

令和 5 年 5 月 15 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19223

研究課題名（和文）生体深部の光遺伝子治療を可能にする革新的光応答人工DNA修復酵素の開発

研究課題名（英文）Development of an artificial light-responsive DNA repair enzyme toward deep light-dependent gene therapy

研究代表者

山元 淳平（Yamamoto, Junpei）

大阪大学・大学院基礎工学研究科・准教授

研究者番号：90571084

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、紫外線によって化学構造が変化した損傷DNAを青色光依存的に元の塩基構造へと戻す光回復酵素と呼ばれるDNA修復酵素の機能拡張を目指し、青色蛍光タンパク質を部分構造に持つ人工DNA修復酵素の開発を行なった。その結果、従来の野生型酵素と比較して最大で2.5倍のDNA修復活性を持つ人工酵素の開発に成功した。一方で、当初予想した青色蛍光タンパク質からのエネルギー移動を介した高効率化とは異なる機構で反応が進行することを見出した。今後、その高機能化の分子機構を明らかにする必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA修復に関するタンパク質群の遺伝的な欠失は様々な遺伝子疾患の原因となる。したがって、DNA修復活性を向上させた人工酵素は、これら遺伝子疾患の遺伝子治療法となる可能性を秘めているため、基礎科学の発展のみならず医学や工学への応用研究の礎となる。今回、当初目的としていた機構に従う人工酵素は得られなかった一方で、酵素の部分構造を改変することで酵素機能が向上することを見出している。今後その構造を明らかにすることで酵素構造と活性の相関を取ることができ、酵素活性を自在にデザインする第一歩となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I aimed to develop an artificial DNA repair enzyme bearing blue fluorescent protein (BFP) as a partial structure within the whole architecture toward the functional expansion of a DNA repairing enzyme photolyase, responsible for restoration of intact bipyrimidine nucleobases from ultraviolet-induced DNA damage using blue light. After the screening of the functional enzyme using bacteria followed by the in-vitro evaluations, I finally obtained an artificial BFP-fused photolyase with 2.5-fold higher activity than the wild-type enzyme. Contrary to my initial assumption, however, the enhancement of the activity has been achieved not via the energy transfer from the fluorophore moiety in BFP. Further investigations will be required to address the molecular mechanism of the functional enhancement.

研究分野：光生物

キーワード：DNA修復 DNA損傷 人工酵素 機能改変

1. 研究開始当初の背景

ヒトが紫外線に曝されることで、遺伝情報の本質である DNA の化学構造が変化し、変異原性の高い紫外線損傷 DNA が形成される。ヒトはこれを元に戻す DNA 修復機能を有しており、この機能の変質は高発がん性・高紫外線感受性を示す疾患の原因となる。その一例が色素性乾皮症 (XP) と呼ばれる疾患である。XP は紫外線損傷 DNA の修復を担うヌクレオチド除去修復機構に関与するタンパク質をコードする遺伝子の先天的異常により引き起こされ、日本人では 500~600 名程度の患者が認められている、根治が困難な指定難病のひとつである。現在でも有効な治療法はなく、その開発が強く求められている。

光回復酵素 (Photolyases, PLs) はフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) を補因子として有するフラビタンパク質の一つであり、青色光に应答して、紫外線によって化学構造が変化した損傷 DNA を光依存的に元の塩基構造へと修復することができる酵素である (図 1 A)。その反応は、2 電子還元型 FAD (FADH⁻) から損傷 DNA への電子移動反応が鍵である。ナノ秒の時間領域で反応が完結し、高効率で損傷 DNA を修復することができることから、ヒトへの PL 遺伝子の導入は XP を始めとした紫外線損傷 DNA 修復経路が欠失した遺伝的疾患の遺伝子治療法として注目を集めている。ヒト細胞に対して PL を導入する試みは 2000 年代前半からなされ始め、PL を HeLa 細胞へ導入することで、紫外線によって誘起されるアポトーシスの減少¹や、UVB 曝露に起因する炎症作用の軽減²といった効果が報告されている。また、より効率よくかつ簡便に CPD 光回復酵素の遺伝子を導入するため、mRNA として初代ケラチノサイトへの導入がなされ、医療応用への方向性が示された³。実際に、PL 遺伝子を有するトランスジェニックマウスが作成され、紫外線耐性の部分的な向上が報告されている⁴。一方で、PL による DNA 修復には、生体透過性が低い青色光が必要であるため、PL を用いた光遺伝子治療の生体組織への適応には限界があった。

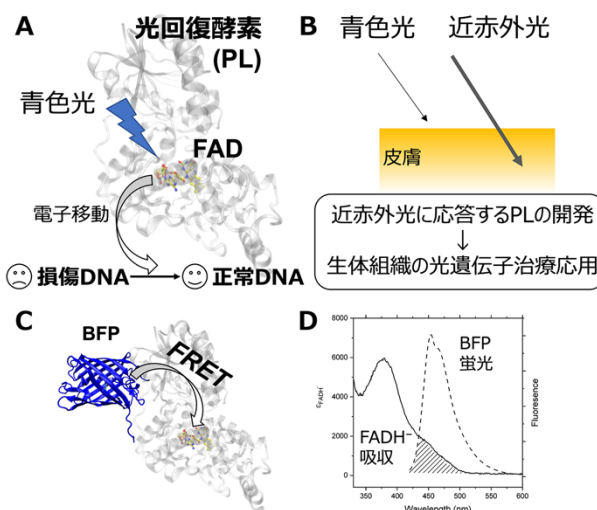


図 1. (A) 光回復酵素、(B) 本研究の目的、(C) BFP を有するキメラ PL、(D) 吸収発光スペクトル

2. 研究の目的

本研究では、生体表面のみならず生体組織の深部数 mm に至る領域まで DNA 修復が可能な革新的遺伝子治療法の開発に向け、生体透過性が高い近赤外線によって DNA 修復反応を引き起こすことができる人工光回復酵素を開発することに挑戦した (図 1 B)。

今回、青色蛍光タンパク質 (Blue Fluorescent Protein, BFP) に注目した (図 1 C)。BFP の吸収波長は 400 nm を極大とし、その蛍光スペクトルは FADH⁻ の吸収と重なりを示すため (図 1 D)、BFP 発色団と FADH⁻ 間の配向と距離が適切であれば、フェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) による高効率 DNA 修復が可能になると考えられる。また、BFP は多光子顕微鏡での利用例もあり、2 光子励起が可能な分子であることが知られている。このことから、BFP の 2 光子励起に起因する FRET を利用することで、近赤外線レーザー光による 2 光子励起を経由した DNA 修復反応が引き起こされる可能性が高い。

そこで、BFP 遺伝子を PL 遺伝子中に挿入することで、BFP を内部に保有する PL キメラタンパク質を調製することを着想し、萌芽期の探索段階として、PL 中に導入する BFP の位置最適化および得られたキメラタンパク質の特性解析を行った。

3. 研究の方法

遺伝子材料となる PL として、*Thermus thermophilus* 由来 CPD 光回復酵素 (TthCPD) を用い、TthCPD 遺伝子の一部を BFP 遺伝子で置換することで、PL キメラタンパク質人工遺伝子を作成した。TthCPD は申請者の先行研究にて、人工蛍光分子を共有結合的に導入することで DNA 修復効率の向上に成功した PL である⁵。予試験として、人工蛍光分子が導入された箇所を参考に、その箇所を BFP で置換した人工 PL を調製したところ、BFP を持つ PL を遺伝子組換えタンパク質として得ることができた一方で、DNA 修復活性が完全に失われることがわかっていった。つまり、BFP を適切な位置に導入しなければ、PL 本来の酵素活性すら保つことができないため、種々の人工遺伝子から DNA 修復活性を持つものを適切にスクリーニングし、その中から DNA 修復活性を試験管内で評価する戦略を採用した。

スクリーニングには、大腸菌を用いたサバイバルアッセイを用いた。種々の DNA 修復経路が欠失した大腸菌株 SY2 に対して野生型ならび人工 PL 遺伝子を有するプラスミドを導入したのち、紫外線照射に続く白色光照射を行うことで、野生型と同程度の生存率を示す人工 PL 遺伝子をスクリーニングした。続いて、その人工 PL 遺伝子をサブクローニングして人工 PL を遺伝子組換えタンパク質として得たのち、試験管内での青色光依存的 DNA 修復活性を評価した。

4. 研究成果

PL と BFP の間を繋ぐリンカーおよび BFP の導入位置をさまざまに変えた人工 PL 遺伝子を計 30 種類程度作成し、大腸菌サバイバルアッセイに供した。結果の一例を図 2 A に示す。予試験と同様に、作成した人工 PL 遺伝子から産生されるタンパク質の多くは DNA 修復活性が低減したために野生型よりも低い生存率を示す結果となった。

そこで、リンカーの種類を変え、BFP 導入位置をさらに細かく変えた人工 PL 遺伝子を 30 種類程度作成したところ、大腸菌生存率が野生型と同程度まで向上したプラスミドを同定することができた (図 2 B)。このうち、TthCPD の 143 番目から 153 番目のアミノ酸を BFP で置換したサンプル a~c、ならび TthCPD の 271 番目から 274 番目のアミノ酸を BFP で置換したサンプル d および e について、人工 PL 遺伝子をサブクローニングし、遺伝子組換えキメラタンパク質として得た。得られた人工キメラ PL はいずれも BFP に帰属される吸収帯を有し、さらに FAD 由来の吸収帯も観測されたことから、PL と同様の三次元構造をとっていることが推測された。

これらの DNA 修復活性を試験管内で評価した。嫌気セルに人工キメラ PL および還元剤を加えたのち、光照射を行うことで還元型 FADH を産生させ、そこへ暗下嫌気条件下にて CPD を有する DNA オリゴヌクレオチドを加えた。このサンプルに対して青色光を照射し DNA 修復反応を引き起こした。一定照射時間ごとにサンプルを回収し、HPLC で分析することで、DNA 修復効率を算出した (図 3 A)。その結果、サンプル a~c については野生型と同程度の効率、もしくは有意な差は見られなかった一方で、サンプル d および e については野生型と比較して有意に修復効率が向上し、それぞれ 1.9 倍および 2.5 倍の DNA 修復効率を示すことが明らかとなった。

この DNA 修復効率の向上が BFP からの FRET に起因するかどうかを調べるため、サンプル a および e について BFP 発色団の形成に関与するアミノ酸に対して変異を加えた変異体キメラ PL を作成し、DNA 修復効率を比較した。その結果、変異の導入前後で同程度の修復効率を示した (図 3 B) ことから、BFP を介した FRET による DNA 修復効率の向上が起こったのではなく、BFP 導入による PL の部分構造の変化に起因する可能性が示唆された。

以上の結果より、当初予定していた BFP からの FRET を介した高効率な DNA 修復を達成する人工酵素の開発は期間内には完了しなかった。その一方で、本研究から PL の部分構造を変えることで、DNA 修復活性を人工的に向上させることには成功した。この成果は依然報告に至っていないものの非常に新規性が高く、今後 DNA 修復活性向上の分子論を明らかにすることで、構造活性相関の詳細な描像を得られることが期待される。

<引用文献>

1. *Cancer Res.*, **2000**, *60*, 2458-2463.
2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2000**, *97*, 1790-1795.
3. *J. Photochem. Photobiol. B*, **2013**, *129*, 93-99.
4. *EMBO J.*, **2002**, *21*, 4719-4729.
5. *Nucleic Acids Res.*, **2020**, *48*, 10076-10086.

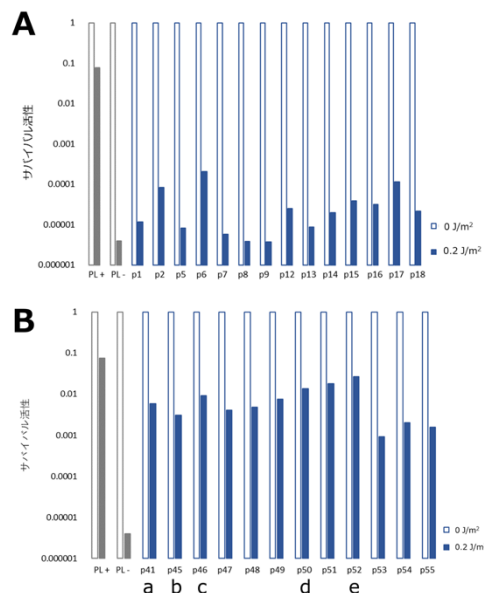


図 2. 大腸菌サバイバルアッセイによるスクリーニング結果

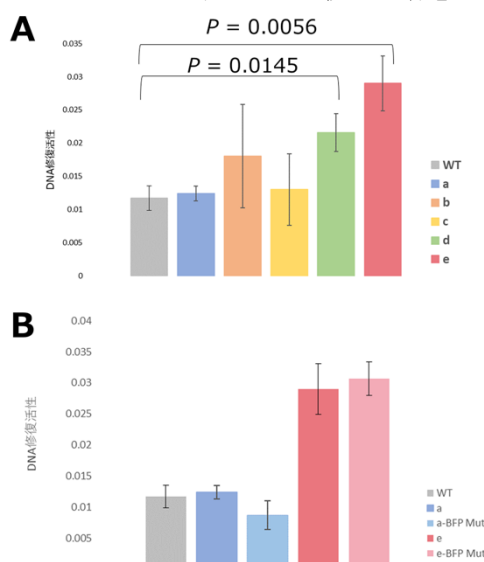


図 3. BFP 含有型キメラ PL の試験管内 DNA 修復活性評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ayaka Morimoto, Yuhei Hosokawa, Hiromu Miyamoto, Rajiv Kumar Verma, Shigenori Iwai, Ryuma Sato, Junpei Yamamoto	4. 巻 20
2. 論文標題 Key interactions with deazariboflavin cofactor for light-driven energy transfer in Xenopus (6-4) photolyase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Photochemical & Photobiological Sciences	6. 最初と最後の頁 875-887
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s43630-021-00065-3	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2件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三田愛、岩井成憲、山元淳平
2. 発表標題 高い光受容能を有する人工光回復酵素の開発とその遺伝子治療への応用
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山元淳平
2. 発表標題 核酸とタンパク質の狭間で：青色光受容DNA修復酵素によるDNA認識・修復反応機構
3. 学会等名 ISNAC2021・核酸化学若手フォーラム（招待講演）
4. 発表年 2021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
---------	---------