

論文の内容の要旨

論文題目 人工制限酵素の作用機構に関する研究

氏名 宮島 佳孝

[緒言] 現状のバイオテクノロジーの中心をなす天然の制限酵素は、認識配列の長さが 4-6 塩基程度と短いために、巨大なゲノムDNAを望みの位置のみで切断することはできない。そこで、ゲノムDNAを切断対象とする場合には、認識配列の長い人工ツールが不可欠となる。この問題点を解決するために、当研究室では、人工制限酵素 ARCUT(artificial restriction DNA cutter)を開発した。ARCUTで

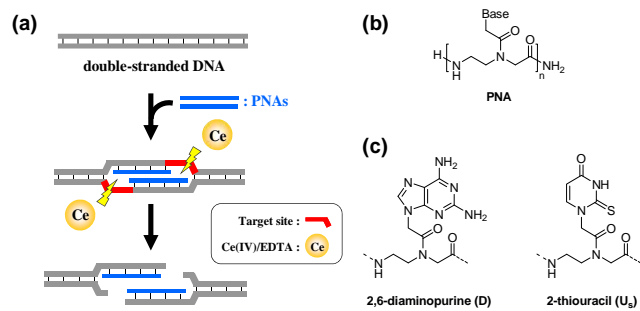


Figure 1. (a) Scheme of site-selective DNA scission by ARCUT. Single-stranded portions, formed by the invasion of two PNA strands to DNA substrate, are hydrolyzed by Ce(IV)/EDTA. (b) Generic structure of PNA. In pseudo-complementary PNA (pcPNA), 2,6-diaminopurine (D) and 2-thiouracil (U_s) in (c) are used together with G and C.

は、ペプチド核酸PNA(peptide nucleic acid)のインベージョンにより認識された特定配列を、Ce(IV)/EDTA錯体により切断する(Figure 1a)。ここでPNAは合成核酸であるために、その塩基配列および長さを自在に設計できる。したがって、目的に応じてPNAを設計すれば、理論上は、どのような大きさのDNAであっても、位置選択的に切断できる。

過去の研究では、460万塩基対からなる大腸菌のゲノムDNAをARCUTにより、位置選択的に切断することに成功しており、ARCUTの有用性が示された。しかし、その切断におけるFidelityは検討されていない。すなわち、巨大DNA中に、必然的に存在する類似配列をARCUTが識別できるかは、全くのブラックボックスである。そこで本研究では、ARCUTによる切断反応のFidelityを詳細に検討する。また、そのFidelityが生じる作用機構を、PNAのインベージョン複合体の安定性を検討することで、明らかにする。これらの検討により、ARCUTが厳密に認識できる塩基配列の長さを明らかにし、ARCUTで切断可能なDNAの大きさを検討する。

[結果と考察]

1. 切断反応における Fidelity

ARCUT の Fidelity を検討するために、切断部位の一塩基対を別の塩基対に置き換えた DNA を調製し、実験を行った。

(1) 二本の pcPNA がインバージョンする領域の一塩基対を別の塩基対に置換した場合

まず、切断配列の 1829 部位の C/G 塩基対を別の塩基対に置き換え、 $[\text{Ce(IV)/EDTA}] = 50 \mu\text{M}$ 、 $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$ 存在下、 $\text{pH} = 7$ 、 50°C 、14 h の条件下で、切断した結果を Figure 2a に示す。二本の pcPNA と基質 DNA とが完全に相補的な lane 2 では、過去の報告通り、位置選択的な切断が起こり、二本の切断バンドが確認された。これに対し C/G 塩基対を別の塩基対に置き換えた lanes 3-5 では、ARCUT による切断は全く起こらなかった。これらの結果は、1829 部位に導入された一塩基対の違いを、ARCUT は厳密に識別できることを明確に示す。

同様な切断実験を、別の部位 (1826-1828) についても行った (Figure 2b)。切断結果が明確に示すように、どの一塩基対を別の塩基対に置換した場合でも、ARCUT による切断は全く起こらなかった。以上の結果は、1826-1829 部位に存在する一塩基対の違いを ARCUT は完全に識別することを示す。

(2) Gap 形成領域の一塩基対を別の塩基対に置換した場合

1821、1823、1825 部位の一塩基対を別の塩基対に置換し、同様に切断実

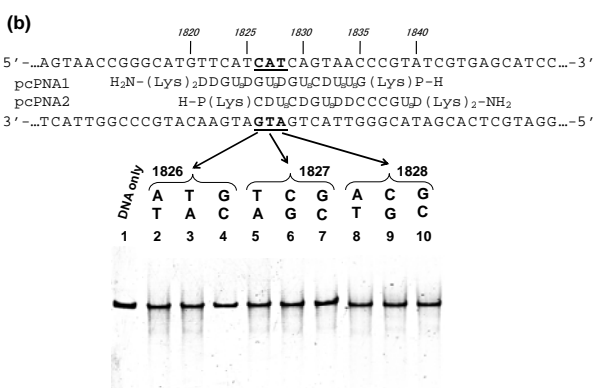
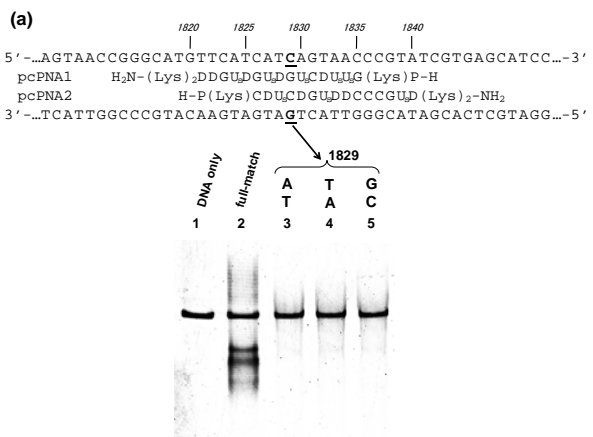


Figure 2. Mismatch-recognition in the central double-invasion region for the site-selective scission by ARCUT. (a) Lane 1, without Ce(IV)/EDTA (DNA only); lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-5, the C/G pair at 1829 site was changed to another base-pair as indicated. (b) Lane 1, without Ce(IV)/EDTA (DNA only); lanes 2-10, one of three base-pairs (underlined base-pairs) was changed to another base-pair. Reaction conditions: $[\text{DNA}] = 20 \text{ nM}$, [each of pcPNAs] = 100 nM , $[\text{Ce(IV)/EDTA}] = 50 \mu\text{M}$, $[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$, and $[\text{HEPES}] = 5 \text{ mM}$ at $\text{pH} 7.0$ and 50°C for 14 h. In pcPNA1 and pcPNA2, L-phosphoserine (P) was attached to the N-termini to promote the DNA scission.

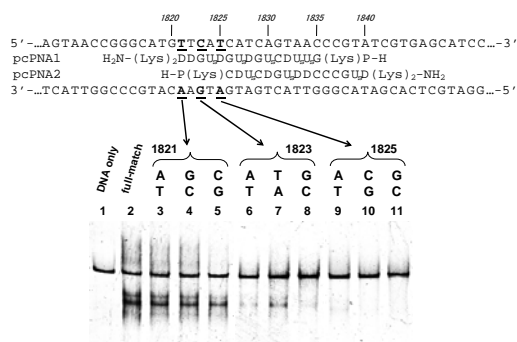


Figure 3. Mismatch-recognition in the flanking single-invasion region for the site-selective scission by ARCUT. Lane 1, without Ce(IV)/EDTA (DNA only); lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-11, one base-pair in the flanking single-invasion region (underlined) was changed to another base-pair as indicated. The reaction conditions are the same as described for Figure 2.

験を行った(Figure 3)。まず、1825 部位の T/A 塩基対を別の塩基対に置換した lane 9-lane 11 では、ARCUT による切断は起らなかった。したがって、1825 部位に存在する一塩基対の変異を ARCUT は識別できる。また、1823 部位の C/G 塩基対を A/T 塩基対、G/C 塩基対に置換した lane 6 及び lane 8 では、わずかに切断が起ってしまうものの、その効率はフルマッチの切断効率(lane 2)に比べ、微々たるものである。したがって、ARCUT は、これらの一塩基対の変異をほぼ完全に識別できるといえる。その一方で、1823 部位の C/G 塩基対を T/A 塩基対に置き換えた lane 7 では、切断が起こってしまう。さらに切断配列の末端にあたる 1821 部位の T/A 塩基対を別の塩基対に置換した lane 3-lane 5 では、切断反応の Fidelity は著しく低下し、ミスマッチの種類とは無関係に切断が起こってしまう結果となった。

これまでの結果を以下にまとめる(Figure 4)。

- ① 二本の pcPNA がインベージョンする領域に存在する一塩基対の変異を ARCUT は完全に識別できる。
- ② Gap 形成領域に関しても、二本の pcPNA がインベージョンする領域から 2 及び 3 塩基外側の塩基対において高い Fidelity を示す。
- ③ Gap 形成領域の末端に存在する一塩基対の変異を、ARCUT は識別できないため、切断の Fidelity は低い。

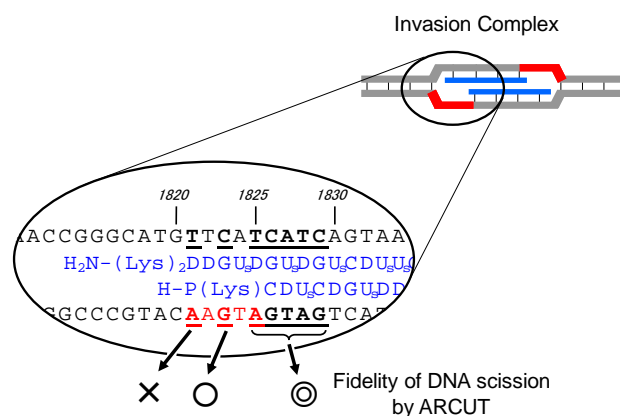


Figure 4. Summary of the study on the fidelity of ARCUT in its site-selective scission of DNA.

ARCUT において、インベージョン複合体が疑似的な C2 対称であることを考えると、15 塩基の pcPNA を用いる現状の ARCUT は、14-16 塩基配列を厳密に認識できるといえる。これは ARCUT による切断配列が 4¹⁴-4¹⁶ 塩基に一回の確率で現れることを意味しており、多くのゲノム DNA を望みの位置のみで切断できることを示唆する。

2. 切断実験条件下([NaCl] = 100 mM)におけるインベージョン複合体形成について

NaCl が 100 mM 存在する切断実験条件下での、インベージョン複合体形成を、ゲルシフトアッセイにより評価した(Figure 5)。

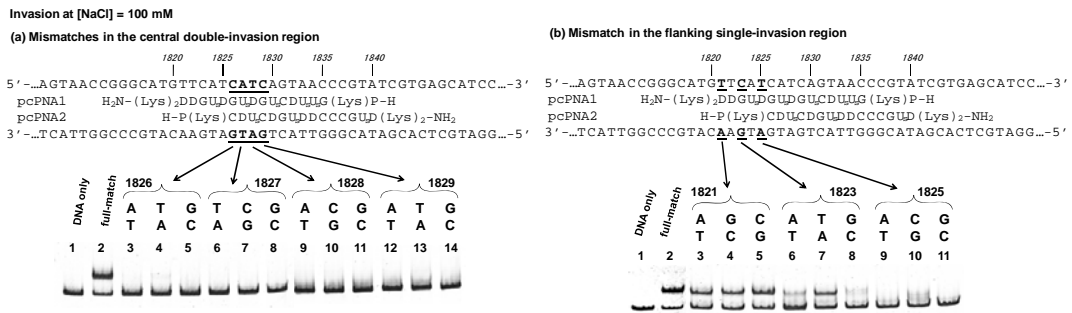


Figure 5. Gel-shift assay for the formation of invasion complex under the conditions for the ARCUT scission ([NaCl] = 100 mM). (a) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-14, one base-pair in the central double-invasion region (underlined) was changed to another base-pair. (b) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-11, one base-pair in the flanking single-invasion region (underlined) was changed. The concentrations of the agents are described in Figure 2.

(1) 二本の pcPNA がインベージョンする領域の一塩基対を別の塩基対に置換した場合 (Figure 5a)

まず、加えた pcPNA とターゲットとなる切断部位とが完全に相補的な場合は、ゲルシフトが起こり、インベージョン複合体の形成が確認された (lane 2)。しかし、1826-1829 部位の一塩基対を別の塩基対に置き換えた lane 3-lane 14 では、導入されるミスマッチの種類とは無関係に、ゲルシフトは全く起こらずにインベージョン複合体の形成を確認することはできない。この結果は、切断実験条件下 ([NaCl] = 100 mM) では、1826-1829 部位に存在する一塩基対の変異をインベージョンにより識別できることを示す。そのため、本来の切断配列のみがインベージョンで認識される。

(2) Gap 形成領域の一塩基対を別の塩基対に置換した場合 (Figure 5b)

1825 部位の T/A 塩基対を別の塩基対に置き換えた lane 9-lane 11 及び、1823 部位の C/G 塩基対を A/T 塩基対 (lane 6)、G/C 塩基対 (lane 8) に置き換えた場合では、インベージョン複合体形成は、ほぼ抑制された。したがって、これらの場合に関しては、インベージョンにより一塩基のミスマッチが識別される。しかし、1823 部位の C/G 塩基対を T/A 塩基対に置き換えた lane 7 では、ゲルシフトが起こり、インベージョン複合体の形成を確認できる。また、gap 形成領域の末端にあたる 1821 部位の T/A 塩基対を置換すると (lane 3-lane 5)、ミスマッチは全く識別されず、ミスマッチの種類によらずインベージョン複合体が形成する結果となった。この結果は、切断実験条件下 ([NaCl] = 100 mM) では、末端のミスマッチをインベージョンで識別できないことを意味する。

以上の結果から、インベージョン複合体が形成した場合のみ、Ce(IV)/EDTA 錯体による切断が起こることが分かった。

3. PNA/DNA 二本鎖の熱力学的な安定性からの解析

Figure 5 におけるインベージョン複合体形成の結果を、インベージョン複合体形成時に生じる pcPNA/DNA 二本鎖の熱力学的な安定性 (T_m) の観点から考察する。そこで、Table 1 に切断実験条件下 ($[NaCl] = 100 \text{ mM}$) における pcPNA/DNA 二本鎖の T_m を示す。

(1) 二本の pcPNA がインベージョンする領域の一塩基対を別の塩基対に置換した場合(1826、1829 部位)

まず pcPNA が完全に相補的な場合の T_m はそれぞれ $78.2 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $83.9 \text{ }^\circ\text{C}$ であった。それに対し、1829 部位における C/G 塩基対を別の塩基

対に置き換えた場合では、ミスマッチの種類に応じて $5.9 \text{ }^\circ\text{C} \sim 13.4 \text{ }^\circ\text{C}$ の T_m の低下が観測された。この結果は、1829 部位の C/G 塩基対を別の塩基対に置き換えた場合では、インベージョン複合体形成時に生じる二組の pcPNA/DNA 二本鎖が同時に不安定化することを示す。そのために、切断実験条件下において、1829 部位にミスマッチを含むインベージョン複合体は形成しなかったといえる。

次に 1826 部位の C/G 塩基対を別の塩基対に置き換えた場合について述べる。まず pcPNA2/DNA 二本鎖に関しては、末端にミスマッチが存在するにも関わらず顕著な T_m の低下は見られなかった ($\Delta T_m = 0.4 \text{ }^\circ\text{C} \sim 1.3 \text{ }^\circ\text{C}$)。その一方で、pcPNA1/DNA 二本鎖に関しては、ミスマッチの種類に応じて $7.6 \text{ }^\circ\text{C} \sim 12.6 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 T_m が低下した。ここで、Figure 5a 中 lane 3-lane 5 で 1826 部位にミスマッチを含むインベージョン複合体が形成されなかったことを考慮すると、pcPNA1/DNA 二本鎖における不安定化により複合体形成が抑制されたといえる。以上の結果から、二本の pcPNA が共にインベージョンする領域にミスマッチが存在する場合には、ミスマッチによりインベージョン複合体が不安定となり、複合体形成が抑制されることが分かった。

(2) Gap 形成領域の一塩基対を別の塩基対に置換した場合(1821、1823 部位)

1821 及び 1823 部位の塩基対を置換した場合は、pcPNA1/DNA 二本鎖にはミスマッチが

Table 1. Melting temperatures of the DNA/PNA duplexes in the invasion site

(a) upper DNA/pcPNA1 duplex				
Base-pair change pattern	Sequence of DNA (5'-3')	T_m ($^\circ\text{C}$)	ΔT_m ($^\circ\text{C}$)	
Fully-matched DNA	5'-TTCATCATCAGTAAC-3'	78.2	-	
C/G1829	A/T 5'-TTCATCAT A AGTAAC-3'	66.3	11.9	
	T/A 5'-TTCATCAT T AGTAAC-3'	71.2	7.0	
	G/C 5'-TTCATCAT G AGTAAC-3'	64.8	13.4	
C/G1826	A/T 5'-TTCAT A ATCAGTAAC-3'	66.2	12.0	
	T/A 5'-TTCAT T ATCAGTAAC-3'	70.6	7.6	
	G/C 5'-TTCAT G ATCAGTAAC-3'	65.6	12.6	
C/G1823	A/T 5'-TT A ATCAGTAAC-3'	69.6	8.6	
	T/A 5'-TT T ATCAGTAAC-3'	71.6	6.6	
	G/C 5'-TT G ATCAGTAAC-3'	70.0	8.2	
T/A1821	A/T 5'- A TCATCATCAGTAAC-3'	77.7	0.5	
	G/C 5'- G TCATCATCAGTAAC-3'	78.0	0.2	
	C/G 5'- C TCATCATCAGTAAC-3'	77.9	0.3	
(b) lower DNA/pcPNA2 duplex				
Base-pair change pattern	Sequence of DNA (5'-3')	T_m ($^\circ\text{C}$)	ΔT_m ($^\circ\text{C}$)	
Fully-matched DNA	5'-TACGGGTTACTGATG-3'	83.9	-	
C/G1829	A/T 5'-TACGGGTTACT T ATG-3'	77.9	6.0	
	T/A 5'-TACGGGTTACT A ATG-3'	77.7	6.2	
	G/C 5'-TACGGGTTACT C ATG-3'	78.0	5.9	
C/G1826	A/T 5'-TACGGGTTACTGAT T -3'	83.5	0.4	
	T/A 5'-TACGGGTTACTGAT A -3'	83.1	0.8	
	G/C 5'-TACGGGTTACTGAT C -3'	82.6	1.3	

導入されるが、pcPNA2/DNA 二本鎖は、いずれの場合であっても完全に相補的となり、安定な二本鎖を形成する。そのために pcPNA1/DNA 二本鎖の熱力学的な安定性が、インベージョン複合体形成を考える上で非常に重要となる。まず、1823 部位の C/G 塩基対を、A/T 塩基対、G/C 塩基対に置換した場合には、それぞれ T_m は 8.6 °C、8.2 °C 低下し、インベージョン複合体形成が抑制される結果となった (Figure 5b 中 lane 6、lane 8 参照)。しかし C/G 塩基対を T/A 塩基対に置き換えた場合、すなわち pcPNA1/DNA 二本鎖中に G-T の wobble 塩基対が導入された場合には、 ΔT_m が 6.6 °C と小さく、他の場合と比較すると安定である。このために、Figure 5b 中の lane 7 において、インベージョン複合体が形成してしまったと考えられる。さらに 1821 部位の T/A 塩基対を別の塩基対に置換した場合には、ミスマッチの種類によらず T_m はほとんど低下しない ($\Delta T_m = 0.2$ °C~0.5 °C)。そのため、末端にミスマッチが存在する場合は、インベージョン複合体が形成してしまう (Figure 5b 中 lane 3-lane 5)。

以上の結果から、切断配列の末端に存在するミスマッチをインベージョンで識別できないことが分かった。また、末端付近に安定なミスマッチである G-T の wobble 塩基対を形成する配列もインベージョンで完全に識別することが難しい。

[結論]

15-mer の pcPNA を用いる ARCUT の Fidelity を検討した結果、14-16 塩基配列を厳密に認識できることが明らかとなった。この認識能は、多くのゲノム DNA を一箇所ですべて切断できることを示唆する。また、ARCUT の切断反応における Fidelity はインベージョンの Fidelity に支配されていることが明らかとなった。すなわち、ミスマッチの有無に関わらず、インベージョン複合体が形成する場合には、切断が起こる。現状の pcPNA を用いたインベージョンでは、末端のミスマッチを識別することができないため、ARCUT の切断の Fidelity は、末端部分で低下する。しかし、末端にミスマッチが存在する配列を避けるように pcPNA の配列を設計することで、末端での Fidelity の低下を十分に防ぐことができる。以上のことから、巨大 DNA 切断のツールとして ARCUT は非常に有用な人工ツールといえる。