



平成 28 年 12 月 2 日

ゲノム編集の効率が向上する分子機構を解明

【本研究成果のポイント】

- 生体の設計図であるゲノムを編集する技術（ゲノム編集技術）の利用が爆発的な勢いで進んでいる。しかし、応用面に注目が集まる反面、ゲノム編集過程に関わる分子がどのように働いているかに関する理解はほとんど進んでいなかった。
- ゲノム編集技術の一つとして TALEN タンパク質を用いる方法がある。TALEN タンパク質の従来型と改良型（Platinum TALEN）の分子構造および構造動態の違いを、物理化学的手法と分子動力学シミュレーションを用いて解析し、改良型 TALEN が従来型に比べ、高い構造柔軟性を獲得することにより、従来型よりも長いターゲット配列を認識することが可能になることを明らかにした。
- 本研究を通して、TALEN を用いたゲノム編集技術のさらなる高効率・高精度化を実現する分子デザイン法を提案した。この研究成果は、単にゲノム編集への応用のみならず、細胞核内にある膨大な DNA 情報の中から特定の塩基配列を持つ部位を選択的に検出することを実現する技術としても展開できる。

【概要】

広島大学大学院理学研究科・クロマチン動態数理研究拠点の拠点長・楯 真一教授らの研究グループは、ゲノム編集に使われる TALEN タンパク質の DNA 認識機構とゲノム編集効率が、TALEN タンパク質の構造動態（構造ダイナミクス）に規定されることを、物理化学的計測と分子動力学シミュレーションを組み合わせることで明らかにしました。TALEN タンパク質 DNA 認識領域の構造柔軟性を向上させることにより、TALEN はより長いターゲット配列の認識が可能となり、その結果としてゲノム編集効率を向上させることができるという分子機構を明らかにしました。

本研究成果は、ロンドン時間の 11 月 24 日午前 10 時（日本時間：11 月 24 日午後 7 時）「Scientific Reports」オンライン版に掲載されました。

●掲載雑誌：Scientific Reports

●URL：<http://www.nature.com/srep/>

●論文題目：Non-RVD mutations that enhance the dynamics of the TAL repeat array along the superhelical axis improve TALEN genome editing efficacy

●著者：Naoya Tochio, Kohei Umehara, Jun-ichi Uewaki, Holger Flechsig, Masaharu Kondo, Takehisa Dewa, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Takashi Saitoh, Yuichi Togashi and Shin-ichi Tate*

*Corresponding author（責任著者）

●doi:10.1038/srep37887

【背景】

農水畜産物の品種改良や疾患モデルマウスの構築には、生体の設計図である遺伝子（ゲノム）を改変する必要があるため、莫大な時間と手間が必要です。しかし、近年、特定の DNA 配列を認識するタンパク質と、DNA 配列を切断する酵素（ヌクレアーゼ）をタンパク質工学的につなぎ合わせた人工タンパク質を用いることで、特定の遺伝子を不活化、あるいは新たに導入した遺伝子をつなぎ合わせる技術（ゲノム編集技術）が生み出されました。生物学研究に利用される変異体の作製を始め、農水畜産物の品種改良、遺伝病の治療など、その応用例の報告は、ゲノム編集技術の向上に伴って爆発的に増加しています。

こうしたゲノム編集技術の一つとして、植物の非病原性細菌由来の転写因子（TALE タンパク質）（注 1）がもつ DNA 認識領域を利用した TALEN（注 2）があります。TALE タンパク質の DNA 認識機構は、DNA 認識領域を構成する 34 個のアミノ酸からなるリピート（TAL リピート）が 4 種の DNA 塩基のうち 1 つを特異的に認識するもので、ターゲットとなる DNA 配列に対応するよう TAL リピートを組み合わせることで目的の配列にあった TALEN を設計することができます。また、TALE タンパク質は DNA と結合するとき分子全体が顕著に縮むことも特徴です。TALEN は他のゲノム編集技術に比べ類似配列の誤認識が低いといわれているため、ES 細胞や多くのモデル生物への適用が報告されています。さらに、その利用範囲の拡大に伴い、より精密なゲノム編集技術が求められており、多くの研究グループがその改良を模索しています。広島大学の山本 卓教授のグループも、従来使用されてきた TAL リピートとは異なったリピートで構成された、より高効率な TALEN（Platinum TALEN）を報告しています。しかし、なぜ従来型に比べ高効率となったのか、そのメカニズムは不明でした。

【研究成果の内容】

本研究では、従来型の TAL リピートがもつ 34 アミノ酸のうち、たった 2 アミノ酸を置換した改良型 TAL リピートからなる TALE タンパク質と、同じ数の従来型 TAL リピートから構成された TALE タンパク質の物理化学的な性質の違いを、サイズ排除クロマトグラフィー（注 3）、動的光散乱法（注 4）、円二色性分光法（注 5）、示差走査熱量測定法（注 6）、分子動力学シミュレーションを用いて比較検討したところ、改良型 TAL リピートに導入したアミノ酸変異が、リピート間の水素結合に変化を与えることで構造の柔軟性を引き起こし、TALE タンパク質がその柔軟性に起因した広い構造分布をとることを明らかにしました。

また、標的 DNA 配列との結合時における違いを等温滴定熱量測定法（注 7）を用いて比較したところ、改良型 TALE タンパク質は、従来型に比べより多くの化学結合を伴って DNA 塩基と結合していることを見出しました。これは、柔軟性向上により、改良型 TALE タンパク質は、DNA と結合したときの縮んだ構造をとりやすいことに起因していると考えられます。私たちの研究グループは分子動力学シミュレーションと物理化学的な実験を用いることで、TALE タンパク質の DNA 認識領域の柔軟性向上が、高効率なゲノム編集を達成するという新しいメカニズムを提唱しました。

【今後の展開】

より精密なゲノム編集技術の開発には分子レベルでの DNA 認識メカニズムの理解が不可欠です。本研究はこれまでの人工酵素開発では有効とされてきた安定性の向上とは異なり、柔軟性の向上による高機能化を提唱しています。本研究で得られた知見が、今後のゲノム編集技術の向上に役立つことが

期待されると同時に、特定の DNA 配列を認識するタンパク質分子が、細胞核内の膨大な数の DNA 塩基からターゲットの配列を認識・探索しているメカニズムの解明や様々な応用研究にも役立つと考えられます。

※用語解説

(注1) TALE

植物に感染する非病原性細菌の転写因子。Transcription activator-like effector

(注2) TALEN

Transcription activator-like effector nuclease

(注3) サイズ排除クロマトグラフィー

カラム充填された担体がもつ穴に分子が入り込む時間は分子の大きさによって異なる。この時間の違いによって大きさの異なる分子を分離・精製する技術。

(注4) 動的光散乱法

溶液中の粒子にレーザー光を当てるとその分子運動の違いによって散乱光のパターンが変化する。散乱光パターンから分子運動つまり分子の大きさを測定する手法。

(注5) 円二色性分光法

タンパク質を構成するペプチド鎖の二次構造に由来する旋光性の違いから、タンパク質の二次構造を調べる手法。

(注6) 示差走査性熱量測定法

温度を一定速度で変化させ、分子の温度変性に伴う熱変化を観測する手法。タンパク質の安定性評価に使用される。

(注7) 等温滴定熱量測定法

2つの試料溶液を混合した際の熱変化を観測する手法。分子が結合する際の物理化学的パラメータを取得できる。

【研究支援】

本研究の遂行にあたり、文部科学省・AMED 創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業（生命動態システム科学推進拠点事業「核内クロマチン・ライブダイナミクスの数理研究拠点形成」、文部科学省・JSPS 科研費 JP23115005（新学術領域「少数性生物学」）、JP26650023、JP26291015 の助成を受けました。

【お問い合わせ先】

大学院理学研究科・クロマチン動態数理研究拠点 教授 楯 真一 Tel : 082-424-7387 FAX : 082-424-7898 E-mail : rcmcd@hiroshima-u.ac.jp

発信枚数：A4版 3枚（本票含む）