

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658077

研究課題名(和文) 新奇な構造をもつ制限酵素のDNA切断ドメインを利用した人工制限酵素の創製

研究課題名(英文) Creation of artificial endonuclease using DNA-cleavage domain of a novel restriction enzyme

研究代表者

喜多 恵子 (Kita, Keiko)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70234226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：制限酵素はDNA上の特異的な配列を認識して切断することから、遺伝子マニピュレーションのツールとして汎用されるとともに、DNA結合タンパク質としても興味深い研究対象である。本研究ではこれまでに報告されていない新奇な立体構造をもつ制限酵素EcoT38Iの部位特異的変異酵素を作成して酵素学的な諸性質を解析した結果、アミノ酸を1残基変化させることで野生型(GPuGCPyC)とは異なる配列特異性を持つ酵素(GAGCTC)へと改変させることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Restriction enzymes recognize and cleave DNA at specific site, and are both indispensable tools for gene manipulation and for studying sequence-specific interaction with DNA. Co-crystal structure of EcoT38I reveals several unique features for DNA recognition and catalysis. This study demonstrates that site-directed mutagenesis approach yielded a EcoT38I (GPuGCPyC) variant that preferentially cleaves one of the degenerate sequences (GAGCTC).

研究分野：農芸化学

科研費の分科・細目：応用微生物学

キーワード：制限酵素 分子工学 DNA ドメイン リンカー 分子間相互作用 構造機能相関 人工酵素

1. 研究開始当初の背景

現在、約 3,500 種類の制限酵素が真正細菌や古細菌から見出され、遺伝子マニピュレーションに汎用されている。標的遺伝子にピンポイントで変異を導入するゲノム編集技術は、さまざまな生物の遺伝子機能の解析や育種において必要不可欠である。ゲノム編集においては、ターゲットとする遺伝子の DNA だけを特異的に切断する必要があるため、天然の制限酵素は認識配列が短いため利用することができない。

ゲノムに特異的な切断を導入するためのツールとして、ジンクフィンガーヌクレアーゼや TALEN のような人工キメラヌクレアーゼが開発されており、これらの人工ヌクレアーゼには制限酵素 FokI 由来の DNA 切断ドメインが利用されている。

われわれは、G(G/A)GC(C/T)C の配列を認識する制限酵素 EcoT38I の X 線結晶構造解析を行った結果、本酵素は典型的な制限酵素とは異なり N 末端側ドメインと C 末端側ドメインがリンカーを介して結合したユニークな構造をとることを明らかにした。このようなドメイン構造は FokI などの非対称配列を認識する制限酵素では一般的であるが、対称配列を認識する制限酵素では報告されていない。また、EcoT38I は二量体を形成するにも拘らず 2 本鎖 DNA を同時に切断するのではなく 1 本ずつ切断することが示唆されており、本酵素の DNA 認識ドメインを他の DNA 結合タンパク質に置換することで既存の人工キメラヌクレアーゼとは異なる特異性を有する酵素が創出できるのではないかと考え本研究に着手した。

2. 研究の目的

ユニークな構造をもつ制限酵素 EcoT38I が特異的な塩基と相互作用して DNA を切断するために必要な因子を明らかにすることで反応メカニズムを推定して、人工ヌクレアーゼ等の認識特異性が変化した酵素を構築のための分子基盤を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

タンパク質単体および DNA-タンパク質複合体の X 線結晶構造解析情報をもとに、ドメイン間を連結するリンカー領域、二量体形成に関わるアミノ酸残基、DNA 上の認識配列の塩基と相互作用することが示唆されるアミノ酸残基を推定した。次に、以下に述べる方法に従って、それらの置換、挿入、欠失変異酵素を構築して、サブユニット間の相互作用、DNA 切断特異性、DNA-タンパク質間相互作用の解析を行い、野生型酵素との比較を行うことで、制限酵素 EcoT38I の DNA 認識ならびに反応メカニズムに関する基礎的知見を得るとともに、得られた知見をもとに新たな特異性を持つヌクレアーゼの構築をおこなった。

(1)変異酵素の構築と精製 His タグを付加した野生型酵素をコードする発現プラスミドを構築したのち、定法に従い部位特異的変異を導入して変異酵素を発現する組換え体大腸菌を作成した。大腸菌の抽出液から His タグ特異的アフィニティーカラムで精製を行い、高純度の酵素標品を調製した。

(2) DNA 切断特異性の解析 DNA 切断活性の測定には、10 mM Tris-HCl (pH7.5)、1 mM DTT、10 mM MgCl₂、50 mM NaCl の組成の反応液を使用し、野生型または変異型酵素を添加して 37 °C で反応を行った。

2 本鎖 DNA 切断活性は、基質として λ-DNA または T4-DNA を用いた場合はアガロースゲル電気泳動を行って反応生成物のフラグメントパターンの変化を解析することで測定した。基質として 2 本鎖オリゴ DNA を用いた場合は、マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA を使用して解析を行った。

1 本鎖 DNA 切断活性の測定には末端をピオチンで標識した 2 本鎖オリゴ DNA を基質として用い、反応生成物を変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。

ニック活性の測定には 2 本鎖閉環状プラスミドを基質として使用して、アガロースゲル電気泳動によりプラスミドのコンホメーション変化を解析した。

(3)分子間相互作用の解析

ゲルろ過カラムからの溶出位置によってサブユニット間相互作用を解析した。

DNA-タンパク質間相互作用は、標識 DNA を基質として用いたゲルモビリティシフトアッセイによって移動度の変化を解析するとともに、センサーチップ上に固定した 2 本鎖オリゴ DNA をリガンドとして使用し、表面プラズモン共鳴分析装置 Biacore を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1)EcoT38I に His タグ付加することで迅速な精製が可能となった。

研究対象である組換え体制限酵素 EcoT38I を効率よく精製することを目的として、末端に His タグを付加した野生型酵素のコンストラクトを作成した。タグ付き酵素では、タグを付加していない酵素を 3 ステップのカラムで精製した場合とほぼ同等の純度がアフィニティーカラムのみの精製で得られ、迅速な精製方法を確立することができた。また、比活性と認識特異性はタグの有無で影響は受けないことを確認した。以降の実験はタグを付加したコンストラクトを使用して行った。

(2)EcoT38I の N 末端側ドメインと C 末端側ドメインはリンカーで連結されることにより活性のある酵素分子となる。

N 末端側ドメインは特異的な配列を認識して DNA に結合するが、C 末端側ドメイン単独ではヌクレアーゼ活性を示さない。

結晶構造から予想されるとおり、N 末端側ドメインは溶液中では単量体として存在して配列特異的な DNA 結合能を示すものの、DNA からの解離速度定数は完全長の酵素より大きいことを明らかにした。一方、C 末端側ドメインは予想どおり溶液中で二量体を形成していたが、FokI で報告されているような非特異的なヌクレアーゼ活性は検出されず、DNA 結合能も検出できなかった。

2 つのドメインが適切な長さをもつリンカーで連結されているとき EcoT38I は活性を示す。

2 つのドメインを連結するリンカー領域は、結晶中ではループ構造をとることを見出している。リンカーと推定される領域を 3 残基以上欠損した変異酵素は 2 本鎖 DNA 切断活性および DNA 結合能を消失したのに対し、21 残基を挿入した変異酵素は野生型と同じ認識切断特異性を示した。FokI ではリンカー領域の長さを変化させることで切断位置が変化することが報告されているが、EcoT38I では切断位置が変化しないことが明らかとなった。また、酵素が結合した DNA の折れ曲がり角度を測定した結果、活性が検出できた変異酵素は野生型酵素と同じ角度で DNA を折り曲げていることを見出した。

N 末端側ドメインと C 末端側ドメイン間には非常に弱い相互作用が存在することが示唆された。

N 末端側ドメインと C 末端側ドメインをそれぞれ 1:1 のモル比で混合して 2 本鎖 DNA に作用させた結果、リンカーで連結されている野生型酵素と同じ配列で 2 本鎖 DNA を切断したが、活性は約 1/100 に低下していた。DNA 結合能を解析した結果、ドメイン複合体ではなく N 末端ドメインだけが DNA に結合することを見出した。結晶構造では 2 つのドメイン間の相互作用に参与する可能性のある残基は見出されておらず、立体構造モデルを裏付ける実験結果が得られた。

(3) 部位特異的な変異酵素の諸性質を解析して EcoT38I の反応モデルを提案するとともに、特異性が変化した変異酵素の作成に成功した。

C 末端側ドメインのみでは DNA 切断活性を示さないが、活性中心は C 末端側ドメインに存在し典型的な PD-(D/E)XK モチーフを形成する。

ほとんどの制限酵素で極めて高く保存されている典型的な触媒残基と、BglII などの一部の酵素で推定されている特殊な触媒残基に相当するアミノ酸残基をターゲットとして Ala に置換した変異酵素を作成して、DNA 結合能は保持するが切断活性が消失する残

基を同定した。結果、EcoT38I の活性中心は C 末端側ドメインに存在して典型的な活性モチーフを形成することを明らかにした。

C 末端側ドメインには活性中心に加え、DNA との結合に参与するアミノ酸残基が存在する。

DNA 複合体の立体構造から C 末端側切断ドメインにも塩基と相互作用する可能性のある残基が推定されたので、Ala に置換して諸性質を調べた結果、DNA 切断活性がほぼ完全に消失することを見出した。当該酵素は DNA 結合能を消失していたことから、C 末端側ドメインも DNA の認識と結合に参与することが明らかになった。

N 末端側ドメインの複数のアミノ酸残基が特異的な塩基配列の認識と切断に重要な役割を果たす。

DNA 複合体の立体構造から N 末端側ドメインに存在して塩基の認識に参与すると推定されるアミノ酸残基を選択して Ala に置換した変異酵素の活性を調べた。DNA 切断活性をほぼ完全に消失した酵素は DNA 結合能を示さなかった。一方、認識配列が GAGCTC に変化した変異酵素は、予想に反してゲルモビリティシフト法では DNA 結合能が検出できなかった。認識特異性の変化に加え、DNA との相互作用様式が野生型とは異なることが示唆されたので、動的相互作用を解析して野生型と比較した。結果、当該変異酵素の標的配列に対する結合速度定数は約 3 倍程度増加している一方、解離速度定数は約 300 倍程度増加した結果親和性が低下していること、標的配列以外の野生型の認識配列 (GAGCCC と GGGCCC) に対してはほとんど動的相互作用を示さないことを明らかにした、われわれが明らかにした結晶構造情報からこのような特異性の変化を予想することは極めて難しく、EcoT38I の塩基配列認識メカニズムを理解するためには DNA 複合体の X 線結晶構造解析に加え、複合体の動力学シミュレーションを行う必要が強く示唆された。

C 末端側ドメイン間の相互作用に参与する可能性のあるアミノ酸残基を推定した。

C 末端側ドメイン間のインターフェースに位置するアミノ酸を 7 残基選択して Ala に置換した変異酵素の活性を調べた結果、野生型の 1/30 に活性が低下した変異体を得ることができた。しかし、四次構造を調べた結果野生型と同様に二量体を形成していたことから、さらなる変異酵素の解析が必要であることが示唆された。

これまでに得られた知見を統合して EcoT38I の反応モデルを提案する。まず、二量体を形成した酵素が DNA 上をスライドして標的サイトに結合する。このとき、N 末端

側ドメインが DNA との相互作用に重要な役割を果たす。酵素と標的サイトのコンホメーション変化が誘発されて C 末端側の活性中心が 2 本鎖 DNA のうちの 1 本鎖切断部位に移動して切断したのち、酵素は DNA から解離する。次に、無傷の標的サイトに結合した場合は 1 本鎖の切断と解離を繰り返すが、1 本鎖が既に切断された標的サイトに結合した場合は、残った 1 本鎖を切断することで、2 本鎖 DNA の切断が完結する。

本研究の成果をまとめると、ユニークなドメイン構造をもつ制限酵素 EcoT38I のさまざまな変異体を構築して DNA との相互作用を解析した結果、反応メカニズムを理解するための基礎的知見が得られた。得られた知見ならびに DNA 複合体の結晶構造情報をもとに、N 末端側ドメイン中の DNA タンパク質インターフェイスに位置する僅か 1 アミノ酸残基を Ala に置換することで、結晶構造からは予測ができなかった認識特異性に变化した変異酵素の構築に成功した。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 4 件)

Keiko KITA, Novel structure and reaction mechanism of EcoT38I restriction endonuclease, FASEB Science Research Conference “Genome Engineering –Research & Applications”, 2012.9.2-9.7, Lucca, Italy

Keiko KITA, Molecular engineering of a novel restriction endonuclease for creating new specificity, 13th Swiss Japanese conference on Biotechnology and Bioprocess Engineering, 2012.11.5, Walzenhauzen, Switzerland

Keiko KITA et al., Molecular engineering of a novel restriction endonuclease EcoT38I, Conference on transposition and genome engineering 2013, 2013.9.20, Budapest, Hungary

日置貴大, 中村啓悟, 喜多恵子, DNA 認識ドメインへの変異導入による制限酵素 EcoT38I の機能改変, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014.3.30, 明治大学生田キャンパス

6. 研究組織

(1) 研究代表者

喜多恵子 (KITA, Keiko)
京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 70234226

(2) 研究協力者

中村啓悟 (NAKAMURA, Keigo)
京都大学・農学部・4回生

日置貴大 (HIOKI, Takahiro)