

## 論文の内容の要旨

論文題目 DNAの位置選択的切断とその応用

氏名 北村 佳仁

### [1] 緒言

ゲノムを研究していく上で最も基本的で不可欠な技術は遺伝子の切断と結合であり、それらを駆使した遺伝子操作技術により我々が得る情報は極めて重要である。現在、そのような切断ツールとしては天然に存在する制限酵素が用いられているが、この酵素は高等生物のような巨大な DNA を扱う上で致命的とも言える欠点をもつ。制限酵素が認識する塩基配列は非常に短く、巨大な DNA を切断すると無数の切断断片が生じる。さらに認識配列の種類も限定されたものであり、現在の技術では遺伝子を任意の位置で選択的に切断することは不可能である。このような理由から、認識配列を自由に設計することのできる人工制限酵素の開発が熱望されている。

我々の研究室では DNA の加水分解反応を触媒する分子の開発を目指した研究がなされており、これまでに Ce(IV)/EDTA が DNA を効率よく加水分解できることを報告している。そこで本研究では、Ce(IV)/EDTA を利用した DNA の位置選択的切断法の構築を目指す。

### [2] Ce(IV)/EDTA による DNA の加水分解

DNA を位置選択的に切断するにあたり、次のような特徴に着目した。Ce(IV)/EDTA は DNA のリン酸ジエステルが 2 つ以下の場合には加水分解できず、リン酸ジエステルが 3 つ以上になって初め

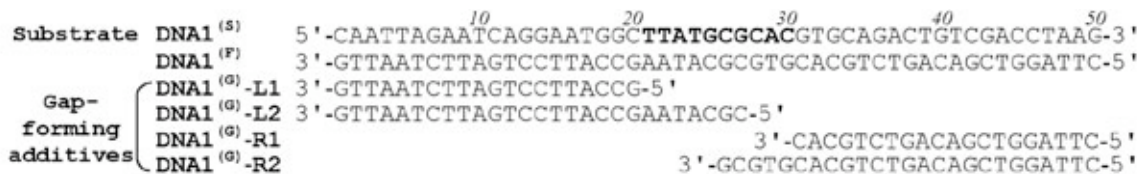


Fig. 1 Sequence of substrate DNA and additive DNAs. The nucleotides at the gap-site are indicated by bold capitals.

て加水分解が起こる。このことから、Ce(IV)/EDTA は DNA を加水分解する場合に複数のリン酸ジエステルとキレート構造を形成することが必須であると考えられる。そこで、さまざま基質 DNA を用意し、Ce(IV)/EDTA による切断を詳細に調べた。用いた DNA の配列を Fig. 1 に示す。基質 DNA の 5' 末端を  $^{32}\text{P}$  により標識し、切断実験を行った。

Fig. 2 にその結果を示す。この結果から、Ce(IV)/EDTA による DNA 加水分解には非常に興味深い特徴があることがわかった。一本鎖 DNA に Ce(IV)-EDTA を作用させるとランダムな切断が起こる(lane 2)。一方、二本鎖 DNA においては切断がほとんど起こらない(lane 3)。このように一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の切断活性には極めて大きな差が生じた。さらに部分的に二本鎖を形成させた DNA では、一本鎖の部分のみが選択的に加水分解された(lanes 4 and 5)。

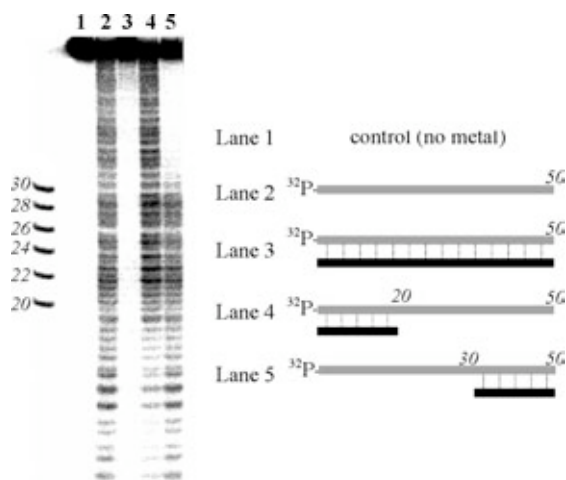
### [3] Ce(IV)/EDTA による DNA の位置選択的切断

核酸を位置選択的に切断する手法としては、以下に示すような 2 つのものが考えられる。(a)触媒分子を標的部位へ固定化するものと、(b)標的部位のみを選択的に活性化して加水分解を受けやすくするものである。(a)の手法はこれまでに広く用いられている手法であるが、錯体化することにより触媒分子自身の活性が損なわれてしまうという問題点がある。一方、(b)の手法にはそのような問題はなく、DNA を位置選択的に切断する手法として非常に有効である。

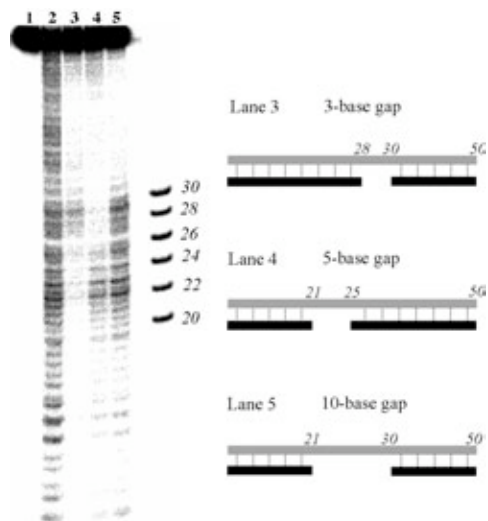
Ce(IV)/EDTA は一本鎖 DNA を非常に効率良く加水分解する一方、二本鎖 DNA に対する活性をほとんど示さない。そこで、基質 DNA にギャップ構造もしくはバルジ構造を形成させることで手法(b)により望みの位置を選択的に切断することを試みた。

その結果、Ce(IV)/EDTA により DNA を位置選択的に切断することに成功した(Fig. 3)。ギャップを形成させる位置を変化させても、Ce(IV)/EDTA はその位置を選択的に切断することができる(lanes 3-5)。このことは、相補鎖 DNA の塩基配列を変化させるだけで切断位置を自由に設定できることを示しており、切断ツールとしての応用を考慮した上でこの切断法が非常に有効であるといえる。

バルジ構造についても Ce(IV)/EDTA による切断



**Fig. 2** Hydrolysis of single-stranded DNA and double-stranded DNA by Ce(IV)/EDTA complex. Lane 1, no treatment (DNA1<sup>(S)</sup> only); lanes 2-5, with Ce(IV)/EDTA. Lane 2, DNA1<sup>(S)</sup> only; lane 3, with DNA1<sup>(P)</sup>; lane 4, with DNA1<sup>(G)</sup>-L1; lane 5, with DNA1<sup>(G)</sup>-R1. Reaction conditions: [substrate DNA] = 1.0  $\mu\text{M}$ , [oligonucleotide additives] = 1.1  $\mu\text{M}$ , [Ce(IV)/EDTA] = 500  $\mu\text{M}$ , [NaCl] = 100 mM, [spermine] = 100  $\mu\text{M}$  at pH 7.0 (2.5 mM HEPES) and 37°C for 4 days.

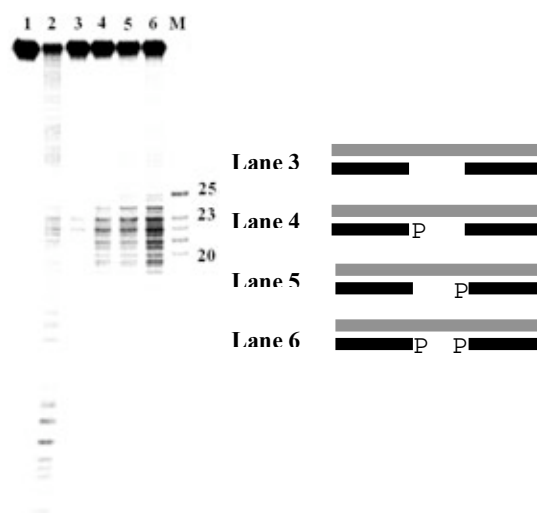


**Fig. 3** Hydrolysis of gap-site in substrate DNA at predetermined position by the combination of Ce(IV)/EDTA complex and various additives. Lane 1, no treatment; lanes 2-5, with Ce(IV)/EDTA; lane 2, DNA1<sup>(S)</sup> only; lane 3, 3-base gap (with DNA<sup>(G)</sup>-L2 and DNA<sup>(G)</sup>-R1); lane 4, 5-base gap (with DNA<sup>(G)</sup>-L1 and DNA<sup>(G)</sup>-R2); lane 5, 10-base gap (with DNA<sup>(G)</sup>-L1 and DNA<sup>(G)</sup>-R1). Reaction conditions: [substrate DNA] = 1.0  $\mu\text{M}$ , [oligonucleotide additives] = 1.1  $\mu\text{M}$ , [Ce(IV)/EDTA] = 500  $\mu\text{M}$ , [NaCl] = 100 mM, [spermine] = 100  $\mu\text{M}$  at pH 7.0 (2.5 mM HEPES) and 37°C for 4 days.

を行い、基質 DNA の中央部位に形成させたバルジはギャップと同様に Ce(IV)/EDTA により選択的に切断することができる(lanes 4-7)。

#### [4] ギャップ部位へのリン酸基導入による切断の活性化

ここまではギャップ構造及びバルジ構造を利用して DNA を位置選択的に切断できることを示した。しかし、この切断系は Ce(IV)/EDTA 錯体の一本鎖 DNA と二本鎖 DNA に対する切断活性の差のみを利用したものであり、十分な活性を示さない。そこで、相補鎖 DNA の末端にリン酸基を結合し、ギャップ部位に配置することで切断活性を向上させることを試みた(Fig. 4)。その結果、リン酸基を利用して切断活性を飛躍的に上昇させることに成功した。リン酸基をもたない相補鎖によりギャップを形成させた場合(lane 3)に比べ、リン酸を 1 つ(lanes 4 and 5)、もしくは 2 つ配置させると切断活性が大きく上昇する(lane 6)。



**Fig. 4** Polyacrylamide gel electrophoresis patterns for the hydrolysis of DNA1<sup>(85)</sup> (<sup>32</sup>P-labeled at the 5'-end) at a 5-base gap by Ce(IV)/EDTA. Lane 1, control; lane 2, DNA1<sup>(85)</sup> only; lanes 2-5, DNA1<sup>(G)</sup>-L1+DNA1<sup>(G)</sup>-R1; lane 3, DNA1<sup>(G)</sup>-L1 has a 5'-phosphate terminus; lane 4, DNA1<sup>(G)</sup>-R1 has a 3'-phosphate terminus; lane 5, DNA1<sup>(G)</sup>-L1 has a 5'-phosphate terminus and DNA1<sup>(G)</sup>-R1 has a 3'-phosphate terminus. Reaction conditions: [substrate DNA] = 1.0 μM, [oligonucleotide additives] = 1.5 μM, [Ce(IV)/EDTA] = 500 μM, [NaCl] = 100 mM at pH 7.0 (10 mM HEPES) and 37°C for 15.5 h.

#### [5] Ce(IV)/EDTA の構造と基質選択性

上述のように、Ce(IV)/EDTA はギャップ部位やバルジ部位を選択的に加水分解することができるが、Ce(IV)ゲルではこのような選択性は全く見えない。このような基質選択性が生まれるのは、錯体の構造に原因があると考えられる。そこで、Ce(IV)/EDTA の形状とその切断への影響について調べた。DLS 粒径測定の結果、Ce(IV)/EDTA は約 7 nm の粒径をもつことがわかった。そこでさらに、この粒径が DNA の切断にどのような影響を与えるかを調べるためにフィルターを用いて粒径が 7 nm のものを取り除いた。フィルターによるろ過後の Ce(IV)/EDTA の濃度は ICP-MS を用いて定量を行った。

フィルターでろ過する前後の Ce(IV)/EDTA の一本鎖 DNA に対する  $K_m$ ,  $k_{cat}$  の値を Michaelis-Menten 型反応の速度式に従って算出した (Table 1)。 $k_{cat}$  の値は、フィルターによるろ過を行ってもほとんど変化しなかった。しかし、 $K_m$  の値はろ過後の方が顕著に大きくなった。つまり、より大きな粒径である Ce(IV)/EDTA 錯体の方が DNA との相互作用が強い。このように、Ce(IV)/EDTA による DNA 加水分解において、粒径は切断反応が起きる段階には影響せず、DNA が相互作用する段階に影響することがわかる。

また、Ce(IV)イオンに対する EDTA の濃度変化が粒径および切断の基質選択性に与える影響につ

**Table 1**  $k_{cat}$  and  $K_m$  values for the hydrolysis of single-stranded DNA by Ce(IV)/EDTA complexes before and after filtration<sup>(a)</sup>.

Ce(IV)/EDTA complex	$k_{cat} / \text{h}^{-1}$	$K_m / \mu\text{M}$
Before the filtration	$7.8 \times 10^{-2}$	14
Filtrate	$7.4 \times 10^{-2}$	46

(a)The filter passes only the particles smaller than 0.015 μm.

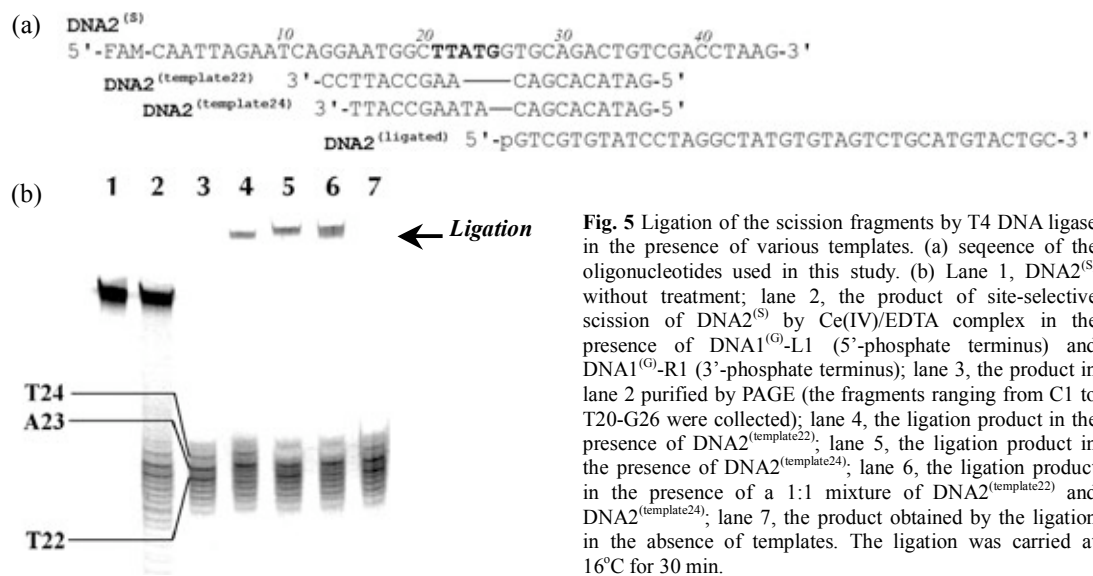
**Table 2**  $k_{cat}$  and  $K_m$  values for the hydrolysis of various substrates by Ce(IV)/EDTA complex.

	$K_m / \mu\text{M}$	$k_{cat} / \text{h}^{-1}$
ss DNA	$1.4 \times 10$	$1.7 \times 10^3$
ds DNA	$> 5.0 \times 10^5$	—
10-base gap	$9.0 \times 10$	$2.0 \times 10^4$
10-base bulge	$5.7 \times 10^2$	$1.5 \times 10^4$

いても調べた。Ce(IV)/EDTA の粒径は調製直後には加える EDTA の濃度によらずほぼ同じであるが、EDTA の濃度が減少すればするほど時間が経過するにつれ大きくなる。また、切断結果から粒径が大きくなるにつれて基質選択性がなくなることがわかった。このような結果から、Ce(IV)/EDTA の粒径は基質選択性に大きな影響を与えることがわかる。

さらに様々な基質 DNA について切断反応の速度論的解析を行った結果を Table 2 に示す。 $K_m$  の値は一本鎖 DNA に比べて二本鎖 DNA の方が大きく、10 塩基ギャップに比べて 10 塩基バルジの方が大きい。これは DNA のフレキシビリティが Ce(IV)/EDTA との相互作用に影響しており、そのことが基質選択性の原因であることを示唆している。

#### [ 6 ] Ce(IV)/EDTA による DNA の位置特異的切断を利用した遺伝子組換え



**Fig. 5** Ligation of the scission fragments by T4 DNA ligase in the presence of various templates. (a) sequence of the oligonucleotides used in this study. (b) Lane 1, DNA2<sup>(S)</sup> without treatment; lane 2, the product of site-selective scission of DNA2<sup>(S)</sup> by Ce(IV)/EDTA complex in the presence of DNA1<sup>(G)</sup>-L1 (5'-phosphate terminus) and DNA1<sup>(G)</sup>-R1 (3'-phosphate terminus); lane 3, the product in lane 2 purified by PAGE (the fragments ranging from C1 to T20-G26 were collected); lane 4, the ligation product in the presence of DNA2<sup>(template22)</sup>; lane 5, the ligation product in the presence of DNA2<sup>(template24)</sup>; lane 6, the ligation product in the presence of a 1:1 mixture of DNA2<sup>(template22)</sup> and DNA2<sup>(template24)</sup>; lane 7, the product obtained by the ligation in the absence of templates. The ligation was carried at 16°C for 30 min.

ここまでは Ce(IV)/EDTA により DNA を位置選択的に切断できることについて示してきたが、切断後にその断片を望みの外来 DNA を結合することができなければツールとしての応用は期待できない。そこで Ce(IV)/EDTA 錯体により切断した断片と、別の DNA 断片とのリガーゼを用いた結合について調べた(Fig. 5)。

Ce(IV)/EDTA により切断した断片と、5'末端がリン酸化された外来 DNA とを鋳型 DNA を利用して結合反応を行った(lanes 4-7)。鋳型 DNA は切断断片の 3'末端側、外来 DNA の 5'末端側にそれぞれ相補的な配列をもつ。その結果、鋳型 DNA を利用することにより設計通りに DNA を組み換えることができた。この反応では鋳型 DNA の配列を変えることにより、設計通りに DNA を組み換えることができる。

また、GFP 遺伝子を含む基質 DNA を Ce(IV)/EDTA を用いて切断して BFP 遺伝子へ組み換えることも試みた。その結果、長鎖 DNA を対象とした場合にも本系の切断系が組み換え操作に有効であることがわかった。

以上のように、本研究では DNA の切断触媒である Ce(IV)/EDTA を利用して DNA を位置選択的に加水分解することに成功し、さらにそれを利用して望みの組み換え DNA を得ることに成功した。本研究における成果は、人工制限酵素構築において大きな意味を持つものであり今後の研究に多大な影響を与えるものである。