



平成 27 年 4 月 7 日

報道機関 各位

熊本大学

DNA 上にナノサイズの「スイッチ」 熊大グループ、バイオテクノロジー新基盤技術を確立

<概要>

熊本大学大学院自然科学研究科の井原 敏博 教授、北村 裕介 助教らの研究グループは、金属イオンを繋ぎ手にしてループ状(Ω型)となる人工DNAを独自に作成し、これにより今回、金属イオンを引き金にターゲットDNAの配列を編集し、好きなタイミングで機能をON・OFFと切り替えるスイッチを作製することに世界ではじめて成功しました。

本技術は従来の核酸塩基配列編集と違い、DNAを切ったり貼ったりせず、「近づける・遠ざける」だけでその機能を調節できるため、簡単に機能のスイッチングができるようになりました。また、DNAを切ってしまうことが無いので、すぐに再度もとの状態に戻すことができることも大きな利点です。

さらにこの技術は、人工DNAが一時的に「Ω」の形をつくることさえできれば金属イオンに限らずその他の様々な刺激を反応の引き金として利用することが可能で、「Ω型人工DNAを用いたターゲットDNA、およびRNAの制御」という新たなバイオテクノロジーの基盤となるものです。今後は、DNAの構造制御、遺伝子診断、遺伝子治療、および遺伝子機能の制御などへ応用・展開が期待されます。

本研究成果は、ネイチャー・パブリッシング・グループが発刊しているNature Communications誌にロンドン時間の平成27年4月7日午前10時【情報解禁：日本時間 平成27年4月7日午後6時】にWeb上で公開されました。

(URL:<http://www.nature.com/ncomms/2015/150407/ncomms7640/full/ncomms7640.html>)

なお、本誌のImpact Factor(雑誌掲載が学術分野に与えるインパクトの指数)は、総合科学分野で世界第3位の「10.7(2014年時点)」です。

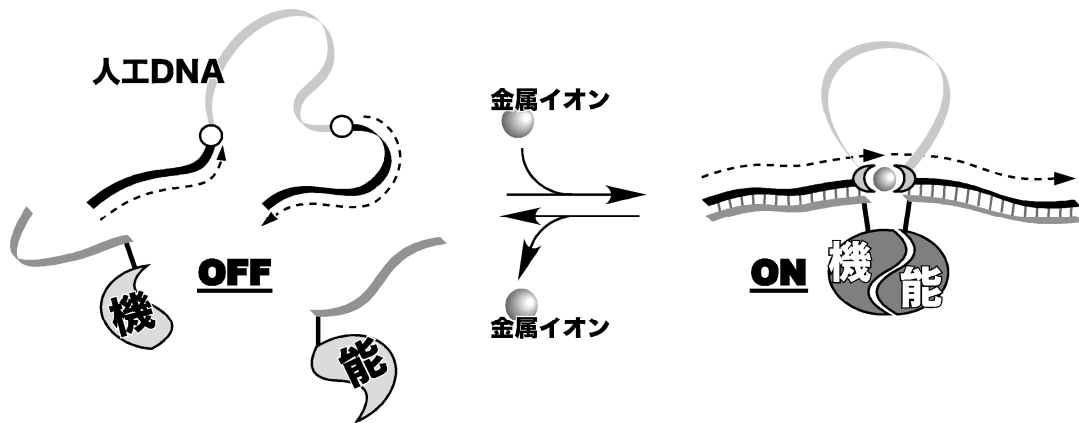
論文タイトル: Metal ion-directed dynamic splicing of DNA through global conformational change by intramolecular complexation (DOI: 10.1038/ncomms7640)

※本研究は、主に科学技術振興機構(JST)・戦略的創造研究推進事業(CREST)、および文部科学省・科学研究費助成事業による研究費の支援を得て実施されたものであります。

詳細な説明を次ページ以降に記載しております。また、直接ご説明することもできますので、お気軽に下記連絡先までお問い合わせ下さい。

(不在時は、メールにてお問い合わせ頂くことも可能です。)

<本研究のコンセプト>



あらゆる非天然の構造を導入することのできる「人工DNA」は、様々な病気に関係する遺伝子診断、治療、および遺伝子操作の新規基盤技術などへの展開が期待されている。

本研究では、両端がターゲットDNAと結合するような人工DNAが、金属イオンを繋ぎ手として Ω 型構造を形成するように設計した。この人工DNAに金属イオンを添加することで Ω 構造を作り、物理的に離れた位置にあるターゲットDNA同士（RNAでもよい）を互いに近づけ、その機能を様々に調節することができる。たとえば上図の例では、金属イオンを入れた際に、特定の二つのDNA同士が近づくことでその機能がONとなっている。

< 詳細な説明 >

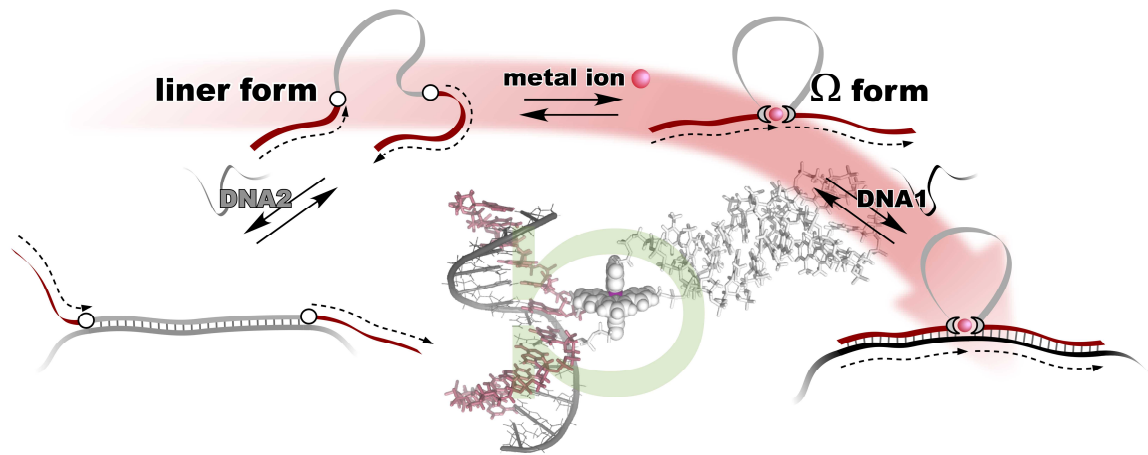


図1 Ω型構造形成を利用したDNAの塩基配列編集の模式図

金属イオンによりDNA (tp2DNA) 上の2箇所を可逆的に繋ぎ留めΩ型構造とすることができる。このDNAは金属イオン添加前(左)にはDNA2と結合するが、添加後(右)に新しく生じた塩基配列にはDNA1が結合する。

DNAは化学的に合成することができ^{*1}、様々な用途でバイオテクノロジーを支えています。本研究ではまず、特定の金属イオンと強く結合するような非天然分子「ターピリジン^{*2}」を2カ所含むような人工DNA (tp2DNA) を化学合成しました(図1左)。ターピリジンは鉄イオンのような金属イオンにたいへん強く結合しますが、かならず金属イオンの周りに2つが集まって安定化する性質をもっています。もしDNA骨格に挿入したターピリジンも同様の性質を示せば、人工DNAの全体構造の折れ曲がりや金属イオンの種類、濃度によって人工的にコントロールできると考えました。実際、DNAに挿入したターピリジンは期待どおりにはたらい、金属イオンが人工DNAに「Ω型」の構造を誘起することがわかりました。このΩ型構造においては、2つのターピリジンに挟まれたDNAの部分配列(図1 ループ部分)は外側につまみ出され(バイパスされ)、同時にターピリジンの外側に位置していた2つの配列(図1 人工DNA外側の2箇所の配列)が直接繋がれた構造をとります。つまり、金属イオンとターピリジンの結合によってDNAの塩基配列を編集し新たな塩基配列が生じたことを意味します。

DNA編集のひとつの応用例として、酵素機能をもつDNA (DNAzyme^{*3}) の活性制御に関する実験を行いました(図2)。まずDNAzymeを二つに分割して一旦これを不活化しました(図2 左側2つのリボン)。つぎにこの系に人工DNAを混ぜた後、さらに金属イオン(Fe^{2+} 、 Ni^{2+} などの遷移金属イオン)を添加しました。その結果、Ω構造形成により新たに生じた塩基配列をテンプレートとして、有効なDNAzyme構造が再構築し、不活化前のDNAzyme本来の触媒活性を回復させることに成功しました(図3)。

本研究成果は、「Ωモチーフ」として一般化することができます。すなわち、ターピリジンに限らずいかなる人工分子でも、その分子間の特異的な結合を人為的にコントロールできるようなものをDNA骨格中に複数組込むことで、金属イオン以外のさまざまな刺激によりDNAの全体構造を制御して塩

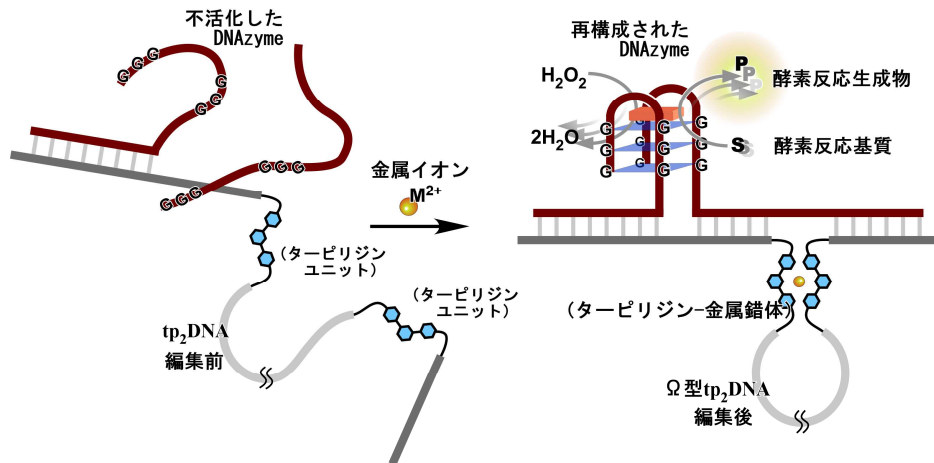


図2 Ω型DNAを鋳型としたDNAzymeの活性制御の模式図

金属イオンにより人工DNA (tp_2DNA) 上に生じた塩基配列を鋳型として、不活化した（分割した）DNAzymeを再構成することで酵素機能を制御できることを示した。

塩基配列を編集できることとなります。この際、生体内で行われる通常のスプライシング^{※4}（分子の組み替え方法の一つ。詳しくは用語の説明を参照。）のようにDNAの一部を切断して切り出し、その後、その両側のフラグメントを繋ぐ必要はありません。上記のように一時的にΩ型の形状をつかって特定の部分配列をバイパスしてやれば、図1に示すように刺激応答型の可逆的な塩基配列制御が可能となります。本研究では、ΩモチーフによりDNAzymeなどの機能性核酸の活性を制御可能であることを示しましたが、他にもDNAの構造制御、遺伝子診断、遺伝子治療、および遺伝子機能の制御などの応用を考えることができます。

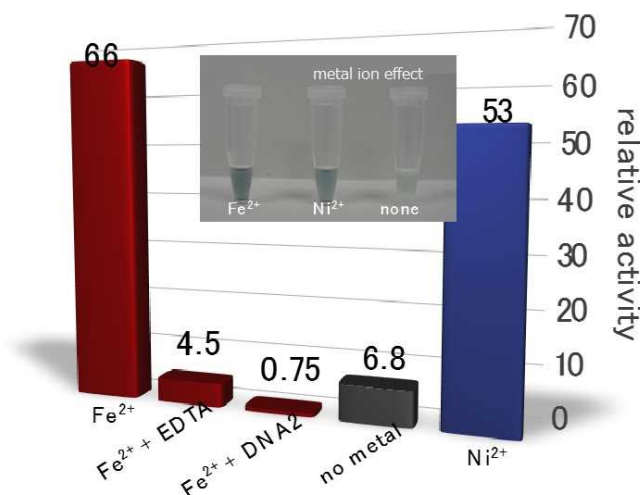


図3 Ω型DNAを鋳型としたDNAzymeの相対活性

図2の系で反応開始後30分でのDNAzymeの生成物量を相対比較した。反応は Fe^{2+} や Ni^{2+} により著しく加速した。過剰のEDTA（金属イオン除去剤）は Fe^{2+} を tp_2DNA から奪うことで反応を抑制した。また、ループ部分に相補的なDNA（図1のDNA2）もDNA編集をほぼ完全に阻害することを確認した。

用語説明

※ 1. DNAとその化学合成：

DNA（娘鎖）は生体中ではDNA（親鎖）を鋳型にして酵素（DNAポリメラーゼ）が合成するが、完全に異なる手段である有機合成により、まったく同じDNA分子を化学的に合成することが可能である。化学合成では、非天然のいかなる構造でもDNA骨格中に組込んだり、末端にぶら下げたりすることが可能であるので、様々な人工分子を組み合わせて特定の機能を有するDNAを合成することができる。

※ 2. ターピリジン：

3つのピリジン環が繋がった分子。それぞれのピリジン環上の合わせて3つの窒素原子が金属イオンに結合する（配位する）ことで遷移金属イオンなどと安定な錯体を形成する。特に、 Fe^{2+} や Ni^{2+} とは2:1の組成比の非常に安定な錯体を与える。

※ 3. DNAzyme（DNAザイム）：

触媒機能をもつDNA分子。DNA + enzyme（酵素） = DNAzyme。一本鎖のDNAがある特定の三次構造（立体構造）を形成し、それが通常タンパク質から成る酵素のように基質を結合して、基質に対する特定の化学反応を触媒する。同様の核酸触媒でRNA骨格のものはリボザイム（ribozyme）と呼ばれ、その発見に対して1989年、T. R. Cech（米国）、S. Altman（カナダ）にノーベル賞が与えられている。

※ 4. スプライシング：

ある線状の分子の一部を抜き取り、残りの両側が繋がること。おもにRNAが成熟する過程のことを指すことが多いが、DNAやタンパク質でも同様の反応をスプライシング（DNAスプライシング、プロテインスプライシング）と呼ぶ。スプライシングでは通常、ポリマーは切断/連結のプロセスを経て編集されるが、本研究ではΩ型構造形成により切断を経ることなくDNAを可逆的に編集している。

発表論文

題目：

Metal ion-directed dynamic splicing of DNA through global conformational change by intramolecular complexation

掲載雑誌：

Nature Communications, in press (2015)

著者：

Toshihiro Ihara*^{1,2}, Hiroyuki Ohura¹, Chisato Shirahama¹, Tomohiro Furuzono¹, Hiroshi Shimada¹, Hirotaka Matsuura¹, and Yusuke Kitamura^{1,2}

所属：

¹Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Graduate School of Science and Technology, Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Chuo-ku, Kumamoto 860-8555, Japan

²CREST, Japan Science and Technology Agency, 7 Gobancho, Chiyoda-ku, Tokyo 102-0076, Japan

【お問い合わせ先】

熊本大学大学院自然科学研究科

担当：井原敏博

電話：096-342-3873

e-mail：toshi@chem.kumamoto-u.ac.jp