーションの影響を検討する。具体的には、正常配列および変異配列の KRAS 遺伝子を有するプラスミドベクターをそれぞれ作製し、任意の割合で混合したプラスミドを鋳型として、PCR を行う。PCR 産物に光ドナー、光アクセプターを添加し、BRET シグナルへの影響を検討する。

## (4) 化学療法に抵抗する RAS 遺伝子変異の検出に対応する TALE (光ドナー, 光アクセプター) のライブラリ化

KRAS コドン 12, コドン 13 を含むエクソン 2 の変異は大腸癌患者の 40% 弱に認められる一方、少ない頻度ではあるが、KRAS エクソン 3, 4 および NRAS エクソン 2, 3, 4 においても化学療法の効果を下げる変異が認められている。これらをターゲットとした TALE の組み合わせを作製し、マイクロプレート上で網羅的に変異検出可能な TALE ライブラリを構築する。

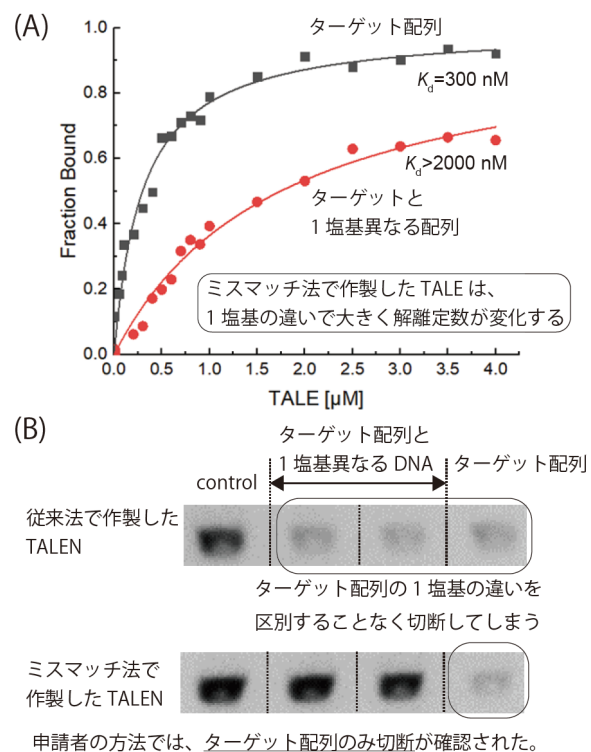
## 4. 研究成果

(1) 2 種類の TALE および DNA 存在下における BRET 発光評価を行った。標的とした KRAS 遺伝子の一塩基変異型 (Mutant) のみ高い蛍光強度を示し、KRAS 配列を持たない DNA および KRAS 遺伝子の野生型 (Wild type) では強度が著しく減少した。

(2) 蛍光偏光解消法より解離定数 ( $K_d$ ) の値が変異型では 300 nM、野生型では >2000 nM と推定され、任意に挿入した一塩基ミスマッチが DNA との相互作用に大きく影響していることが示唆された。これらの結果から標的配列にあらかじめ一塩基ミスマッチを持たせた TALE は DNA 配列中の一塩基変異による一塩基の違いを正確に見分けられることが示唆された。

(3) TALEN による DNA 切断評価を行った。標的配列である KRAS (GAT) のときのみ選択的に切断されており、それ以外の KRAS 配列では切断がほとんど起こらなかった。この結果から標的配列にあらかじめ一塩基ミスマッチを持たせた TALEN は DNA 配列中の一塩基の違いを正確に認識した切断が可能であり、オフターゲット効果を大きく低減していることが示唆された。

(4) 本研究では、標的配列にあらかじめ一塩基分のミスマッチを持たせた TALE を作製することにより DNA 配列中の一塩基の違いを正確に見分けられること、また一塩基分のミスマッチを持たせた TALEN によりオフターゲット効果を大きく低減した切断が可能であることが示された。このようなオフターゲット効果を低減した TALEN を用いることでゲノム編集を従来よりも正確に行うことが可能になると考えられる。この能力を活かした新たなゲノム編集治療への応用が期待される。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakono Masafumi、Hayakawa Ryoto	4. 巻 22
2. 論文標題 Repressor Like On Off Regulation of Protein Expression by the DNA Binding Transcription Activator Like Effector in T7 Promoter Based Cell Free Protein Synthesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemBioChem	6. 最初と最後の頁 888 ~ 893
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cbic.202000591	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 SAKONO Masafumi、ARISAWA Taiki、OHYA Takuma、SAKONO Naomi、MANAKA Atsushi	4. 巻 37
2. 論文標題 Preparation of Luciferase-fused Peptides for Immunoassay of Amyloid Beta	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 759 ~ 763
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.20SCP19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nakao Hitomi、Seko Akira、Ito Yukishige、Sakono Masafumi	4. 巻 536
2. 論文標題 Dimerization of ER-resident molecular chaperones mediated by ERp29	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 52 ~ 58
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.12.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 SAKONO Naomi、NAKAMURA Kosuke、OHSHIMA Tatsuki、HAYAKAWA Ryoto、SAKONO Masafumi	4. 巻 35
2. 論文標題 Tyrosinase-mediated Peptide Conjugation with Chitosan-coated Gold Nanoparticles	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Analytical Sciences	6. 最初と最後の頁 79 ~ 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2116/analsci.18SDP03	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大谷拓摩・迫野昌文
2. 発表標題 一塩基の違いを区別するゲノム編集は可能か？
3. 学会等名 化学工学会第85年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大谷 拓摩・迫野 昌文
2. 発表標題 DNA結合タンパク質TALEを用いたBRETベース遺伝子変異検出法の開発
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大谷拓摩・迫野昌文
2. 発表標題 DNA結合タンパク質を用いた一塩基変異検出系の構築
3. 学会等名 第8回CSJ化学フェスタ2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷 拓摩・迫野 昌文
2. 発表標題 DNA結合タンパク質TALEを用いた一塩基変異検出系の開発
3. 学会等名 化学工学会 第50回秋季大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------