

令和元年6月26日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K05825

研究課題名(和文) ペプチド核酸を利用した転写因子関連タンパク質の新規解析法の開発

研究課題名(英文) Development of a new analysis method of transcription factor related protein using peptide nucleic acid

研究代表者

須磨岡 淳 (SUMAOKA, Jun)

東京工科大学・工学部・教授

研究者番号：10280934

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに、ペプチド核酸(PNA)を用いて、長鎖DNAから所定DNA断片を切り出す技術、多くのDNA断片から目的DNA断片を精製する技術を開発してきた。本研究では、これら技術を融合し、DNAの特定部位に結合する転写因子関連タンパク質を分析する新たな手法の開発をめざし研究を進めた。その結果、PNAと一本鎖DNAを特異的に切断する酵素を用いて調製したDNA断片を単離精製することに成功した。また、人工酵素系として従来用いていたセリウム(IV)-エチレンジアミン四酢酸系では、DNA切断活性が不十分であることが明らかとなってきた。触媒系を探索したところ、酸化セリウムナノ粒子が有望であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ゲノムDNAの情報がRNAに転写される際には、DNAと結合する転写に関わるタンパク質群(転写因子関連タンパク質)が複雑に相互作用をしている。また、転写の異常はがんや多くの疾患とその病態に深く関わっていることが知られている。したがって、転写に関わる因子を詳細に調べる手法の開発は非常に重要である。本研究で見出されたDNAの特定部位をゲノムDNAから分離精製する技術は、DNAの特定部位と相互作用しているタンパク質を解析する新規手法への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：So far, we have developed a technology for cutting out a predetermined DNA fragment from long DNA using peptide nucleic acid (PNA) and a technology for purifying a target DNA fragment from many DNA fragments. In this study, we focused on the development of a new method to analyze transcription factors those bind to specific sites of DNA by fusing our technologies. As a result, we succeeded in isolating and purifying DNA fragments prepared using PNA and an enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA portion. In addition, it has become clear that the cerium (IV)-ethylenediaminetetraacetic acid system conventionally used as an artificial enzyme system is insufficient in DNA cleavage activity. The search for catalyst system has shown that cerium oxide nanoparticles are promising.

研究分野：生体関連化学

キーワード：転写因子 ペプチド核酸 DNA 核酸 セリウム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の目覚ましいバイオテクノロジーの発展とともに、DNA の複製・転写・翻訳などに関する研究対象はプラスミドなどの短鎖 DNA からゲノム DNA へとそのサイズが飛躍的に増大している。特に、ゲノム DNA の転写は、RNA ポリメラーゼが単に遺伝子を転写開始位置から順に転写しているのではなく、種々の転写に関わる因子が協同的に働いてその転写活性が制御されている。したがって、これらの転写に関わる因子の詳細な解析は、転写機構を解明するためには必須である。

二本鎖 DNA の任意の塩基配列を認識して特異的に結合する分子として、ジンクフィンガータンパク質や TAL エフェクタータンパク質などが知られている。しかし、その設計は比較的容易であるとされているもののセレクションなどの複雑な操作が必要な場合も少なくないことや、タンパク質であるが故の高さのため目的 DNA 配列への結合が設計通りに実現しない可能性も指摘されている。このような観点から、二本鎖 DNA に結合する合成分子の研究が盛んに行われている。我々は、二本鎖 DNA に結合する分子としてペプチド核酸 (PNA) に着目し、これを用いたバイオテクノロジーに利用可能な化学ツールの開発を目指し研究を行ってきた。ここで、PNA とは、主鎖にペプチド結合を持つ人工核酸 (図 1a) であり、ワトソン・クリック則で DNA と安定な二重らせんを形成することが知られている。また、核酸塩基として A の代わりに D を、T の代わりに U を使用した pseudo-complementary PNA (pcPNA) を用いると (図 1b)、二本鎖 DNA に対して double duplex invasion し、invasion complex (図 1c) を形成することが報告されている。この invasion complex の形成に際しても、インベーションする標的配列は、ワトソン・クリック則で一義的に決定されるため、pcPNA の配列設計は極めて容易である。

研究開始までに、互いに数塩基ずれた一組の pcPNA を用いて、基質二本鎖 DNA 中の標的配列を選択的に切断することに成功している。このような互いにずれた pcPNA が double-duplex invasion すると、図 2 に示すように invasion 部位の両端が一本鎖状態となる。ここへ、一本鎖特異的な DNA 切断能を持つ酵素 (ヌクレアーゼ S1) やセリウム(IV)/EDTA 系触媒 (二本鎖状態の DNA に対してはほとんど切断活性を持たない) を添加すると、培養細胞から抽出したヒトゲノム DNA であっても高い塩基配列選択性で設計通りに切断できることを報告している。これは、巨大なゲノム DNA に対しても pcPNA が設計通りに目的位置を認識していることを実証するものである。

一方、pcPNA の末端にビオチンを修飾することで、目的 DNA 断片のみを精製する手法の開発にも成功している (図 3)。この手法では、まず、ヒト細胞から抽出した全ゲノム DNA を制限酵素で断片化し、一方の pcPNA のみをビオチン修飾した一組の pcPNA を系に加え、目的 DNA 断片とのみ invasion complex を形成させる。ここで得られた complex に対して、アビジン・ビーズを用いてアフィニティー分離を行うと、非常に簡便に目的断片を得ることが可能である。

以上のように、研究開始当初において、pcPNA を用いた「巨大な DNA を選択的に切断する技術」、「多くの DNA 断片から目的の DNA 断片を精製する技術」を我々は開発しており、これらを融合させることで、転写機構解明のための新たな技術の開発が期待される状況にあった。

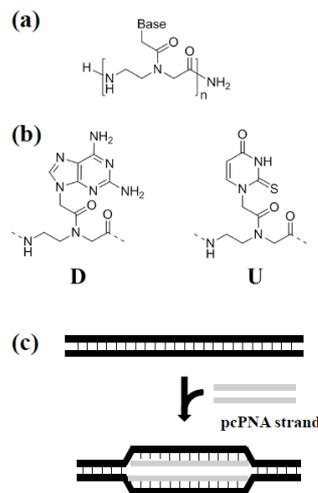


図 1 (a) PNA の構造。(b) pcPNA で用いられる D と U の構造。(c) 二本鎖 DNA への pcPNA の double-duplex invasion

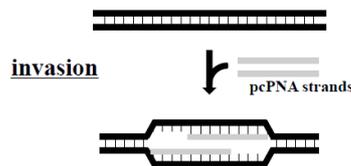


図 2 互いに数塩基ずれた pcPNA が double-duplex invasion。ずれた部分が一本鎖状態となり、この部分が一本鎖特異的な触媒で切断される。

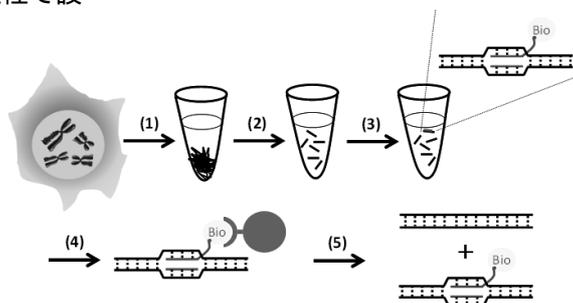


図 3 ビオチン修飾 pcPNA を用いた特定 DNA 断片の精製。(1)ゲノム DNA の細胞からの抽出、(2)制限酵素による断片化、(3)ビオチン修飾 pcPNA の DNA 断片への double-duplex invasion、(4) および (5) アビジン・ビーズを用いた目的 DNA 断片のアフィニティー精製。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目標は、巨大な DNA から目的の DNA 断片を精製する技術を確立し、さらにこの技術を活用し、標的 DNA 近傍に存在するタンパク質を補足するための手法を開発することである。そこで、本研究課題においては、まず、モデル DNA (プラスミド DNA や PCR 産物) を用いて本手法の妥当性を確認する。すなわち、(1) 一方をビオチン修飾した一組の pcPNA を系に加え、double-invasion complex を形成させ、ここへ (2) Ce(IV)/EDTA や 1 本鎖特異的な酵素を加えて目的部位での DNA 切断を行なった後、(3) アビジン・ビーズによるアフィニティー精製を行なう。ここでは、pcPNA へのビオチンの修飾方法や精製条件などを最適化し、ゲノム DNA の系へと拡張する。

一方、pcPNA へ反応性の官能基 (光刺激などに応じて任意のタイミングで架橋反応を実現できるような官能基) を導入し、double-invasion complex の標的 DNA 近傍に存在するタンパク質を架橋により補足する方法についても検討を行う。すでに、pcPNA の末端に色素 (シアゾールオレンジ) を修飾し、二本鎖 DNA の目的部位での選択的な酸化切断に成功している。したがって、光反応性の pcPNA が double duplex invasion した際にも、近傍に存在しているタンパク質との架橋能を保持していることが期待される。PNA に架橋されたタンパク質は、PNA の相補鎖形成能を活用して分離精製することが可能である。

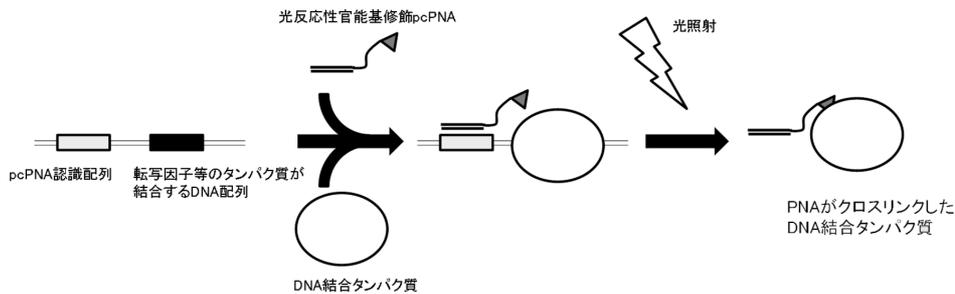


図4 光反応性の pcPNA を用いた特定 DNA 配列に相互作用するタンパク質のアルキル化の概念図。PNA がクロスリンクした DNA 結合タンパク質は pcPNA の相補鎖形成能を活用して精製する。

3. 研究の方法

一本鎖切断触媒とビオチン修飾 pcPNA を使用して調製した「DNA 結合タンパク質 - DNA 複合体」を、いかにして効率的に分離精製するかが重要課題となる。そこで、pcPNA と一本鎖切断触媒 (S1 ヌクレアーゼ, Ce(IV)/EDTA) によってモデル DNA 系 (プラスミド DNA など) を切断し、これを分離精製する手法の確立する (アフィニティー精製条件の最適化)。次に、モデル系で得られた条件を用いて実際のゲノム DNA 系へと展開を図る。

タンパク質存在下で pcPNA が double-duplex invasion するかどうかも重要な点である。そこで、モデル DNA 系を用いて、タンパク質存在下での pcPNA の double-duplex invasion 能について評価し、最適な条件を探索する。

ビオチンを用いたアフィニティー精製と並行し、光反応性の架橋部位導入した pcPNA を調製し、これを用いて特定部位近傍に結合するタンパク質を探索する方法を追求する。

4. 研究成果

(1) DNA 断片の精製条件の最適化

直鎖化したプラスミド DNA (約 4.7 kbp) を基質として使い、図 5(a) (青文字) に示す pcPNA と S1 ヌクレアーゼを用いて 1 か所切断した。その後、図 5(b) の手順でストレプトアビジン (STV) とビオチン (Biotin) の結合を利用して DNA 混合物からアフィニティー精製を行った。

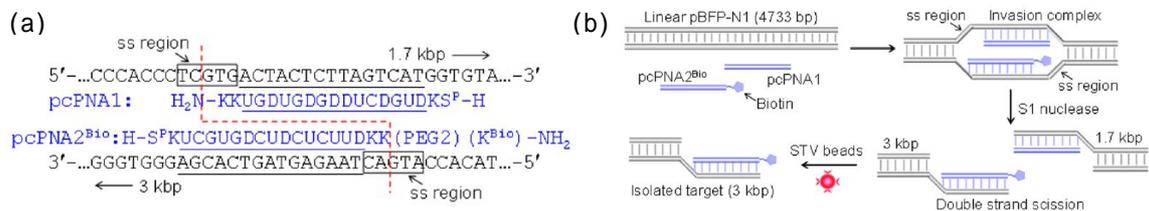


図5 使用した pcPNA の配列 (Sp はホスホセリン, PEG はリンカー, K^{Bio} はビオチン修飾リシンをそれぞれ示す) と (b) 切断断片のアフィニティー精製の手順。

pcPNA と S1 ヌクレアーゼの併用による DNA 二本鎖の選択的切断および切断断片の回収という観点から、種々の pH での検討を行った結果を図 6 に示す。S1 ヌクレアーゼは 4.5 ~ 5.0 に至適 pH を有しているため、検討を行った範囲では pH が低いほど切断の活性は高い。しかし、pH 5.5 では目的 DNA 断片以外の産物 (Non-specific fragments) も確認された。また、生理条件と異なる場合は DNA とタンパク質の相互作用そのものが変化することが予想されるため、S1 ヌクレア

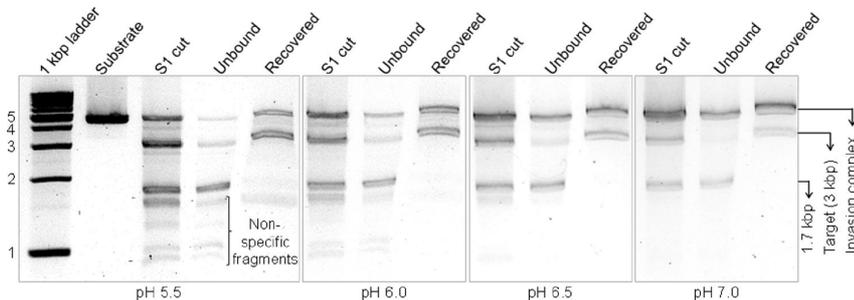


図 6 pcNA と S1 ヌクレアーゼによる直鎖化したプラスミド DNA (4.7 kbp) の切断と目的断片 (3 kbp) の精製。S1 による切断は 25 で 3 時間行った。

ーゼを用いた切断については中性領域で行うことが適当であると結論づけた。

次に、キットにより細胞から抽出したゲノム DNA を対象として、同様の実験を行った。ゲノム DNA 中の一カ所を標的とし pcNA と S1 ヌクレアーゼで切断を行い、その後に制限酵素 (*Nsi*I) でさらに断片化した。断片化したサンプルからストレプトアビジンビーズを用いて精製し、定量 PCR により評価した。その結果、目的断片が有意に濃縮されていることが明らかになった。

さらに、ゲノム DNA の切断・精製実験を Ce(IV)/EDTA 系を用いて行ったが、Ce(IV)/EDTA 系の切断活性が S1 ヌクレアーゼより低いため (あるいは、条件の最適化が不十分であったため)、良好な結果を得ることが出来なかった。

(2) DNA 切断触媒の開発

S1 ヌクレアーゼはタンパク質であり、DNA とタンパク質を固定化する際に使用するホルムアルデヒドが残留していると切断活性に大きく影響を与える可能性がある。そこで、タンパク質とは異なる DNA 切断触媒の系についても検討する必要がある。(1) 項に示したが、これまで触媒として使用してきた Ce(IV)/EDTA に関して、同様の検討を加えたが切断活性が不十分であることが明らかになってきた。そこで、酸化セリウム (CeO₂) ナノ粒子に着目してその DNA 切断活性を評価した (本研究開始とほぼ時期を同じくして、Vernekar らによりリン酸トリエステルの加水分解反応に対して、ある種の CeO₂ ナノ粒子が有効であることが報告された *Angew. Chem. Int. Ed.* 2016, **55**, 1412-1416)。

DNA のモデルとしてチミジリル (3' 5') チミン (TpT) を用いて、その切断活性を HPLC により評価した。HPLC クロマトグラム (図 7) に示すように、TpT は CeO₂ ナノ粒子により加水分解され、チミンの生成が観測された。また、HPLC クロマトグラム上には、ほとんどリン酸モノエステルのピークは確認されなかった。これは、チミン 3'-モノリン酸 (3'T) やチミン 5'-モノリン酸 (5'T) を基質として反応すると TpT と比較して数倍以上迅速に加水分解される結果と一致する。すなわち、生成した 3'T や 5'T はさらに加水分解されてチミン (T) が生成したものと考えられる。また、pH7 における TpT の切断活性は Ce(IV) 水酸化物ゲルに匹敵するものであった。Ce(IV)/EDTA は TpT に対して、ほとんど切断活性を持たないことから、CeO₂ ナノ粒子は切断触媒として非常に有望である (ただし、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA の選択性が Ce(IV)/EDTA の系では顕著である)。CeO₂ ナノ粒子による DNA 切断の一本鎖 DNA 選択性に関しては、今後の課題である。

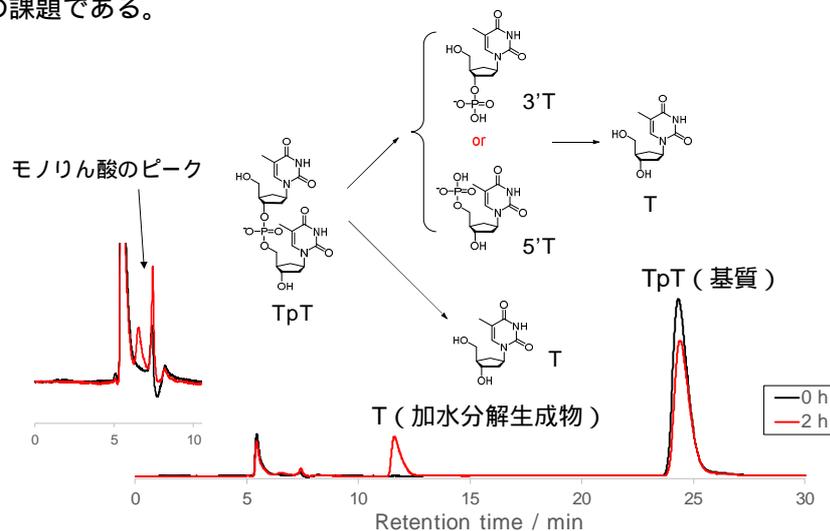


図 7 CeO₂ ナノ粒子による DNA モデル (チミジリル (3' 5') チミン (TpT)) の加水分解。pH7, 50 , [TpT]₀ = 0.1 mM, CeO₂, 1.4 mg/mL.

(3) pcPNA 末端への光架橋部位の導入

図8に示ように pcPNA の N 末端側に、リンカー（PEG）およびジアジリジン部位（Ziaz）の導入を試みた。

PEG 部位の導入直前までは確実に pcPNA が伸長していることを MALDI/TOF MS により確認し、PEG 部位および Diaz 部位を導入した。

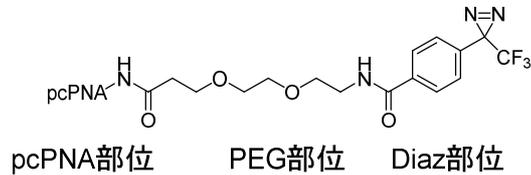


図8 光架橋性 pcPNA の構造

MALDI/TOF MS 分析の結果、光架橋剤修飾

pcPNA の生成を示唆するデータが得られ、HPLC を用いて分離精製を行った。分離精製後に再び MALDI/TOF MS 分析を行ったところ、目的産物はほとんど得られていないことが明らかになった。これは、HPLC による精製過程で光反応が進行してしまったことが考えられる。今後、精製過程を工夫する必要がある。

(4) タンパク質共存下による pcPNA のインベージョン条件の検討

これまでに、細胞内環境の分子クラウディング状態を実現するために、溶液に PEG200 を加えた系において、pcPNA の DNA へのインベージョンに関する検討を行ってきた。その結果、PEG200 が共存すると、通常は double-duplex invasion 複合体が形成されないような塩濃度（例えば、[NaCl] = 100 mM など）においても、pcPNA がインベージョンすることを報告している。そこで、タンパク質（ウシ血清アルブミン（BSA））を共存させて、pcPNA の double-duplex invasion 能を評価した。BSA の等電点は 4.7 であり、pH7 においては DNA との特別な静電的相互作用は考えにくい。ポリアクリルアミド電気泳動によるゲルシフトアッセイの結果、PEG200 を加えた時と同様に、BSA を添加により二本鎖 DNA の安定性が低下していることが明らかになった。さらに、double-duplex invasion 複合体の安定性の低下も示唆される結果を得た。これは、直接タンパク質が存在する状況で double-duplex invasion 複合体を形成するためには、条件のさらなる最適が必要であることを意味している。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1) A. Rajendran, N. Shigi, J. Sumaoka, M. Komiyama, “Affinity isolation of defined genomic fragments cleaved by nuclease S1-based artificial restriction DNA cutter”, 査読有, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, 2019, **76 (1)**, e76, 1-14.

2) A. Rajendran, N. Shigi, J. Sumaoka, M. Komiyama, “Artificial restriction DNA cutter using nuclease S1 for site selective scission of genomic DNA”, 査読有, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.*, 2019, **76 (1)**, e72, 1-19.

3) A. Rajendran, N. Shigi, J. Sumaoka, M. Komiyama, “One-pot isolation of a desired human genome fragment by using a biotinylated pcPNA/S1 nuclease combination”, *Biochemistry*, 査読有, 2018, **57**, 2908-2912.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.cloud.teu.ac.jp/public/MDF/sumaokajn/sumaoka_lab/index.html

6 . 研究組織

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。