

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K04859

研究課題名(和文)立体構造情報にもとづく制限酵素FokIのDNA切断反応機構の解明

研究課題名(英文)Structural basis of DNA cleavage by FokI restriction enzyme

研究代表者

加藤 義雄 (Kato, Yoshio)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・研究グループ長

研究者番号：20415657

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：TypeIIISに属する制限酵素FokIのDNA認識切断機構を解明するため、FokI-DNA複合体の立体構造解析を目指した。精製したFokIとDNAの複合体の結晶化条件を探索し、複数の条件において形成された結晶について、X線を当ててみたが、解析可能な回折像を得ることができなかった。これは、FokIとDNAが特徴的な多量体を形成しているためであると考えられた。TypeIIIS酵素の構造的な理解が深まることによって、精緻なゲノム編集や、巨大DNA分子のその応用先も広がることが想定される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

TypeIIIS制限酵素は、ゲノム編集技術や人工遺伝子合成技術に活用されている。しかしTypeII制限酵素がどの様にしてDNAを認識しているのか、まだ明らかになっていない点が多く存在している。そこで、TypeII制限酵素に属するFokI制限酵素を題材として、その認識メカニズムの解明を目指している。FokI制限酵素は、DNAと1:1で単純に相互作用していないことがわかった。今後の解析を深めていくことにより、より厳密なゲノム編集技術や人工遺伝子合成技術へと展開していくことが期待される。

研究成果の概要(英文)：To understand the mechanism of action of FokI restriction endonuclease, classified as TypeIIIS, we have attempted the structural analysis of FokI-DNA complex. Purified FokI protein and the cognate DNA were subjected to the crystal screening. Several crystals were analyzed by X-ray, however, the appropriate diffraction images could not be obtained, probably due to the multimer complex among FokI proteins and DNAs. Molecular mechanism of action of TypeIIIS restriction enzymes will provide important information on high-fidelity genome editing and DNA assembly tools.

研究分野：生体分子工学

キーワード：制限酵素 ゲノム編集 DNA 立体構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

FokI は、GGATG 配列を認識する DNA 結合ドメインと、塩基特異性のないヌクレアーゼドメインから構成されている。1996 年にジンクフィンガー-DNA 結合タンパク質と FokI ヌクレアーゼドメインを融合したジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) が開発され、ゲノム編集技術として一躍注目を集めた (Kim et al., *PNAS*, 1996)。2010 年には TALE タンパク質と FokI ヌクレアーゼドメインを融合した TALEN が登場し、2013 年には CRISPR/Cas によるゲノム編集が報告された。原核生物由来の CRISPR システムの特異性の低さを補うために、切断非活性型 dCas9 に FokI ヌクレアーゼドメインを融合した dCas9-FokI が開発され、著しくゲノム編集の特性が向上したことが報告されている (Guilinger et al., *Nat. Biotech.* 2014)。

上述の通りゲノム編集において極めて重要な役割を担う FokI であるが、DNA を切断する詳細な機構は、まだ明らかとなっていない。天然の FokI 制限酵素の X 線結晶構造が報告されているが (Wah et al., *Nature*, 1997) FokI の触媒中心と DNA の切断リン酸が 50 以上離れており、「活性型の」構造ではないことが判明している (図 1B)。結晶を調製する条件において活性に必須となる 2 価金属イオンが含まれていなかったことに起因すると考えられる。

その後、FokI が 2 量体として機能することが明らかとなっているが (Wah et al., *PNAS*, 1998) 現在に到るまで、天然の FokI の活性構造は不明である。続いて 2001 年に ZFN の活性構造モデル (Bibikova et al., *Mol. Cell Biol.*, 2001) が提示されているが、酵素反応機構的にこのモデルは否定された (Sanders et al., *NAR*, 2009; Halford et al., *Biochem. Soc. Trans.*, 2011)。対照的なわかりやすいモデルだったため、未だ、誤ったモデルが使用され続けている (図 2)。

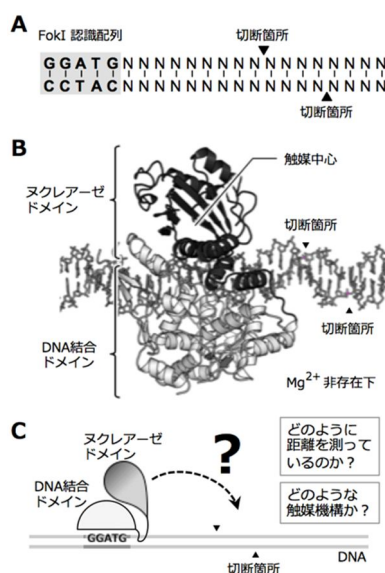


図1 A. FokIは9塩基離れた箇所を切断する。 B. 1997年のFokIの結晶構造 (PDB:1FOK)。 C. 未解明の分子機構。

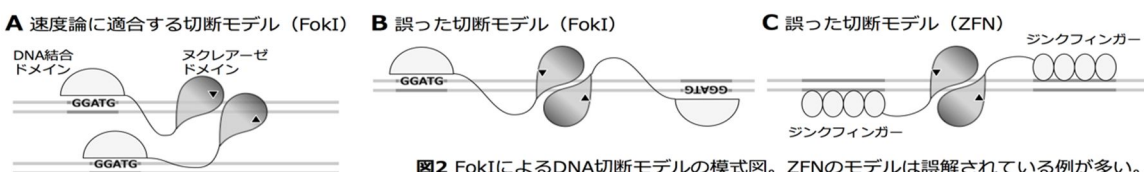


図2 FokIによるDNA切断モデルの模式図。ZFNのモデルは誤解されている例が多い。

2. 研究の目的

FokI の DNA 切断メカニズムを明らかにするためには、活性型の立体構造を明らかにしなければならない。そのため本研究では、活性状態における FokI タンパク質と基質 DNA の複合体の立体構造を決定することを目的とする。活性状態の FokI・DNA 複合体の構造決定のため、2 価金属イオンの存在下において結晶化しその構造を決定する。これまでに Mg²⁺、Mn²⁺または Zn²⁺存在下において DNA を切断するが、Ca²⁺存在下では DNA 切断活性を示さないことが明らかとなっている。Type IIP 制限酵素の BamHI では、Ca²⁺存在下において DNA を切断しないが、活性型と同様なフォールドを形成することが知られており (Viadiu & Aggarwal, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 1998)。BamHI とフォールドが類似している FokI においても、Ca²⁺存在下において活性型構造を得られる可能性が高い。ただし FokI は BamHI とは異なり、離れた箇所を正確な距離で切断する機能があり、非活性状態から活性状態へのダイナミックな構造転換や、DNA 上の距離を測る新しい分子メカニズムを、本研究によって初めて明らかにすることが可能となる。

3. 研究の方法

に十分な回折像を得ることができず、目指してきた分子機構の解明には至っていない。その原因については、(1)タンパク質配列、(2)DNA 配列、(3)複合体形成条件、(4)結晶化条件、の観点から追求していく必要がある。また、結晶化条件が見つかったとしても回折データが得られないケースも、本研究結果と同様に、かなりの割合で生じうる。まだ結晶学的に統一したルールが整備されておらず、その方向性も不明である一方で、特異点的な条件が見つかる場合もあり、今後も引き続き条件の探索を実施する。タンパク質の結晶構造が得られない場合の回避手法として、近年、クライオ電子顕微鏡が利用されており、本研究でも FokI と DNA との複合体の構造解析を試行したところ、撮像することに成功している。本研究で構築してきた資産を活用し、データを蓄積することによって、FokI 制限酵素の DNA 認識切断機構に迫りたいと考えている。

ゲノム編集技術で最も注目されている CRISPR/Cas は、繰り返し配列として見出された後 (Ishino et al., J.Bacteriol, 1987)、原核生物における獲得免疫システムとして再発見された。制限酵素も、もともと、ファージ等に由来する外来遺伝子を破壊する、自然免疫システムとしての研究が始まりであった。その後発見された制限酵素の多くはパリンドローム配列を持つ Type IIP (Palindrome) であり、精力的な研究が進められて来たが、認識配列と切断配列が離れている Type IIS (Shifted) については、その有用性にもかかわらず、構造的な知見が不足してきた。なぜ、Type IIS 酵素が認識配列から離れた箇所を切断する必要があるのか、微生物における生体防御や自然免疫において生物学的な意義を理解する上で、本研究のアプローチが有益であると考えられる。また、FokI が属している Type IIS 制限酵素は、ゲノム編集だけではなく、Golden Gate Assembly (Engler et al., PlosOne, 2008) 等の人工遺伝子合成にも活用されている。Type IIS 酵素の構造的な理解が深まることによって、精緻なゲノム編集や、巨大 DNA 分子構築の応用先も広がることが想定される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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 |
|-------|---|---|----|
| 研究分担者 | 竹下 大二郎 (Takeshita Daijiro) (80613265) | 国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任 研究員 (82626) | |

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 |
|---------|---------|
| | |