

論文の内容の要旨

論文題目 人工制限酵素ARCUTの化学修飾による高機能化

氏名 愛場 雄一郎

【緒言】

ヒトゲノム解読の終了に代表されるように、「ポストゲノム時代」に突入している昨今、研究対象となるDNAのサイズは飛躍的に増大してきている。一方、分子生物学の中核を担うDNA切断技術は依然として天然の制限酵素に頼っている。しかしながら、その認識配列は4-8塩基かつ、ほとんどが回文配列に限られ、選択性や自由度が巨大DNAを扱うには不十分である。

これらの現状を踏まえ、高等生物などの巨大DNAの遺伝子操作を実現するには、天然の制限酵素を超える高い位置選択性を持ち、認識配列を自由に設計できる人工制限酵素が必須となる。このような観点から、当研究室では人工制限酵素ARCUT (Artificial Restriction DNA CUTter) の開発を行ってきた (Fig. 1)。ARCUTは、DNAに配列特異的に“インベージョン”するペプチド核酸

(PNA ; Fig. 2) を利用し、2本鎖DNA中の望みの位置に1本鎖部位 (ギャップ構造) を作り出し、Ce(IV)/EDTA錯体を作用させることで選択的な切断を達成している。ここで用いるPNAは人工核酸であり、その長さや配列を望みに応じて設計することで、ARCUTは高い位置特異性を有すると同時に、その認識配列を自由に変更可能となっている。

これまでARCUTは、ヒトゲノムDNAの目的部位での切断やキメラタンパクの調製に成功するなど、次世代の遺伝子操作のツールとしての高い可能性が示されている。本論文で

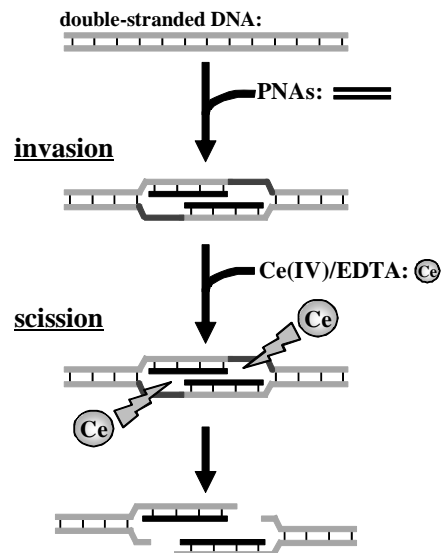


Figure 1. Schematic depiction of site-selective DNA scission by ARCUT. Single-stranded portions, formed by the invasion of two PNA strands to target double-stranded DNA, are selectively hydrolyzed by Ce(IV)/EDTA.

はさらに高度な遺伝子操作に向けて、ARCUT をより汎用的なツールとして完成させるべく、化学修飾を用いた高機能化を目指した。

ARCUT は大別すると、配列認識を行う PNA と、加水分解を行う Ce(IV)/EDTA の 2 つの要素から構成されている。そこで、本研究ではこの 2 点について着目し、以下の事項についてそれぞれ検討を行った。

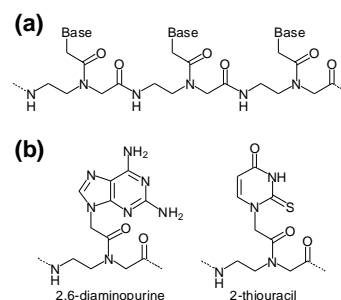


Figure 2. (a) Chemical structure of PNA. (b) Instead of A and T, two modified bases, 2,6-diaminopurine (D) and 2-thiouracil (U) are used in combination with G and C to improve invasion efficiency.

I. 配列認識部位 (PNA) への化学修飾による高機能化 :

- ・ PNA 骨格へのリンカー導入によるミスマッチ識別能の向上
- ・ ジスルフィドリンカー導入 PNA による DNA 認識とその制御

II. 標的部位への配位子導入による DNA 加水分解の高効率化 :

- ・ 標的部位への EDTP 配位子導入による DNA 切断の高効率化
- ・ Ce(III)を用いた EDTP 配位子上への Ce 固定化に向けた検討

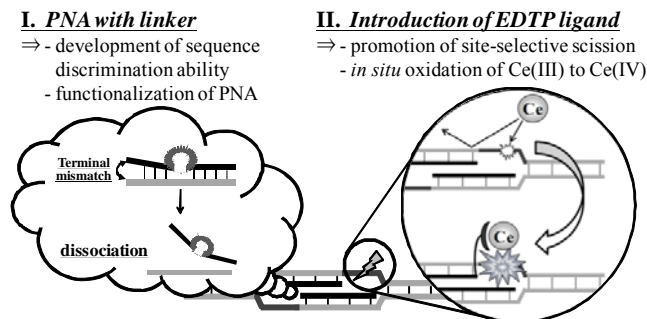


Figure 3. Strategies developed in this study for the functionalization of ARCUT and the promotion of site-selective scission by ARCUT.

【結果・考察】

I. 配列認識部位 (PNA) への化学修飾による高機能化

PNA は DNA に比べ、ミスマッチ認識能が高い。これは、PNA の主鎖がポリアミド骨格であり、DNA のリン酸ジエステル結合に比べ剛直なことに由来すると言われている。これにより、主鎖のコンフォメーション変化 (歪み) が、剛直性によりミスマッチ塩基周囲の塩基対の解離を誘起し、最終的に 2 本鎖の解離を促進すると考えられる。

このようにミスマッチ認識能が高いと言われる PNA であるが、一方で末端部分でのミスマッチ識別能が低いことや、PNA の長さが長くなるにつれミスマッチ識別能が低下すると

いったことが、近年の研究で明らかとなってきた。そこで本研究では、PNA 主鎖中にリンカーを導入して PNA を細分化し、正確な相補鎖認識を維持しつつ、ミスマッチ存在時の不安定化を促進することで、DNA 認識能を向上させた系の構築を目指した。

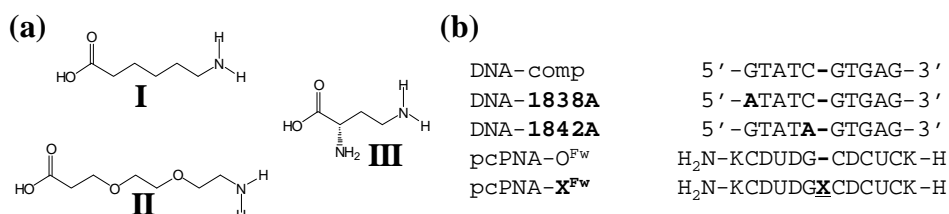


Figure 4. (a) Chemical structures of linker monomers used in this study. (b) Sequences of PNA and corresponding complementary DNA (X = linker I - III, K: lysine, D: 2,6-diaminopurine, U: 2-thiouracil).

I-a) リンカー及びリンカー導入PNAの設計

PNA への導入のしやすさから、**Fig. 4** に示す 3 種のリンカーを選択した。これまで骨格修飾による PNA 誘導体の報告はあるものの、骨格長はそのままキラリティを制御したものばかりであった。このようなリンカーを導入した修飾法は皆無に近く、まず合成したリンカー導入 PNA の DNA 認識から確認を行った。T_m 測定の結果、安定性の低下は見られるものの、いずれの修飾

PNA も相補鎖 DNA をきちんと認識することがわかった (**Table 1**)。さらにインベージョン能を有していることも、ゲルシフトアッセイから確認した。

Table 1. T_m of the duplexes of PNA with the corresponding complementary single-stranded DNA including mismatch.

| | pcPNA-O | ΔT_m | pcPNA-I | ΔT_m | pcPNA-II | ΔT_m | pcPNA-III | ΔT_m |
|-----------|---------|--------------|---------|--------------|----------|--------------|-----------|--------------|
| DNA-comp | 65.5 | - | 44.5 | - | 46.9 | - | 54.3 | - |
| DNA-1838A | 60.4 | -5.1 | 35.4 | -9.1 | 36.4 | -10.5 | 47.8 | -6.5 |
| DNA-1842A | 45.6 | -19.9 | 23.3 | -21.2 | 22.6 | -24.3 | 33.5 | -20.8 |

^{a)} ΔT_m is the difference between a full-match pair and a mismatched one.

I-b) リンカー導入PNAによるミスマッチ認識および熱力学的な安定性からの考察

次に、リンカー導入 PNA のミスマッチ認識能について検討した。インベージョン実験の結果をみると (**Fig. 5**)、

リンカーを導入していない通常の PNA を用いた lane O では、末端にミスマッチが存在しても、高い効率でインベージョンが起きている。一方、リンカー導入 PNA では (lanes I-III)、

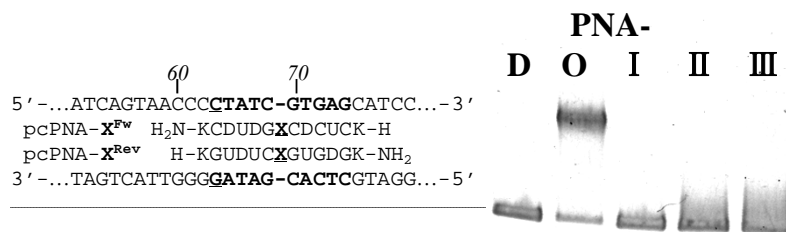


Figure 5. (a) Sequences of 130-mer DNA and PNA including mismatched base pair (X = linker I - III in **Fig. 4**). (b) Gel-shift assay for the invasion of PNA with (or without) additional linker to double-stranded DNA. Invasion conditions: [DNA] = 50 nM, [each of PNA] = 300 nM and [HEPES (pH 7.0)] = 5 mM at 50°C for 1h.

インベージョン複合体のバンドが確認できない。このように、リンカーを導入することで、目的通りミスマッチ識別能の向上に成功した。この結果についてさらに詳細に検討するために、ミスマッチ配列との T_m を測定し、熱力学的な安定性からも考察を行った。5'末端の G を A に置き換えた DNA^(1838A) の場合をみると、リンカー導入によりミスマッチ認識能が向上していることが確認できる。また、リンカーの隣の塩基である C を A に置き換えた DNA^(1842A) の場合でも、 T_m は同様に大きく低下しており、リンカーに隣接する位置でも塩基対はきちんと形成されていることが確認出来る。一方、Linker III に関してはミスマッチ認識能の向上はあまり顕著ではなく、リンカー中の正電荷による非特異的な静電相互作用により、ミスマッチ識別能が低下したものと考えられる。

I-c) ジスルフィドリンカー導入PNAによるDNA認識とその制御

さらに、本系をさらに発展させ、前述のリンカーに代わり機能性リンカーを用いることで、PNA に新たな機能を付与することが期待される。そこで、ジスルフィド (SS 結合) リンカーを PNA 中央に導入し、SS 結合の還元的開裂を利用して、PNA の DNA からの自発的な解離を制御可能な系の構築について検討を行った。この修飾 PNA/DNA 2 本鎖に還元剤を処理したところ、SS 結合は容易に切断された。これにより PNA は 2 本の短い断片となり、DNA を十分認識出来るほどの安定性を保てず、PNA は自発的に解離することとなった。以上から、外部因子を用いた PNA

の DNA 認識の制御に成功し、機能性リンカーの導入による PNA の高機能化に成功した。

ARCUT において、残存する PNA はその後の酵素処理を阻害するおそれも考えられ、今回のように PNA を容易に解離させる系は非常に重要となる。またこれを利用して ARCUT 切断断片の分離・回収のモデル実験にも成功した。

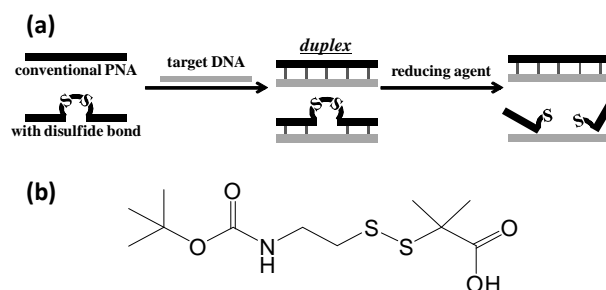


Figure 6. (a) Reductive cleavage of the internal disulfide bond in PNA for its spontaneous removal. Disulfide linkage is introduced to PNA using the corresponding Boc-monomer in (b)

II. 標的部位への配位子導入によるDNA加水分解の高効率化

過去の知見から、1本鎖DNA切断系において切断部位近傍にリン酸基を配置したり、2本鎖切断系でPNAにホスホセリンを導入したりすることで、その強い相互作用からCeを切断部位へと引き寄せ、DNA切断の高効率化に成功している。以上から、より強力な配位子がDNA切断の高効率化に必須と考えられる。さらに、

Ceの配位子上の固定化が可能となれば、系が簡略化され、細胞内や*in vivo*などへの展開に大きく貢献することとなる。そこで本研究では、より強くCeと相互作用する複数のリン酸基を有したEDTP配位子 (**Fig. 7**) を導入することで、高効率なARCUTの構築を目指し研究を進めた。

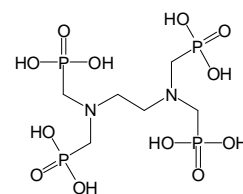


Figure 7. Chemical structure of EDTP.

II-a) EDTP配位子を用いた効率的なDNA切断

まず、系の簡略化のために1本鎖DNA切断系を用いて検討を行った。5'FAMラベルした45merの基質に対し、末端をそれぞれ修飾した20merのDNAを用い、ARCUTのターゲットとなる1本鎖部位（ギャップ部位）の切断活性を評価した。EDTP修飾DNAを用いた場合、20~25merの位置に選択的な切断断片が確認できる (**Fig. 8**)。特にEDTPを両側に配置したlane 8で、非常に高い切断効率が得られている。一方、未修飾、リン酸修飾したlane 3、lane 4では切断が確認できない。これは、従来系に比べ非常に低濃度のCe(IV)/EDTAを用いているためであり、EDTPのCeの濃縮効果によって、効率的な切断が達成されているのである。

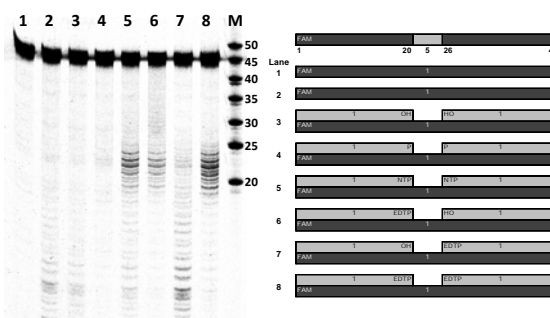


Figure 8. Polyacrylamide gel electrophoresis patterns for the hydrolysis of the 5'FAM-labelled DNA at a 5-base gap by Ce(IV)/EDTA complex. [DNA45] = 1 μ M, [each of additives] = 2 μ M. [NaCl] = 100 mM, [HEPES (pH = 7.0)] = 7.5 mM, [Ce(IV)/EDTA] = 0 (lane 1) or 50 μ M (lanes 2-8) at 50°C for 72 h.

特にEDTPを両側に配置したlane 8で、非常に高い切断効率が得られている。一方、未修飾、リン酸修飾したlane 3、lane 4では切断が確認できない。これは、従来系に比べ非常に低濃度のCe(IV)/EDTAを用いているためであり、EDTPのCeの濃縮効果によって、効率的な切断が達成されているのである。

II-b) 短鎖EDTP-ODNを利用した長鎖1本鎖DNAを対象とする遺伝子操作

速度論的な解析から、 K_d 値の大幅な減少が明らかとなった。EDTP導入により、必要なCe(IV)/EDTA量が減少し、同時に非特異切断が抑制され、選択性も向上することとなる。このような特長は、我々の巨大DNAを志向した目的に合致する。そこで、BFPの長鎖1本鎖DNAをターゲットとした遺伝子組み換え

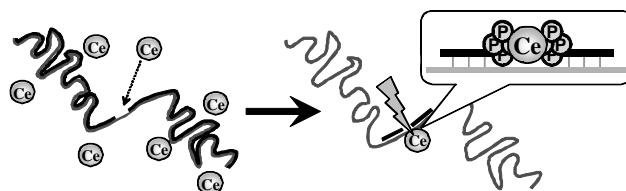


Figure 9. Site-selective scission of long single-stranded DNA using short EDTP-ODNs.

した目的に合致する。そこで、BFPの長鎖1本鎖DNAをターゲットとした遺伝子組み換え

を行い、実用面での EDTP 導入による選択性の向上を検証した。従来は 1 本鎖 DNA をターゲットとした場合、相補的な DNA を用いて切断位置以外は、全て 2 本鎖形成する必要があった (Fig. 9)。今回は Ce 濃縮効果から、短鎖 EDTP 修飾 ODN のみを用いた *BFP* → *GFP* の遺伝子組み換え実験を検討した。その結果、目的の遺伝子操作に成功し、EDTP の有用性が実験的に証明された。

II-c) Ce(III)を用いたEDTP配位子上へのCe固定化に向けた検討

さらに、Ce の配位子上の固定化を目指し、Ce(III)を用いた新たな DNA 切断系についても検討を行った。通常 Ce(IV)は、EDTA 錯体として用いている。これは、Ce(IV)は中性条件下では水酸化物ゲルを形成してしまうため、EDTA によって系を均一化する必要があるためである。

そこで、本研究では Ce(III)に注目した。Ce(III)は中性条件下でもゲルは形成せず、さらに系中の溶存酸素により容易に酸化され、DNA 切断活性を示す Ce(IV)を生じることが可能である。そこで、Ce(III)を DNA 末端の EDTP 上にまず捕捉し、EDTP 配位子上で空気酸化により Ce(IV)を生じさせ、Ce(IV)/EDTP を切断活性種として使い、DNA を切断することを目指した。Fig. 10 から、Ce(III)を用いた lane 2 で切断断片が確認出来、Ce(III)と EDTP-DNA を併用した新規 DNA 切断系の構築に成功した。さらに、II-a)以上に低濃度の Ce 量でも効率的な切断が達成されることが明らかとなった。

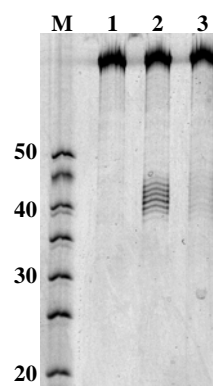


Figure 10. Site-selective scission of DNA45 by using Ce(III)-derived DNA cutter. [DNA45] = 1 μ M, [each of EDTP-ODN] = 1 μ M, [NaCl] = 100 mM, [HEPES (pH = 7.0)] = 5.0 mM, [Ce(III)] = 4 μ M (lane 2), [Ce(IV)/EDTA] = 4 μ M (lane 3) at 50°C for 20 h.

【結論】

リンカー-PNA および EDTP 配位子による ARCUT の高機能化について検討を行った結果、まず PNA に関しては、リンカーを導入することで mismatches 識別能を向上させることに成功した。また、ジスルフィドリンカーを導入し、還元剤によって DNA 認識を制御可能な PNA の構築にも成功した。

EDTP 配位子による DNA 切断の高効率化については、EDTP 導入が巨大な DNA を扱う上で、非常に強力な手法であることを実験的に証明した。また、EDTP と Ce(III)を併用した新たな DNA 切断系の構築にも成功した。今回構築した系では、EDTP 上で切断活性種の Ce(IV)を生じさせ切断に用いており、配位子上に Ce を固定化した系に非常に近いものといえる。このことは、今後 *in vivo* 等へ展開していく上で非常に重要な結果である。

以上の結果は、今後 ARCUT を次世代遺伝子操作ツールとして展開していく上での重要な知見であると言える。