

平成 20 年度 博士(工学)学位論文

人工制限酵素の作用機構に関する研究

東京大学大学院工学系研究科

化学生命工学専攻

宮島佳孝

目次

第1章 研究の背景と目的

第1節 緒言.....	1
第2節 研究背景	
2-1 核酸の構造と生化学的意義.....	3
2-2 DNA の切断ならびに Ce(IV)イオンによる DNA の加水分解.....	4
2-3 ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid; PNA).....	6
2-4 PNA のインベージョン.....	6
2-5 pseudo-complementary PNA(pcPNA)の開発と double-duplex インベージョン.....	7
2-6 インベージョンによる構造変化とその応用.....	8
2-7 Ce(IV)/EDTA とインベージョンとを併用した人工制限酵素 ARCUT の開発.....	9
2-8 ARCUT による DNA 切断ならびに過去の応用研究	
2-8-1 ARCUT による二本鎖 DNA の位置選択的切断.....	10
2-8-2 融合タンパク質の調製.....	11
2-8-3 ゲノム DNA の位置選択的切断.....	12
第3節 研究目的.....	13
第1章 参考文献・脚注.....	14

第2章 ARCUT による DNA 切断におけるミスマッチ認識

第1節 緒言.....	16
第2節 実験概要と方法	
2-1 実験概要.....	17
2-2 実験方法	
2-2-1 基質 DNA の調製法.....	18
2-2-2 pcPNA の合成.....	19
2-2-3 Ce(IV)/EDTA 錯体の調製.....	19
2-2-4 切断実験.....	19
第3節 実験結果	
3-1 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	20
3-2 Gap 形成領域の一塩基対を別の塩基対に置換した場合.....	21
3-3 KCl 存在下での DNA 切断におけるミスマッチ認識.....	23
第4節 まとめ.....	25
第2章 参考文献・脚注.....	26

第3章 ARCUT による切断配列認識の機構

第1節 緒言.....	27
第2節 実験方法	
2-1 インベージョン実験について.....	28
2-2 T_m 測定.....	28

2-3	13-mer pcPNA によるインベージョン実験.....	28
-----	--------------------------------	----

第3節 実験結果

3-1	切断実験条件下([NaCl] = 100 mM)でのインベージョン複合体形成について.....	29
3-2	KCl 存在下([KCl] = 100 mM)でのインベージョン複合体形成について.....	31
3-3	PNA/DNA 二本鎖の熱力学的な安定性(T_m)からの解析.....	32
3-4	ARCUT における塩の効果.....	34
3-5	ARCUT の設計指針.....	37

第4節	まとめ.....	40
-----	----------	----

第3章	参考文献・脚注.....	41
-----	--------------	----

第4章 Double-duplex インベージョンのミスマッチ認識に関する基礎的検討

第1節	緒言.....	42
-----	---------	----

第2節 実験方法

2-1	インベージョン実験.....	43
2-2	T_m 測定.....	43

第3節 実験結果

3-1	非対合部分をもたない 10-mer pcPNA による double-duplex インベージョン.....	44
3-1-1	低塩濃度条件下([NaCl] = 10 mM)での、インベージョン複合体形成について.....	44
3-1-2	インベージョンのミスマッチ認識にあたえる塩濃度の影響.....	48

3-2 非対合部分をもたない 8-mer pcPNA による double-duplex インベージョン	51
3-2-1 低塩濃度条件下([NaCl] = 10 mM)での、インベージョン複合体形成について	51
3-2-2 インベージョンのミスマッチ認識にあたえる塩濃度の影響	54
第 4 節 まとめ	57
第 5 章 参考文献・脚注	58
第 5 章 総括	
第 1 節 本研究のまとめ	59
第 2 節 結論	61
業績リスト	62
謝辞	66

第1章 研究の背景と目的

第1節 諸言

2003年にヒトゲノム計画が終了するなど、これまでに、多くの高等生物のゲノムDNAの塩基配列が解読され、現在はゲノム解読の次の段階「ポストゲノム時代」に突入している。今後、バイオテクノロジーの現場では、取り扱うDNAの大きさがプラスミドサイズからゲノムサイズへと変化し、それに伴い、ゲノムDNAをマニピュレートする機会は、確実に増すものと予想される。しかし、天然の制限酵素を用いる現在の技術では、プラスミドレベルの短いDNAを取り扱うことができるものの、高等生物のゲノムDNAに代表される巨大DNAを自在にマニピュレートすることは困難を極める。それは、天然の制限酵素にみられる以下の二つの欠点による。

(1) 認識配列が制限されてしまう

現状のバイオテクノロジーで一般的に用いられているのは、DNA中の4-8塩基対からなるパリンドローム配列を認識し、切断するII型制限酵素である。代表的なII型制限酵素である*EcoRI*を例にとると、この酵素はGAATTCという6塩基対のパリンドローム配列を認識して切断する。しかし、遺伝子操作で切断したい部位にこのGAATTCという認識配列が存在しない場合には、この制限酵素を利用できない。つまり、切断したい部位を切断できるかどうかは、その配列を認識する制限酵素が手に入るかどうか依存してしまう。そこで、バイオテクノロジーの現場では、目的に合致した制限酵素を探すわけであるが、必ずしも必要な制限酵素が見つかるとは限らない。

(2) 大きなDNAを所定位置で選択的に切断することができない

DNAはA, T, G, Cという4種類の塩基からなるため、先に述べた*EcoRI*の6塩基の認識配列(GAATTC)は、 $4^6 = 4096$ 塩基に1回という確率で現れる。したがって、プラスミドDNA(4000塩基対程度の大きさ)を*EcoRI*で処理した場合には、認識配列は4096塩基に1回しか現れないのだから、一箇所でのこのプラスミドを切断できる。ところが、例えば、30億塩基対という巨大なヒトゲノムDNA中には*EcoRI*の認識配列が、 $30 \text{ 億} \div 4096 \approx 70 \text{ 万}$ 箇所も存在することになる。そのため、ヒトゲノムを*EcoRI*で処理すれば、無数の切断断片が生じてしまう。このように6塩基認識の*EcoRI*では、ヒトゲノムはおろか、460万塩基対からなる大腸菌ゲノムでさえも一箇所での切断することはできない。つまり、天然の制限酵素では、認識配列が短いために、巨大DNAを望みの位置のみで切断することは不可能である。

以上、二つの欠点のために、現在、巨大DNAを切断対象とした遺伝子操作は困難を極めている。したがって、今後のバイオテクノロジーの更なる発展には、高等生物の遺伝子操作に対応可能な、人工制限酵素の開発が必須となる。

近年、天然の制限酵素にみられる上記二つの欠点を克服する人工制限酵素 ARCUT (Artificial Restriction DNA CUTter)が、Komiyama らによって開発された。この ARCUT は、二本鎖 DNA 中の特定配列を、ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid; PNA)のインベージョンを用いて認識し、その部位を DNA 加水分解触媒である Ce(IV)/EDTA 錯体により切断する。配列認識に用いる PNA は、純然たる合成核酸であるために、配列・長さを自在に設計できる。そのため、天然の制限酵素とは異なり、切断配列を任意に選択することができる。さらに、取り扱う DNA の大きさが大きいのであれば、PNA の長さを長くすることで、切断の位置特異性を高めることができる。このように ARCUT は、天然の制限酵素では実現不可能な特徴をもつために、ポストゲノム時代を迎えた現在のバイオテクノロジーにおいて、非常に強力な人工ツールになりうる。

今後 ARCUT に求められるのは、時代のニーズに応じて、ヒトゲノムをはじめとする巨大なゲノム DNA を、位置選択的に切断することである。過去の研究では、およそ 460 万塩基対からなる大腸菌のゲノム DNA を ARCUT により切断することに成功しており、巨大 DNA 切断のツールとしての有用性が示された。しかし、ARCUT が巨大なゲノム DNA 中に必然的に存在する類似配列を識別して、望みの配列のみを設計通りに切断できるかどうかは、全く検討されていない。

そこで本研究では ARCUT が類似配列を識別し、目的配列のみを位置選択的に切断できるか詳細に検討する。さらに、目的配列の認識における作用機構についても併せて検討し、ARCUT における配列認識を支配する要因を明らかにする。仮に ARCUT が、一塩基対の違いを厳密に識別し、16 塩基程度の配列を認識するツールであれば、ARCUT の認識配列は $4^{16}(= 4.3 \times 10^9)$ 塩基に一度、現れることになり、高い位置特異性が実現する。この特異性の高さは Figure 1-1 に示すように、イネをはじめ、30 億塩基対からなるヒトゲノムでさえも十分に ARCUT で切断できることを意味する。そこで本章では、本研究を進めるにあたり必要となる背景について述べる。

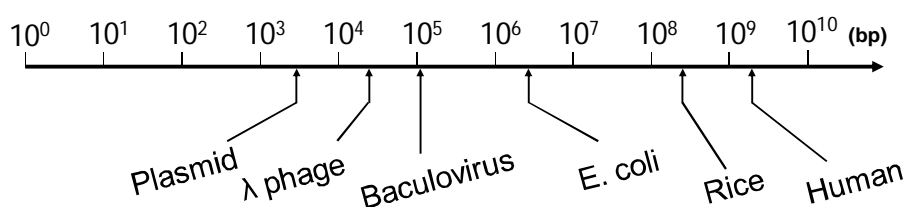


Figure 1-1. The size of genomic DNA s of various organisms.

第2節 研究背景

2-1 核酸の構造と生化学的意義

DNA、RNA は糖、リン酸骨格をもち、アデニン(A)、チミン(T)(RNA の場合では、ウラシル(U))、グアニン(G)、シトシン(C)という4種類の核酸塩基からなる生体高分子である(Figure 1-2)。これら核酸塩基が、A は T(U)と、G は C と水素結合により相補的な塩基対を形成するのに加え、スタッキング相互作用が効果的に働くことで、核酸は、秩序立った二重らせん構造をとることができる。また、二重らせん構造をとることで、大きさの異なる二つのグループがつくられ、生体分子との結合に利用される。

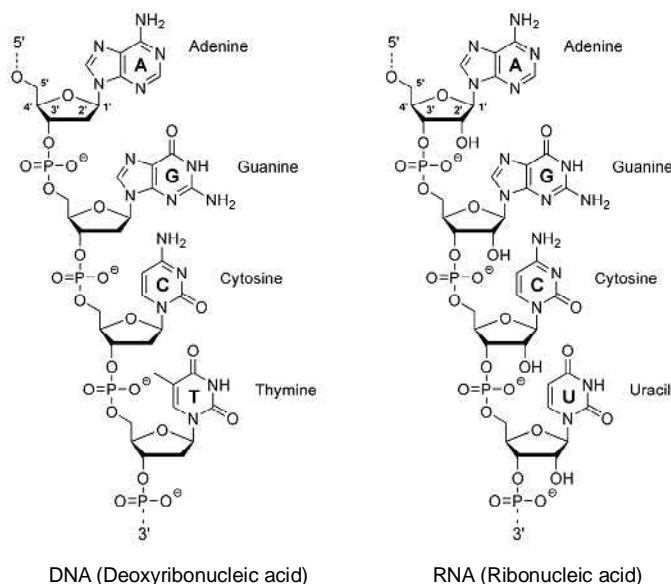


Figure 1-2. Structures of DNA and RNA.

セントラルドグマに従い DNA ならびに RNA は、それぞれ、遺伝情報のマスターテープおよび、一時的な記録媒体として機能している。したがって、遺伝情報の担い手である DNA には、生体内で極めて安定に存在することが求められる一方で、RNA には遺伝情報の伝達が終わり次第、容易に分解されることが求められる。そのために、DNA とは異なり、RNA の 2' 位にはヒドロキシル基が存在し、RNA の加水分解において非常に重要な役割を担っている。実際 RNA は DNA に比べ、1 万倍以上も加水分解されやすく、遺伝情報の一時的なメモリーとしての機能を十分に果たしている。それに対し、遺伝情報の保存を担う DNA の安定性は、極めて高く、酵素非存在下での DNA リン酸ジエステル結合の半減期は、約 2 億年と見積もられている。この極めて高い安定性により DNA は、遺伝情報の担い手としての機能を十分に果たすことができる。

2-2 DNA の切断ならびに Ce(IV)イオンによる DNA の加水分解

生体内で、生命活動の主役を担うのはタンパク質であるが、その構造と機能に関する情報は、全て DNA に書き込まれている。したがって DNA 中の遺伝情報を自在に操作できれば、遺伝子工学や分子生物学をはじめ、工学、医学、薬学といった様々な分野の発展につながる。そこで重要となるのが、DNA を望みの位置で切断する技術の開発である。従来 DNA の切断は、天然の制限酵素を利用することで行われてきた。しかし、天然の制限酵素では、先にも述べたように、巨大なゲノム DNA を任意の配列のみで切断できない。そのため、認識配列・長さを自在にチューニングできる人工制限酵素が不可欠となる。

DNA を非酵素的に切断するための方法としては Dervan らの報告にあるように、酸化的手法が用いられてきた。例えば Fe(II)/EDTA 錯体が生成する OH ラジカルを利用すれば、糖鎖を酸化的に切断できる^{1), 2)}。しかし、この方法では、反応活性種のラジカルの拡散により、切断箇所が複数に及ぶ。さらには、リボースが 1 ユニット欠損するのに加え、切断断片の末端が 3'-phosphoglycolate となるため切断断片を酵素処理できないといった問題点がある。したがって、バイオテクノロジー等への応用を視野に入れると、DNA を加水分解によって切断可能な人工制限酵素の開発が不可欠となる。

1990 年代はじめ頃まで、極めて安定な DNA のリン酸ジエステル結合を、非酵素的な手法を用いて加水分解により切断することは不可能とされてきた。ところが 1992 年になり、DNA を加水分解する触媒分子が Komiyama らによって見出される。Komiyama らは Ce(III)Cl₃ の水溶液中で DNA が効率よく加水分解されることを報告し^{3), 4)}、さらに Ce(III)Cl₃ の水溶液中に存在する Ce(IV)イオンが反応の活性種であることを見出した^{5), 6)}。Ce(IV)(NH₄)₂(NO₃)₆ 存在下、pH7、50 °C でのチミジリル(3'-5')チミジン(TpT)の加水分解反応の半減期はわずか 3.6 時間であり、その加速効果は 10¹¹ 倍にも及ぶ。この研究成果が発端となり、世界中の研究者が、様々な金属イオンを用いて DNA を加水分解する研究に取り組んだが、今もなお、人工制限酵素を構築するに足る速度で DNA を加水分解できる触媒は Ce(IV)イオンに限られる⁷⁾⁻⁹⁾。

Ce(IV)イオンによる DNA 加水分解の推定機構を Figure 1-3 に示す。まず、Ce(IV)イオンが DNA のリン酸ジエステルに作用してリン原子上の電子密度を下げる。それにより求核攻撃されやすくなり Ce(IV)イオン上の脱水素した配位水を求核剤として提供し、5 配位中間体を生成する。その後、別の配位水が酸触媒として働いて脱離反応を促進する。以上のような経路により Ce(IV)イオンは DNA のリン酸ジエステルを加水分解すると考えられている。

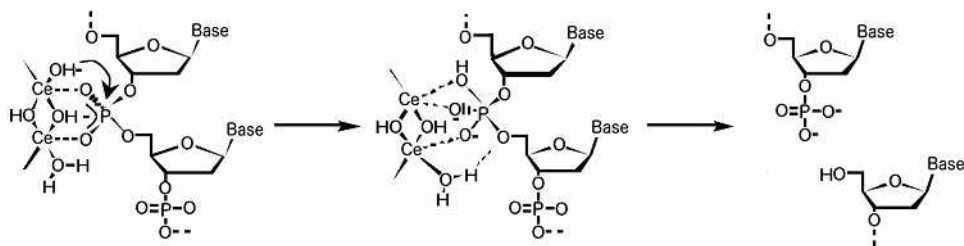


Figure 1-3. Mechanism of the hydrolysis of DNA by Ce(IV) ion.

Ce(IV)イオンは、高い DNA 切断活性を示す一方で、生理条件下で水酸化物のゲル状沈殿を生じるという問題点をもつ。そのため、Ce(IV)イオンのみを人工制限酵素の活性中心として用いることは困難といえる。この問題点を解決するには、生理条件下での Ce(IV)イオンにおけるゲル化を防ぎ、均一系を実現する必要がある。そこで、様々な配位子を用いて Ce(IV)を錯体化する試みが行われた。その結果、Ce(IV)とエチレンジアミン四酢酸(EDTA)とを 1 : 1 で錯形成させた場合、生理条件下でも水酸化物ゲルを生成することなく、非常に大きな DNA 加水分解活性を保持することが明らかになった¹⁰⁾。さらに、Ce(IV)/EDTA 錯体は、二本鎖 DNA よりも一本鎖 DNA を極めて迅速に加水分解するという、非常に興味深い基質特異性をもつ¹¹⁾。この特徴を利用すれば、一本鎖 DNA を位置選択的に切断することができる (Figure 1-4)。

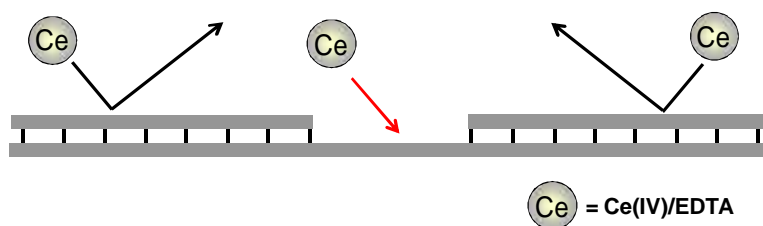


Figure 1-4. The site-selective scission of single strand DNA by Ce(IV)/EDTA.

まず、切断したい部位が一本鎖構造になるように、二本の DNA を加え、基質 DNA と二本鎖を形成させる。ここに Ce(IV)/EDTA 錯体を作用させると、二本鎖部位では切断が起こらずに、一本鎖部位のみが迅速に加水分解される。その結果、Ce(IV)/EDTA 錯体により一本鎖 DNA を位置選択的に切断することができる。この際、添加する DNA の末端を化学修飾することで、切断活性を向上させることができる¹²⁾⁻¹⁴⁾。また、この切断手法は、一本鎖 DNA を対象とした遺伝子操作に用いることができ、GFP 遺伝子を BFP 遺伝子へ変換することに成功した研究が過去に報告されている¹⁵⁾。

2-3 ペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid; PNA)

Ce(IV)/EDTA 錯体を用いれば、一本鎖 DNA を位置選択的に切断できる。この手法を応用し、二本鎖 DNA を切断するには、二本鎖 DNA 中の任意の切断配列を認識するとともに、Ce(IV)/EDTA 錯体で切断可能な一本鎖構造を誘起する必要が生じる。これまで、DNA の塩基配列を認識する数

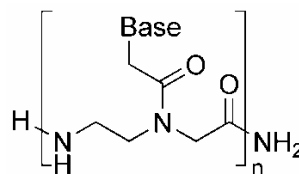


Figure 1-5. The structure of peptide nucleic acid (PNA).

多くの人工分子・人工核酸が開発されてきた¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。その中でも、DNA 二重らせん構造をほどこき、しかも、その構造を変化させる人工核酸としてペプチド核酸(Peptide Nucleic Acid; PNA)に注目が集まっている¹⁹⁾⁻²¹⁾。PNA は Figure 1-5 に示すように、ペプチド結合で連結された主鎖に核酸塩基が結合した合成核酸であり、Nielsen らによって開発された。通常の DNA と同様に、Watson-Crick 塩基対形成によって相補的な DNA、RNA ならびに PNA と二本鎖を形成する^{22), 23)}。とりわけ重要な点は、主鎖である *N*-2-アミノエチルグリシン骨格が電荷をもたないために、核酸との二本鎖形成において、静電反発を生じない点である。そのために PNA/DNA、PNA/RNA 二本鎖は対応する DNA/DNA、DNA/RNA 二本鎖よりもはるかに安定となる。次項に示す“インベージョン”が起こるのも、基本的には、この PNA/DNA 二本鎖の安定性に起因する。

2-4 PNA のインベージョン

二本鎖 DNA の特定配列と相補的な PNA を DNA に加える。すると、それまでは互いに二本鎖を組んでいた DNA 同士の塩基対が解離し、代わりに PNA と DNA との間に相補的な塩基対が形成される。その結果、PNA は二本鎖 DNA 中に侵入(インベージョン)する。このインベージョンには、Figure 1-6 に示すように 3 つのタイプが知られる^{24), 25)}。

例えば、ホモピリミジン配列をもつ PNA と、これと相補的なホモプリン配列を持つ二本鎖 DNA とを混合すると triplex インベージョンが起こる(Figure 1-6a)。この場合

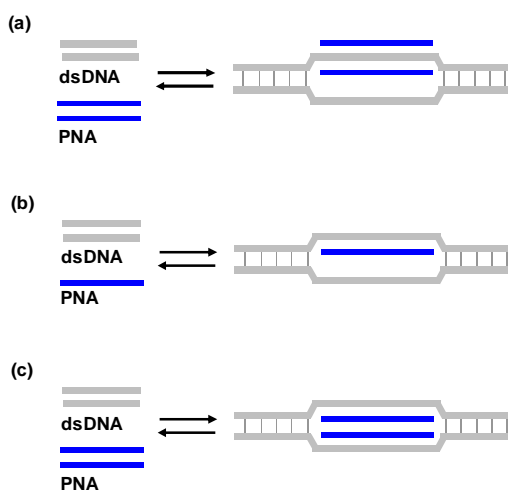


Figure 1-6. Structure of helix invasion complexes. (a) Triplex invasion complex: structure of homopyrimidine PNAs bound to a dsDNA target. The two PNA strands clamp onto the complementary DNA strand leaving the noncomplementary DNA strand displaced as a loop. (b) Duplex invasion complex: one PNA strand invades the DNA helix forming Watson-Crick hydrogen bonds, thus leaving the noncomplementary DNA strand displaced. (c) Double-duplex invasion complex: two PNAs bound to a cognate sequence target in dsDNA. Each PNA strand binds by Watson-Crick base pairing, thus occupying both target DNA strands.

には、二本の PNA は通常の DNA 三重らせんと同様に、Watson-Crick 塩基対と Hoogsteen 塩基対とで三重鎖を形成する。また、配列によっては、一本鎖の PNA が二本鎖 DNA へ直接インベージョンすることが報告されている(Figure 1-6b)。このタイプを duplex インベージョンと呼ぶ。当初 Duplex インベージョンは、ホモプリン配列をもつ PNA を用いて、二本鎖 DNA 中の相補的なホモピリミジン配列を Watson-Crick 塩基対形成により認識するものに限られていた^{26), 27)}。そこで、正電荷を導入した PNA を利用するなどして、認識配列の制限を取り除くための研究が、精力的に進められている^{28), 29)}。

2-5 pseudo-complementary PNA(pcPNA)の開発と double-duplex インベージョン

Figure 1-6c に示すように二本鎖 DNA に二本の PNA が侵入するタイプを double-duplex インベージョンという。この場合には、相当に広範な塩基配列を認識することができる。しかし、Figure 1-6c のように、二本の PNA をインベージョンさせるためには、一つの大きな問題点が存在する。二本鎖 DNA を二本の PNA で認識するということは、二本の PNA 同士は、必然的に、互いに相補的な塩基配列を持つことになる。そのため、天然の核酸塩基を結合した通常の PNA を用いると、インベージョン複合体中に生じる PNA/DNA 二本鎖よりも、安定な PNA/PNA 二本鎖が優先的に形成され、インベージョンは熱力学的に不利な過程となってしまう。この問題を解決し、効率的なインベージョンを実現するためには、DNA との結合能を保持したままで、PNA/PNA 二本鎖の形成を抑制するような分子設計が必要となる。そこで、開発された人工核酸が Figure 1-7 に示す“pseudo-complementary PNA (pcPNA)”である³⁰⁾。pcPNA では、核酸塩基として天然型の A と T の代わりにそれぞれ 2-6-ジアミノ

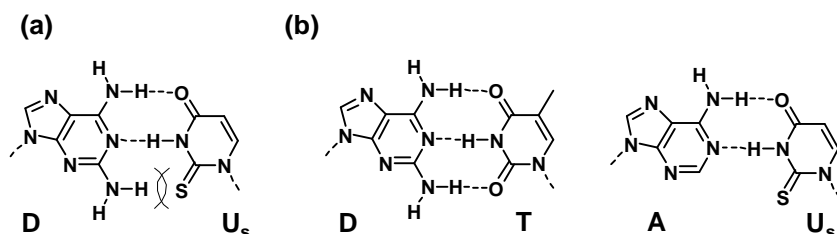


Figure 1-7. Principle of base interactions in double-duplex invasion complexes. pcPNAs have diaminopurine (D) and thiouracil (U_s) substituted for adenine and thymine, respectively. The atomic radii of the D exocyclic amino group and 2-thio group of U_s inhibit D- U_s hydrogen bonding, thereby reducing self-annealing of pcPNAs. In contrast, D-T and A- U_s hybridization is not subject to such constraints, which facilitates hybridization to complementary DNA targets.

プリン(D)と 2-チオウラシル(U_s)を用いることで、pcPNA 同士の二本鎖形成が抑制される。なぜなら、D と U_s 間の塩基対形成は D の 2 位に導入されたアミノ基と、 U_s の 2 位の原子半径の大きな硫黄原子とが立体的な障害となり塩基対形成が妨げられるからである (Figure 1-7a)。その一方で、D と U_s は、天然の核酸塩基とそれぞれ D-T 塩基対、A- U_s 塩基対を形成することができるため、二本の pcPNA はそれぞれ相補的な DNA と安定な二本鎖を形成することができる(Figure 1-7b)。したがって、二本鎖 DNA に二本の pcPNA を加えると、DNA/DNA 二本鎖が部分的に解離して、二組の pcPNA/DNA 二本鎖が形成されるため、効率

的なインベージョンが実現する。他のインベージョンのタイプと比較すると、double-duplex インベージョンでは、適用可能な塩基配列の制限が少ない。しかし、pcPNA 同士の二本鎖形成を抑制するためには、pcPNA 二本鎖中に D/U_s 塩基対が 40%以上含まれる必要がある。これは A/T 塩基対が 40%以上含まれる配列でなければ、double-duplex インベージョンにより認識できないことを意味する。すなわち G-C rich な塩基配列を、double-duplex インベージョンで認識することはできない。現在、この塩基配列の制限を取り除くための研究が進められている³¹⁾。

2-6 インベージョンによる構造変化とその応用

インベージョンを用いれば、二本鎖 DNA 中の特定部位の構造だけを変化させることができる。例えば Frank-Kamenetskii らの研究グループはインベージョンを用いて二本鎖 DNA 中に一本鎖構造を誘起し、特定配列を検出することに成功している (Figure 1-8)^{32), 33)}。ここでは PNA のインベージョンにより生じる一本鎖 DNA 配列を Molecular beacon で検出する。この系では、アニーリングといった操作を全く必要としない。つまり、PNA ならびに蛍光プローブを単に DNA と混合するだけで、特定配

列を検出できる。このように、インベージョンでは、二本鎖 DNA 中の特定部位の構造だけを変化させることができるため、RNA ポリメラーゼをはじめとする生体分子と DNA との相互作用を制御することも可能である³⁴⁾⁻³⁶⁾。今後、インベージョン効率が向上し、より広範な塩基配列を認識できるようになれば、更なる応用研究につながるだろう。

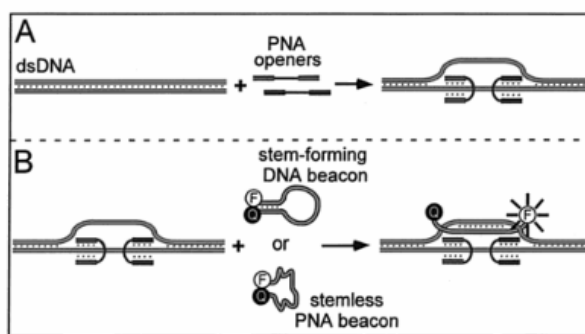


Figure 1-8. Schematics of the procedure for hybridization of molecular beacons to dsDNA. (A) Duplex DNA is pre-opened at an internal site by a pair of PNA openers hence exposing the target sequence located on the displaced DNA strand for binding the DNA and PNA beacons. (B) Binding of molecular beacons to the thus exposed dsDNA target sequence yields a fluorescence response due to spatial separation of fluorophore (F) and quencher (Q) within unfolded hybridization probes.

2-7 Ce(IV)/EDTA とインベージョンとを併用した人工制限酵素 ARCUT の開発

2-2 で述べたように、Ce(IV)/EDTA 錯体は、二本鎖 DNA よりも、一本鎖 DNA を選択的に加水分解するという興味深い基質特異性を示す。したがって、二本鎖 DNA 中の望みの部位を一本鎖構造にできれば、Ce(IV)/EDTA 錯体により、その部位のみを選択的に切断できる。そこで Komiyama らは、pcPNA の double-duplex インベージョンと Ce(IV)/EDTA 錯体とを併用することで、二本鎖 DNA を位置選択的に切断可能な人工制限酵素 (Artificial Restriction DNA CUTter; ARCUT) の開発に成功した^{37), 38)}。

ARCUT の基本戦略を Figure 1-9 に示す。まず、二本鎖 DNA 中の切断したい部位に、二本の pcPNA をインベージョンさせる。この際、二本の pcPNA が互いに数塩基だけ横にずれるように pcPNA の配列を設計することで、二本鎖 DNA 中に一本鎖構造を形成させる。次に Ce(IV)/EDTA 錯体を作用させると、インベージョンにより誘起された一本鎖部位のみが選択的に加水分解され、二本鎖 DNA の位置選択的切断が実現する。

ARCUT は、天然の制限酵素の欠点を補完する特徴をもつ。まず DNA 中の切断配列の認識に用いる pcPNA は合成核酸であるため、長さ・配列を自在に設計できる。つまり pcPNA の配列を目的に応じて設計することで、天然の制限酵素とは異なり、切断配列を自在に選ぶことができる。さらに pcPNA の長さを長くすれば、切断の特異性もそれだけ高まり、天然の制限酵素では取り扱うことが難しい、巨大 DNA でさえも位置選択的に切断できる。ARCUT による DNA 切断が加水分解により進行する点も、極めて大きな特徴といえる。というのも、これにより、市販されている DNA リガーゼを用いれば ARCUT 切断断片と、外来 DNA 断片とを連結できるためである。このように ARCUT は、現在のバイオテクノロジーとのマッチングが極めて良好な人工ツールであるといえる。

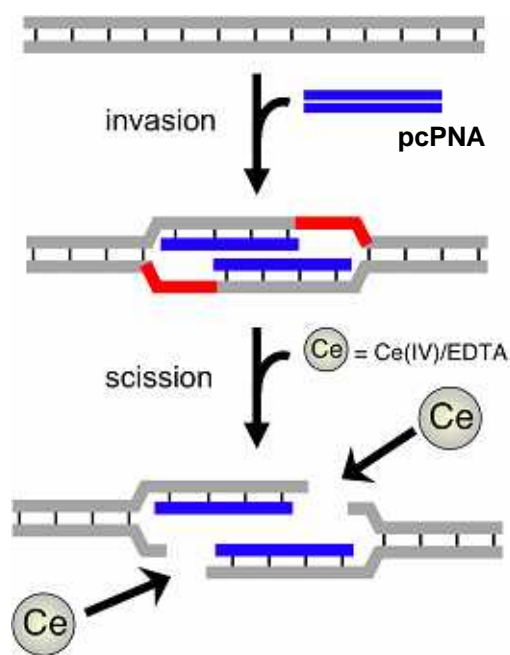


Figure 1-9. Scheme of site-selective DNA scission by ARCUT. Single-stranded portions, formed by the invasion of two pcPNA strands to DNA substrate, are hydrolyzed by Ce(IV)/EDTA

2-8 ARCUT による DNA 切断ならびに過去の応用研究

ARCUT を利用した二本鎖 DNA 切断、遺伝子組み換えに等に関しては、現在、精力的に研究が進められている。ここでは、これまでの研究成果についていくつか述べる。

2-8-1 ARCUT による二本鎖 DNA の位置選択的切断

Figure 1-10 に、ARCUT を用いて二本鎖 DNA を位置選択的に切断した例を示す^{39), 40)}。基質は一般的なプラスミド DNA である pBR322 (4361 塩基対)を、*EcoRI* で切断して直鎖状にしたものを用いた。この直鎖状 DNA の末端から約 1830 塩基対付近をターゲットとして ARCUT を設計した(Figure 1-10a)。基質 DNA が位置選択的に切断されると、それぞれ、約 1830 塩基対及び、2530 塩基対からなる切断断片が生じる。

反応後の泳動図を Figure 1-10b に示す。まず、pcPNA を加えずに Ce(IV)/EDTA 錯

体のみを加えた lane 2 では、基質 DNA 中に一本鎖構造が誘起されていないために、Ce(IV)/EDTA 錯体による切断は起こらない。これに対し、Figure 1-9 に示すスキームにしたがって、二本の pcPNA と Ce(IV)/EDTA 錯体を加えた lane 4 では、目的の長さに相当する二本の切断断片が生成する。この結果は、ARCUT により二本鎖 DNA を位置選択的に切断できることを明確に示す。

Figure 1 - 10c に示すホスホセリンを pcPNA の末端に導入することで、DNA の切断効率を向上させることができる。実際に、ホスホセリンを導入した pcPNA を用いた lane 3 では、Ce(IV)/EDTA 錯体による DNA 切断の効率が飛躍的に向上している。これは pcPNA に導入されたリン酸基により、Ce(IV)/EDTA 錯体が切断部位近傍に効果的に濃縮されたためである。このようにして切断活性を向上させた ARCUT では、50 °C、20 時間の反応で切断断片の収率は 50 ~ 60% に達する。切断活性の更なる向上が望ましいことは言うまでもないが、現状でも種々の遺伝子操作には十分な切断活性といえる。

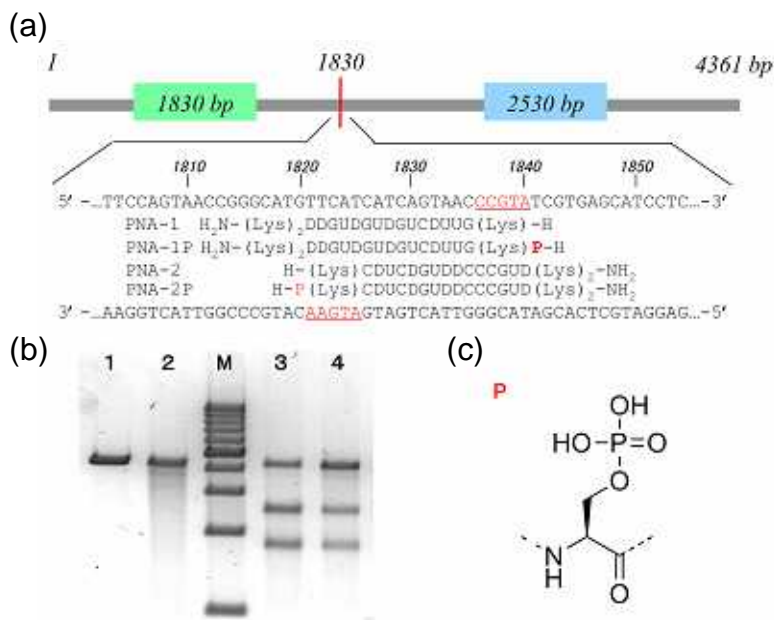


Figure 1-10. (a) DNA substrate and PNA additives used for site-selective DNA scission by Ce(IV)/EDTA. (b) Agarose gel electrophoresis pattern for site-selective scission of linearized pBR322 DNA by Ce(IV)/EDTA. Lane 1, DNA only (without Ce(IV)/EDTA); lane 2, Ce(IV)/EDTA only (without PNA additives). lane 3, PNA1P/PNA2P + Ce(IV)/EDTA; lane 4 PNA1/PNA2 + Ce(IV)/EDTA. (c) The structure of L-phosphoserine (P).

2-8-2 融合タンパク質の調製

融合タンパクの調製には、組み換えを行う際、上流に来る遺伝子を終止コドンの直前で切断することが必要になるが、必ずしも終止コドン直前を切断可能な天然の制限酵素が存在するとは限らない。しかし、そのような場合であっても ARCUT を用いれば、遺伝子操作を行うことができる。

2006 年に PCR を一切用いずに、WWOX(WW domain-containing oxidoreductase) と EGFP(enhanced green fluorescent protein)との融合タンパク質の調製に成功した研究成果が発表された⁴¹⁾。概要を Figure 1-11a に示す。まず、WWOX 遺伝子の終止コドン直前を ARCUT により切断する。この際、終止コドン直前を切断できる天然の制限酵素は存在しない。次に、*EcoRI* により WWOX 遺伝子の開始コドン上流を切断し、終止コドンをもたない WWOX 遺伝子を切り出す。また、ベクター側は EGFP 遺伝子上流を二種類の制限酵素、*EcoRI*、*BamHI* により切断しておき、ここに、先に切り出した WWOX 遺伝子を組み込めば、望みの発現ベクターを調製できる。この際、二つの切断断片に相補的な joint DNA を用いることで、リーディングフレームを適切に調節できるため、フレームシフトは起こらない(Figure 1-11b)。

この発現ベクターを哺乳動物細胞内に導入したところ、Figure 1-11c に示すように、キメラタンパク質が正しく発現し、EGFP による緑色蛍光が観測された。これらの結果から、Ce(IV)/EDTA および pcPNA という非天然分子から構成される ARCUT を用いた一連の操作でも、DNA は格別な損傷を受けることなく、目的の機能をもつ組み換え遺伝子を調製できることが実証された。

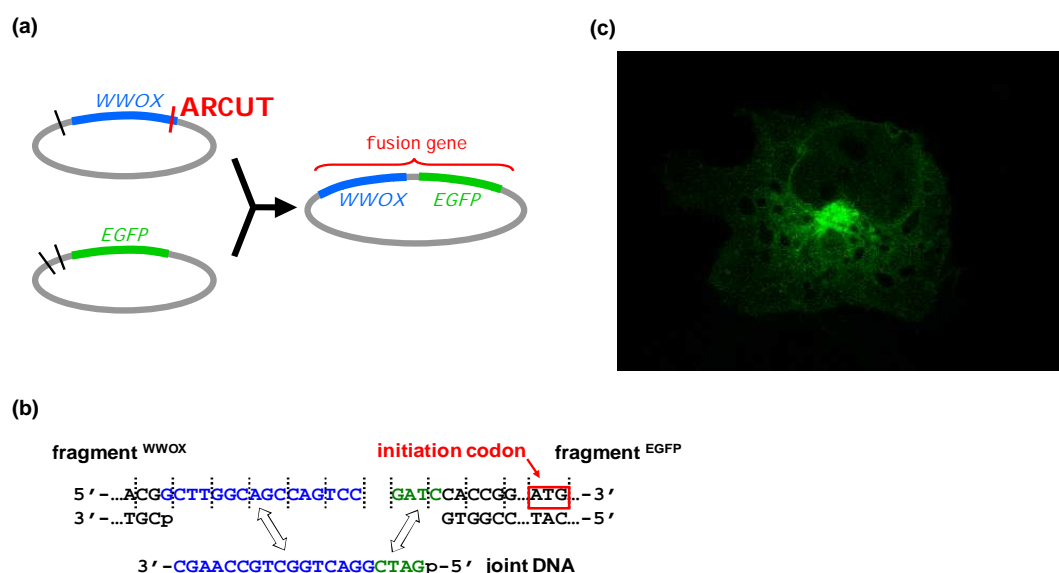


Figure 1-11. (a) Outline of the construction of fusion protein by using ARCUT. (b) Procedure for ligation of the the fragment^{WWOX} and the fragment^{EGFP}. In order to ligate these two fragments, short joint DNA is used. (c) Subcellular localization of WWOX-EGFP protein in Cos-7 cells. Focal fluorescence around the nucleic indicates localization of WWOX-EGFP protein in the Golgi apparatus.

2-8-3 ゲノム DNA の位置選択的切断

ARCUT では pcPNA の長さを長くすることで、高い位置特異性を実現できるため、天然の制限酵素では取り扱うことが困難な巨大 DNA でさえも切断の対象となる^{40), 42)}。実際に巨大 DNA 切断の一例として、大腸菌のゲノム DNA (460 万塩基対) を ARCUT により切断した結果が 2007 年に報告された (Figure 1-12)⁴⁰⁾。ここでは、3,510 Mbp 付近にある *dam* 遺伝子の下流を切断部位としている。このとき、切断断片が大きすぎるために、通常のアガロース電気泳動では切断部位を厳密に特定することは困難である。そこで、ARCUT の切断部位から 4,000 bp 離れた位置に存在する *Pst* I の制限酵素サイトを利用し、解析が行われた。ARCUT による切断が設定した部位で起これば、*Pst* I による切断の後には、*dam* 遺伝子を含む 4,000 bp の断片が得られる。*dam* 遺伝子をターゲットとするサザンブロッティングによって検出した結果、設計通りに 4,000 bp のバンドが生成することが確認された。すなわち、ARCUT は、大腸菌ゲノムのように巨大な DNA でも所定の部位で正確に切断する。こうして、DNA サイズの壁を越えるニューツールとしての ARCUT の有用性が確認された。

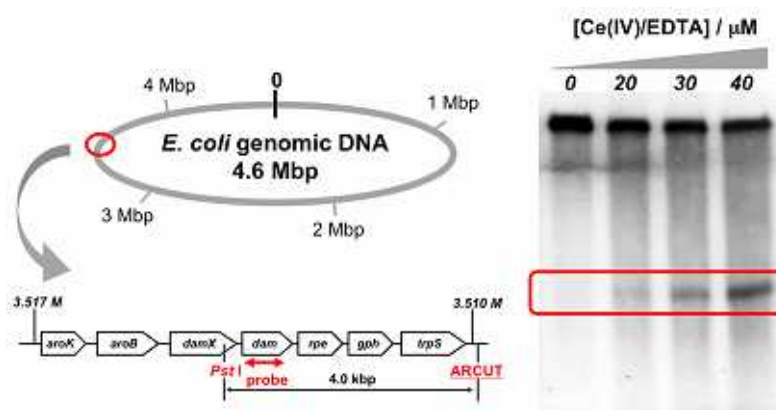


Figure 1-12. The site selective scission of *E.coli* genomic DNA by ARCUT.

この他にも、切断断片のリゲーションを簡便化することに成功した研究等が報告されるなど^{43), 44)}、精力的に研究が進められている。

第3節 研究目的

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 により切断することに成功しており、巨大 DNA 切断のツールとしての ARCUT の有用性が示された。しかし、ARCUT が類似配列を識別し、望みの配列のみを切断できるかどうかについては、詳細に検討されていない。すなわち、巨大 DNA 中に必然的に存在する類似配列、とりわけ、目的の切断配列と一塩基対のみ異なる類似配列を ARCUT が厳密に識別できるかは、全くのブラックボックスである。

そこで本研究では ARCUT が類似配列を識別し、望みの配列のみを切断できるか詳細に検討する。また ARCUT による切断配列認識の機構を明らかにし、現状の ARCUT で厳密に認識可能な塩基配列の長さを検討する。これらの知見は、非常に基礎的でありながら、今後 ARCUT を用いて現状の技術では困難な巨大 DNA のマニピュレーションを実現するためには必要不可欠な知見であるため、本研究は、大きな意味をもつ。

第 1 章 参考文献・脚注

- 1) P. B. Dervan, *Science*, **232**, 464 (1986).
- 2) H. E. Moser, and P. B. Dervan, *Science*, **238**, 645 (1987).
- 3) Y. Matsumoto and M. Komiyama, *Chem. Express*, **7**, 785 (1992).
- 4) M. Komiyama, K. Matsumura, K. Yonezawa, and Y. Matsumoto, *Chem. Express*, **8**, 85 (1993).
- 5) N. Takeda, T. Imai, M. Irisawa, J. Sumaoka, M. Yashiro, H. Shigekawa, and M. Komiyama, *Chem. Lett.*, 599 (1996).
- 6) J. Sumaoka, N. Takeda, Y. Okada, H. Takahashi, H. Shigekawa, and M. Komiyama, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **39**, 137 (1998).
- 7) M. Komiyama, and J. Sumaoka, *Cur. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 751 (1998).
- 8) C. Liu, M. Wang, T. Zhang, and H. Sun, *Coord. Chem. Rev.*, **248**, 147 (2004).
- 9) F. Mancin, P. Scrimin, P. Tecilla, and U. Tonellato, *Chem. Commun.*, 2540 (2005).
- 10) T. Igawa, J. Sumaoka, and M. Komiyama, *Chem. Lett.*, 356 (2000).
- 11) Y. Kitamura and M. Komiyama, *Nucleic Acids Res.*, **30**, e102 (2002).
- 12) M. Komiyama, H. Arishima, M. Yokoyama, Y. Kitamura, and Y. Yamamoto, *ChemBioChem*, **6**, 192 (2005).
- 13) W. Chen, Y. Kitamura, J. -M. Zhou, J. Sumaoka, and M. Komiyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 10285 (2004).
- 14) T. Lönnberg, Y. Suzuki, and M. Komiyama, *Org. Biomol. Chem.*, **6**, 3580 (2008).
- 15) Y. Kitamura, S. Mori, W. Chen, J. Sumaoka, and M. Komiyama, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **11**, 13 (2006).
- 16) P. B. Dervan, and B. S. Edelson, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 284 (2003).
- 17) P. P. Chan, and P. M. Glazer, *J. Mol. Med.* **75**, 267 (1997).
- 18) H. Kaur, B. R. Babu, and S. Maiti, *Chem. Rev.*, **107**, 4672 (2007).
- 19) P. E. Nielsen, M. Egholm, R. H. Berg and O. Buchardt, *Science*, **254**, 1497 (1991).
- 20) M. Egholm, O. Buchardt, P. E. Nielsen and R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 1895 (1992).
- 21) M. Egholm, P. E. Nielsen, O. Buchardt and R. H. Berg, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 9677 (1992).
- 22) M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Nordén, and P. E. Nielsen, *Nature*, **365**, 566 (1993).
- 23) P. Wittung, P. E. Nielsen, O. Buchardt, M. Egholm, and B. Norden, *Nature*, **368**, 561 (1994).
- 24) P. E. Nielsen, *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**, 16 (2001).
- 25) V. V. Demidov, and M. D. Frank-Kamenetskii, *Trends Biochem. Sci.*, **29**, 62 (2004).
- 26) P. E. Nielsen, and L. Christensen, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 2287 (1996).
- 27) G. Haaima, H. F. Hansen, L. Christensen, O. Dahl, and P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4639 (1997).
- 28) X. Zhang, T. Ishihara and D. R. Corey, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 3332 (2000).

- 29) S. Rapireddy, G. He, S. Roy, B. A. Armitage, and D. H. Ly, *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 15596 (2007).
- 30) J. Lohse, O. Dahl, and P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11804 (1999).
- 31) T. Ishizuka, J. Yoshida, Y. Yamamoto, J. Sumaoka, T. Tedeschi, R. Corradini, S. Sforza, and M. Komiyama, *Nucleic Acids Res.*, **36**, 1464 (2008).
- 32) N. O. Bukanov, V. V. Demidov, P. E. Nielsen, and M. D. Frank-Kamenetskii, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 5516 (1998).
- 33) H. Kuhn, V. V. Demidov, J. M. Coull, M. J. Fiandaca, B. D. Gildea, and M. D. Frank-Kamenetskii, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 1097 (2002).
- 34) K. I. Izvolsky, V. V. Demidov, P. E. Nielsen, and M. D. Frank-Kamenetskii, *Biochemistry*, **39**, 10908 (2000).
- 35) E. Protozanova, V. V. Demidov, P. E. Nielsen, and M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3929 (2003).
- 36) A. G. Veselkov, V. V. Demidov, P. E. Nielsen, and M. D. Frank-Kamenetskii, *Nucleic Acids Res.*, **24**, 2483 (1996).
- 37) M. Komiyama, Y. Aiba, T. Ishizuka, and J. Sumaoka, *Nat. Protoc.*, **3**, 646 (2008).
- 38) M. Komiyama, Y. Aiba, Y. Yamamoto, and J. Sumaoka, *Nat. Protoc.*, **3**, 655 (2008).
- 39) Y. Yamamoto, A. Uehara, T. Tomita, and M. Komiyama, *Nucleic Acids Res.*, **32**, e153 (2004).
- 40) Y. Yamamoto, M. Mori, Y. Aiba, T. Tomita, W. Chen, J-M. Zhou, A. Uehara, Y. Kitamura, and M. Komiyama, *Nucleic Acids Res.*, **35**, e53 (2007).
- 41) Y. Yamamoto, A. Uehara, A. Watanabe, H. Aburatani, and M. Komiyama, *ChemBioChem*, **7**, 673 (2006).
- 42) Y. Yamamoto, K. Miura, and M. Komiyama, *Chem. Lett.*, **35**, 594 (2006).
- 43) K. Tanaka, H. Katada, N. Shigi, A. Kuzuya, and M. Komiyama, *ChemBioChem*, **9**, 2120 (2008).
- 44) Y. Yamamoto, and M. Komiyama, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **48**, 149 (2004).

第2章 ARCUT による DNA 切断におけるミスマッチ認識

第1節 緒言

第1章で述べた過去の知見が示すように、ARCUT を用いれば、二本鎖 DNA を位置選択的に切断することができる。しかし ARCUT による DNA 切断において、切断配列と類似した配列が厳密に識別されるかどうか、詳細に検討されていない。すなわち ARCUT による DNA 切断におけるミスマッチ認識は、現状で、全くのブラックボックスである。

ARCUT のミスマッチ認識能は、確率的に類似配列の出現頻度が低いプラスミドサイズの DNA でなく、頻繁に類似配列が出現するゲノムサイズの DNA を切断する場合に、極めて重要となる。仮に、本来の切断配列と類似した配列を ARCUT が識別できなければ、類似配列が存在するたびに切断が起こってしまい、巨大なゲノム DNA を望みの配列のみで切断することはできない。そこで本章では、ARCUT が望みの切断配列とわずかに塩基対のみ異なる類似配列を厳密に識別できるか、切断反応を行い、詳細に検討する。

第2節 実験概要と方法

2-1 実験概要

切断実験に巨大なゲノム DNA を用いると、結果の解析が困難になる。そこで 408 bp の短い DNA を基質とし、切断実験を行う。ARCUT の切断部位は、基質 DNA の中央部分とした。切断部位近傍、使用した pcPNA の配列を Figure 2-1a に示す。インベージョン複合体形成時には、DNA 中に Ce(IV)/EDTA 錯体で切断可能な 5 塩基の一本鎖構造が生じる¹⁾。

ARCUT による DNA 切断反応のミスマッチ認識を検討するにあたり、切断配列中の一塩基対を別の塩基対に置き換えた DNA を別途調製する。これによりインベージョン複合体形成時には、pcPNA と相補的な DNA 鎖との間に一塩基のミスマッチが導入されることになる。調製した DNA を ARCUT により切断し、結果を非変性のポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析する。

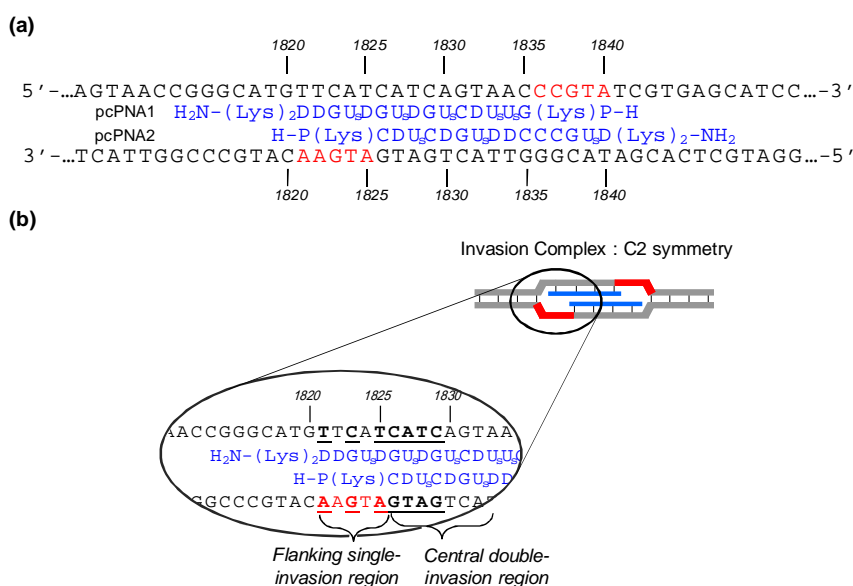


Figure 2-1. (a) The sequence of DNA substrate and pcPNAs used in this study. C1836-A1840 of the upper DNA strand and A1821-A1825 of the lower DNA strand are kept single-stranded. In pcPNA1 and pcPNA2, L-phosphoserine (P) was attached to the N-termini to promote the DNA scission. (b) The position of one base-pair alteration. The position is divided into the following two categories; (i) the central double-invasion region and (ii) the flanking single-invasion region. One base-pair (underlined base-pair) is changed to another base-pair. Note that the invasion complex has a pseudo C2 symmetry, when the difference in sequence is neglected.

なお、実際の実験では、インベージョンする領域を、(i) 二本の pcPNA がインベージョンする領域 (C/G1826-C/G1835) (ii) Gap 形成領域 (T/A1821-T/A1825 及び C/G1836-A/T1840) の二つの領域に分け、それぞれの領域において一塩基対の置換を行う。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慮し、Figure 2-1b に示すように、インベージョン複合体の片側半分の領域から特定の塩基対を選び、置換を行う。

2-2 実験方法

2-2-1 基質 DNA の調製法

ARCUT で使用する pcPNA1/pcPNA2 と完全に相補的な基質 DNA は、プラスミド pBR322 中の 408 bp (T/A1651-T/A2058) を PCR により増幅することで調製した。PCR に用いたプライマーは、5'-TGCACCATTATGTTCCGGATCTG-3', 5'-AAGCTCATCAGCGTGGTCGTG-3' である。なお DNA の精製には、QIAprep Spin Miniprep Kit(Qiagen)を用いた。基質 DNA の全塩基配列を Figure 2-2 に示す。下線部分が、ARCUT の切断配列である。

```
TGCACCATTATGTTCCGGATCTGCATCGCAGGATGCTGCTGGCTACCCCTG
TGAACACCTACATCTGTATTAAACGAAGCGCTGGCATTGACCCTGAGTGA
TTTTTCTCTGGTCCCGCCGCATCCATAACGCCAGTTGTTTACCCTCACAA
CGTTCCAGTAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCAT
CCTCTCTCGTTTCATCGGTATCATTACCCCCATGAACAGAAATCCCCCTT
ACACGGAGGCATCAGTGACCAACAGGAAAAAACCGCCCTTAACATGGCC
CGCTTTATCAGAAGCCAGACATTAACGCTTCTGGAGAAACTCAACGAGCT
GGACGCGGATGAACAGGCAGACATCTGTGAATCGCTTCACGACCACGCTG
ATGAGCTT
```

Figure 2-2. The whole sequence of 408 bp fully-matched DNA substrate. Only one of the strands is shown, and the target site of pcPNA1 (15-base sequence) was underlined.

切断配列の一塩基対を別の塩基対に置換した DNA は、QuikChange[®] site-directed mutagenesis method により mutant pBR322 を別途調製し、上記に示したプライマーを用いて PCR で増幅することで調製した。QuikChange[®] site-directed mutagenesis method の概要を以下に示す(Figure 2-3)。詳細なプロトコールは、参考文献 2 に示す通りである。また mutant pBR322 の同定は、シーケンサーにより、塩基配列を確認することで行った。

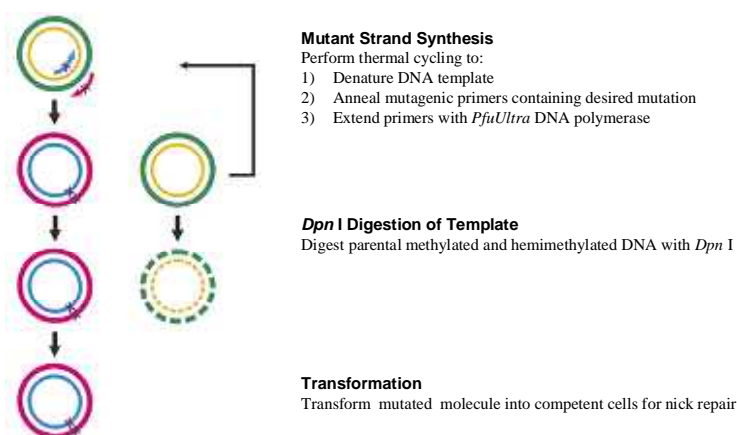


Figure 2-3. Overview of the QuikChange[®] site-directed mutagenesis method. The template dsDNA are shown in green and yellow circle, the primer containing one-base mutation are shown in light blue and purple arrow, and mutant dsDNA are shown in light blue and purple circle.

2-2-2 pcPNA の合成

ARCUT に用いる pcPNA の合成は、標準的な固相合成法である Boc 法により行った。樹脂には MBHA resin を使用し、樹脂の切り出しは Low-High TFMSA 法により行った。合成した pcPNA は、エーテル沈澱による簡易精製を行ったのち、RP-HPLC により精製した。その後 MALDI-TOF-MS(Bruker, AutoFLEX)により、合成した pcPNA の同定を行った(Table 2-1)。なお、PNA 合成の詳細に関しては、参考文献 2 ならびに 3 に譲る。また、合成した pcPNA の濃度は、260 nm での吸光度を測定することで決定した⁴⁾。

Table 2-1. Molecular mass of pcPNAs measured by MALDI-TOF Mass Spectrometry

	Sequence ^{a)}	Calcd.	Found.
pcPNA1	$\text{H}_2\text{N}-(\text{Lys})_2\text{DDGU}_5\text{DGU}_5\text{DGU}_5\text{CDU}_5\text{UG}(\text{Lys})\text{P-H}$	4774.7	4774.2
pcPNA2	$\text{H-P}(\text{Lys})\text{CDU}_5\text{CDGU}_5\text{DDCCCGU}_5\text{D}(\text{Lys})_2\text{-NH}_2$	4660.8	4660.2

a) D and U_s bear 2,6-diaminipurine and 2-thiouracil in place of conventional bases, respectively.

2-2-3 Ce(IV)/EDTA 錯体の調製

以下の組成からなる二つの溶液をまず調製する。

A Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ の 20 mM 水溶液を調製し、37 °C で 15 分間インキュベート

B EDTA・4Na 20 mM, HEPES 50 mM, pH = 11.0-11.5

A と B を 1:1 で混合し、1 N NaOH aq.を用いて pH = 7.0 とし、10 mM の Ce(IV)/EDTA 錯体溶液を調製する。この溶液をさらに 50 mM HEPES buffer (pH = 7.0)で適当な濃度に希釈し反応に用いる。なお、Ce(IV)会合体のサイズは Ce(NH₄)₂(NO₃)₆ の水溶液をインキュベートする時間に依存するので、実験結果の再現性をよくするためにもインキュベート時間を厳守する必要がある⁵⁾。

2-2-4 切断実験

まず、塩の非存在下、HEPES(pH = 7.0)水溶液中で DNA と pcPNA とを混合し、pcPNA をインベージョンさせた(50 °C, 1h)。次に NaCl を加えたのちに、Ce(IV)/EDTA 錯体を加え、切断反応を開始した。実験条件は以下の通りである。

Scission conditions : [DNA] = 20 nM, [each of pcPNAs] = 100 nM, [NaCl] = 100 mM, [Ce(IV)/EDTA] = 50 μM, [HEPES] = 5 mM, pH = 7.0, 50 °C, 14 h.

その後、反応停止剤 *N,N,N',N'*-ethylenediaminetetrakis-(methylenephosphonic acid) (aqueous solution adjusted to pH 7.0)を加え、50 °C で 1h インキュベーションすることで、切断反応を停止した。切断結果は、5 % 非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析し、FujiFilm FLA-3000G fluorescent imaging analyzer によりバンドを定量した。なお、切断バンド等の染色は GelSter を用いて行った。

第3節 実験結果

3-1 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

まず、ターゲットサイトの 1829 部位の C-G 塩基対を別の塩基対に置き換え、ARCUT で切断した結果を Figure 2-4a 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。

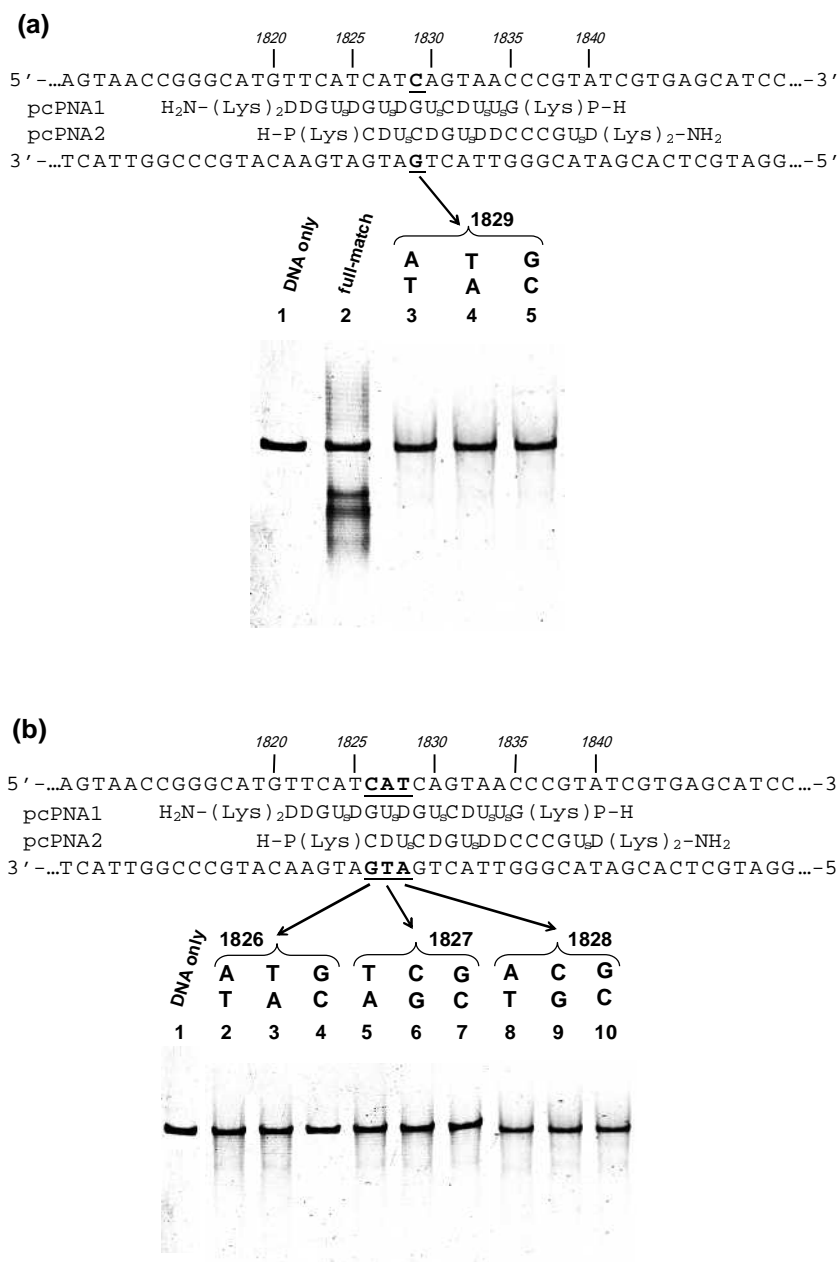


Figure 2-4. Mismatch-recognition in the central double-invasion region for the site-selective scission by ARCUT. (a) Lane 1, without Ce(IV)/EDTA (DNA only); lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-5, the C/G pair at 1829 site was changed to another base-pair as indicated. (b) Lane 1, without Ce(IV)/EDTA (DNA only); lanes 2-10, one of three base-pairs (underlined base-pairs) was changed to another base-pair. Reaction conditions: [DNA] = 20 nM, [each of pcPNAs] = 100 nM, [Ce(IV)/EDTA] = 50 μ M, [NaCl] = 100 mM, and [HEPES] = 5 mM at 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.

これに対し C/G 塩基対を A/T 塩基対に置き換えた lane 3 では、ARCUT による切断は全く起こらなかった。同様に C/G 塩基対を T/A 塩基対、G/C 塩基対に置き換えた場合でも、ARCUT による切断は全く起こらなかった(lanes 4-5)。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。

次に、切断配列の別の部位(1826-1828)に関しても、同様に一塩基対の置換を行い、切断実験を試みた。結果を Figure 2-4b に示す。切断結果が明確に示すように、1826-1828 部位の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、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違いを ARCUT は完全に識別することを示す。

3-2 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、同様に切断実験を行った結果を Figure 2-5 に示す。

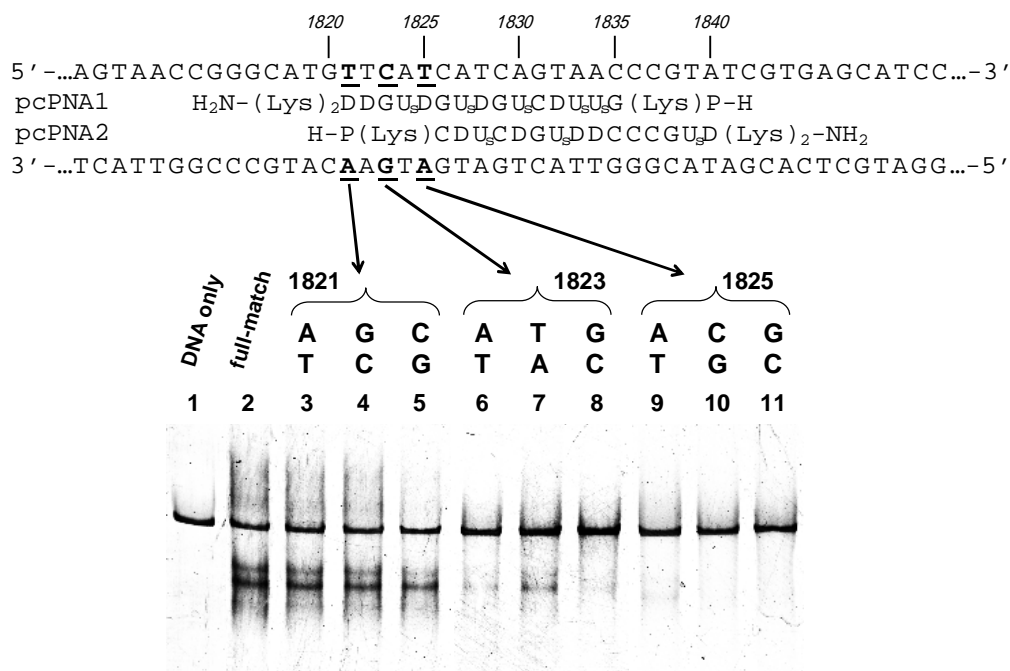


Figure 2-5. Mismatch-recognition in the flanking single-invasion region for the site-selective scission by ARCUT. Lane 1, without Ce(IV)/EDTA (DNA only); lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-11, one base-pair in the flanking single-invasion region (underlined) was changed to another base-pair as indicated. The reaction conditions are the same as described for Figure 2-4.

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、一塩基対の置換を識別できず、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 Figure 2-6 にまとめる。

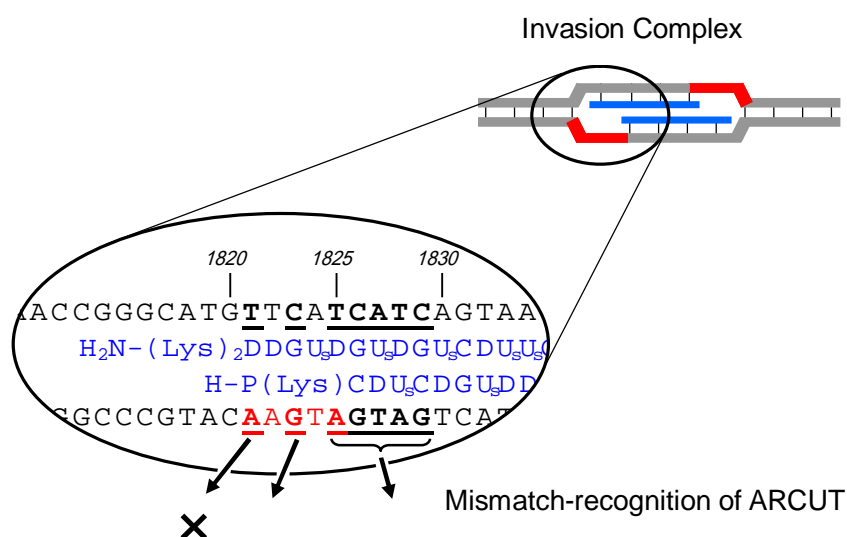


Figure 2-6. Summary of the study on the mismatch-recognition of ARCUT in its site-selective scission of DNA. The double-circle, the single-circle, and the cross show that the mismatch-recognitions are high, moderate, and poor, respectively.

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。

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も高い識別能を示す。

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、ミスマッチが存在する場合でも切断が起こってしまう。

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 $4^{14}(2.7 \times 10^8)$ - $4^{16}(4.3 \times 10^9)$ 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。

3-3 KCl存在下でのDNA切断におけるミスマッチ認識

これまでの実験では、NaCl存在下で切断実験を行い、ARCUTの切断におけるミスマッチ認識を検討してきたが、ここではNaClの代わりに、細胞内で多く存在するKClを用いて、一連の切断実験を行った(Figure 2-7)。なお、実験方法は、これまでの切断実験と同様である。

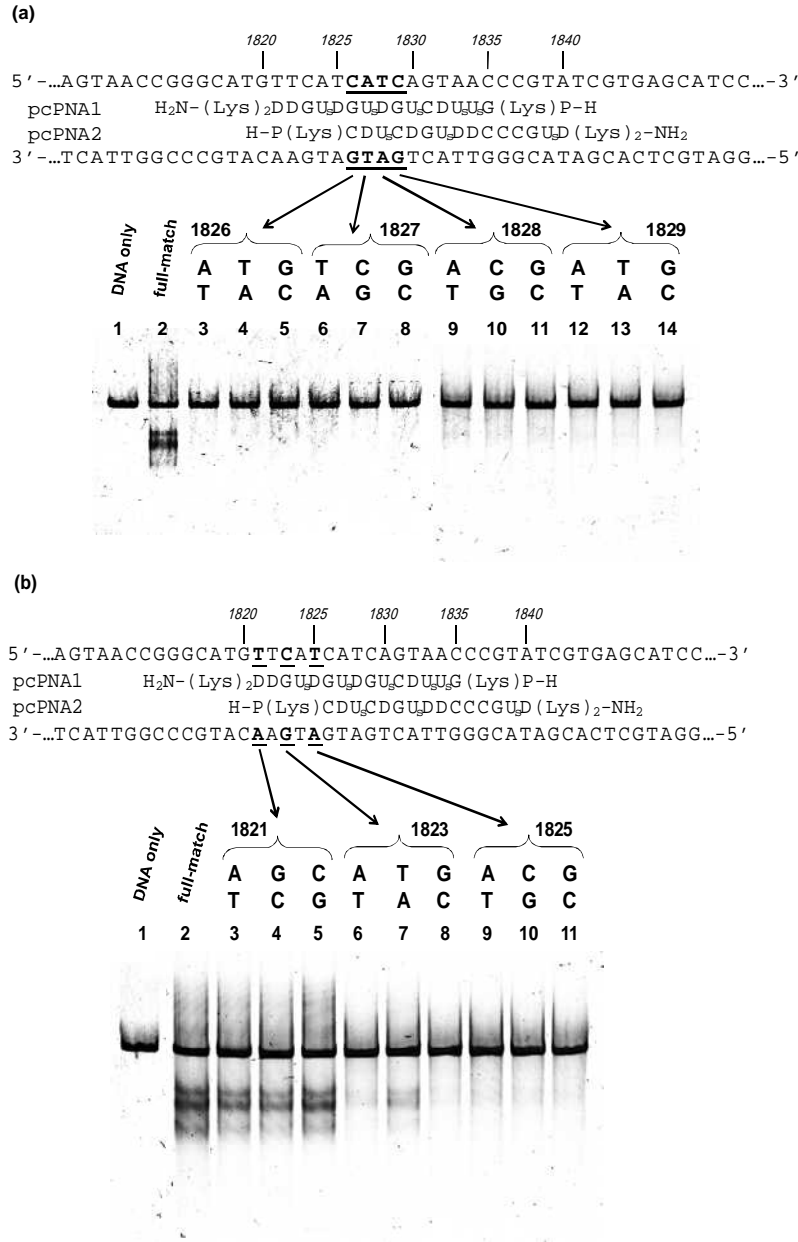


Figure 2-7. Mismatch-recognition for the site-selective DNA scission by ARCUT in the presence of KCl. (a) Lane 1, without Ce(IV)/EDTA (DNA only); lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-14, one base-pair (underlined base-pair) in the central double-invasion region was changed to another base-pair as indicated. (b) Lane 1, without Ce(IV)/EDTA (DNA only); lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-11, one base-pair (underlined base-pair) in the flanking single-invasion region was changed to another base-pair as indicated. The reaction conditions are the same as described for Figure 2-4, except for [KCl] = 100 mM instead of [NaCl] = 100 mM.

(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

まず、二本の pcPNA が切断配列と完全に相補的な場合では、位置選択的な切断が起こり、二本の切断バンドを確認することができる(Figure 2-7a, lane 2)。その一方で、一塩基対の置換を行った場合では、ミスマッチの種類によらず、全ての場合において、位置選択的な切断は全く起こらなかった(lanes 3-14)。すなわち、この領域に存在する一塩基対の変異は、KCl 存在下であっても厳密に識別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

まず 1825 部位の T/A 塩基対を別の塩基対に置換した場合では、切断反応は起こらず、ミスマッチが厳密に識別される(Figure 2-7b, lanes 9-11)。また 1823 部位の C/G 塩基対を A/T 塩基対(lane 6)、G/C 塩基対に置換した場合(lane 8)でも、切断はほぼ抑制される。しかし 1823 部位の C/G 塩基対を T/A 塩基対に置換した lane 7 では、Figure 2-5 と同様に、わずかながら切断が起こってしまう結果となった。また、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 lanes 3-5 では、ミスマッチの種類によらず、切断反応が起こってしまう。

これらの結果は、NaCl を用いた場合の結果と完全に一致する。すなわち、KCl を用いた場合でも、ARCUT は 16 塩基程度を厳密に認識することができる。しかし、この場合でも、切断配列の末端部位では、ミスマッチを識別できず、切断が起こってしまう。

第4節 まとめ

本章では、ARCUT のミスマッチ認識能を切断実験により体系的に評価した。まず、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を別の塩基対に置換した場合には、変異を導入した部位、生じるミスマッチの種類に関わらず、切断反応は、全く起らなかった。つまり、この領域に関しては、ARCUT は一塩基対の変異を完全に識別できる。また、gap 形成領域に関しても、中央の二本の pcPNA がインベージョンする領域から、2 及び 3 塩基外側の塩基対までは、一塩基対の変異が識別され、切断はほぼ抑制される。この際、ミスマッチの種類によっては、切断が確認された場合もあったが、フルマッチと切断効率を比較すれば微々たるものであり、ミスマッチを十分に識別できるといえる。しかし、切断配列の末端の一塩基対を、別の塩基対に置換した場合には、その変異を識別できず、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。すなわち現状の ARCUT では、切断配列の末端の一塩基対のみ異なる類似配列を識別できない。だが、切断配列を設計する段階で、末端にミスマッチを生じてしまう配列を避ければ、この認識能の低下を未然に防ぐことができるため、現実的には大きな問題にならない。

以上の結果を踏まえると、15-mer pcPNA を用いた現状の ARCUT では、14-16 塩基配列を厳密に認識することができる。この認識能は、ARCUT の切断配列が $4^{14}-4^{16}$ 塩基に一回という確率で現れることを意味しており、巨大なゲノム DNA であっても望みの配列のみで切断できることを示唆する。すなわち ARCUT の認識能は、天然の制限酵素の認識能をはるかに凌ぐものであり、ARCUT はポストゲノム時代において強力なツールになるといえる。

第2章 参考文献・脚注

- 1) 切断効率を向上させるために、N末端にホスホセリンを修飾した pcPNA を使用した。詳細は、次の文献を参照(Y. Yamamoto, M. Mori, Y. Aiba, T. Tomita, W. Chen, J-M. Zhou, A. Uehara, Y. Kitamura, and M. Komiyama, *Nucleic Acids Res.*, **35**, e53 (2007)).
- 2) 石塚 匠, “ 修士論文 ; 人工核酸を用いた DNA の特定配列の認識 ”, 東京大学大学院工学系研究科 (2008).
- 3) N末端のホスホセリンの導入には、標準的な Fmoc 法を用いた。PNA モノマーの合成法及び、詳細な固相合成法のプロトコールに関しては次の論文を参照(M. Komiyama, Y. Aiba, T. Ishizuka, and J. Sumaoka, *Nat. Protoc.*, **3**, 646 (2008)).
- 4) PNA モノマーの 260 nm におけるモル吸光係数は $A = 13700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $T = 8600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $G = 11700 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $C = 6600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $D = 7600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $U_s = 10200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ である。
- 5) 北村 佳仁 “ 博士論文 ; DNA の位置選択的切断とその応用 ”, 東京大学大学院工学系研究科 (2005).

第3章 ARCUT による切断配列認識の機構

第1節 緒言

第2章の結果から、ARCUT が 14-16 塩基配列を厳密に認識し、二本鎖 DNA 中の望みの配列のみを正確に切断できることが明らかになった。そこで本章では、ARCUT による DNA 切断における高いミスマッチ認識が生じる機構を検討するために、切断実験条件下([NaCl] = 100 mM)での、インベージョン複合体形成について詳細に検討する。さらに、インベージョン複合体形成時に生じる PNA/DNA 二本鎖の熱力学的な安定性(T_m)の観点から、ミスマッチ塩基対が複合体形成に与える影響も併せて検討する。

また ARCUT では、非特異的な DNA 切断を抑制するために、切断時に NaCl を加えるが¹⁾、インベージョン自体は塩を全く加えずに行う。これは二本鎖 DNA の安定化によるインベージョン効率の低下を防ぐためである²⁾。そこで本章では、ARCUT による切断配列の認識に与える塩の効果をより詳細に検討するため、NaCl 非存在下でのインベージョン複合体形成に関しても検討する。

第2節 実験方法

2-1 インベージョン実験について

ARCUT 切断実験条件下([NaCl] = 100 mM)での複合体形成について、以下の手順で検討した。まず NaCl を加えずに基質 DNA と pcPNA とを HEPES(pH = 7.0)水溶液中で混合し、pcPNA をインベージョンさせた(50 °C, 1h)。次に、終濃度が 100 mM になるように NaCl を加え、50 °C で 15-30 min インキュベーションした。その後、反応溶液を 5 %非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により解析した。この際、バンドの染色は GelSter で行い FujiFilm FLA-3000G fluorescent imaging analyzer によりバンドを定量した。反応条件は以下の通り。

Reaction conditions : [DNA] = 20 nM, [each of pcPNAs] = 100 nM, [NaCl] = 100 mM, [HEPES] = 5 mM, pH = 7.0, 50 °C, 15-30 min.

なお、インベージョンによる塩の効果の詳細に検討する目的で、NaCl を加えずにインベージョンさせた場合の複合体形成についても、同様な方法で解析した。

2-2 T_m 測定

PNA/DNA、DNA/DNA 二本鎖の T_m 測定条件を以下に示す。

Measurement conditions: [each of strands] = 1 μ M, [NaCl] = 100 mM, [HEPES(pH 7.0)] = 5 mM
実際の測定では 1 min で 1 °C 温度変化させた。

2-3 13-mer pcPNA によるインベージョン実験

使用した pcPNA は、第2章と同様、一般的な固相合成により合成・精製し、MALDI-TOF-MS により同定した。Table 3-1 に結果を示す。13-mer の pcPNA を用いたインベージョン実験に関しては、上記 2-1 ~ 2-3 に示す通りである。

Table 3-1. Molecular mass of pcPNAs measured by MALDI-TOF Mass Spectrometry

	Sequence ^{a)}	Calcd.	Found.
pcPNA3	H ₂ N-(Lys) ₂ GU _s DGU _s DGU _s CDU _s UG(Lys)P-H	4194.5	4194.6
pcPNA4	H-P(Lys)CDU _s CDGU _s DDCCCG(Lys) ₂ -NH ₂	4102.6	4103.0

a) D and U_s bear 2,6-diaminipurine and 2-thiouracil in place of conventional bases, respectively.

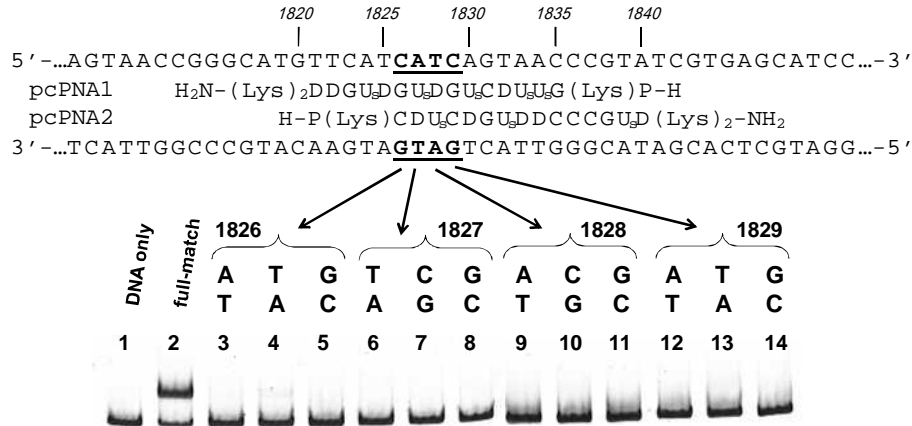
第3節 実験結果

3-1 切断実験条件下([NaCl] = 100 mM)での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についてゲルシフトアッセイにより評価した(Figure 3-1)。

Invasion at [NaCl] = 100 mM

(a) Mismatches in the central double-invasion region



(b) Mismatch in the flanking single-invasion region

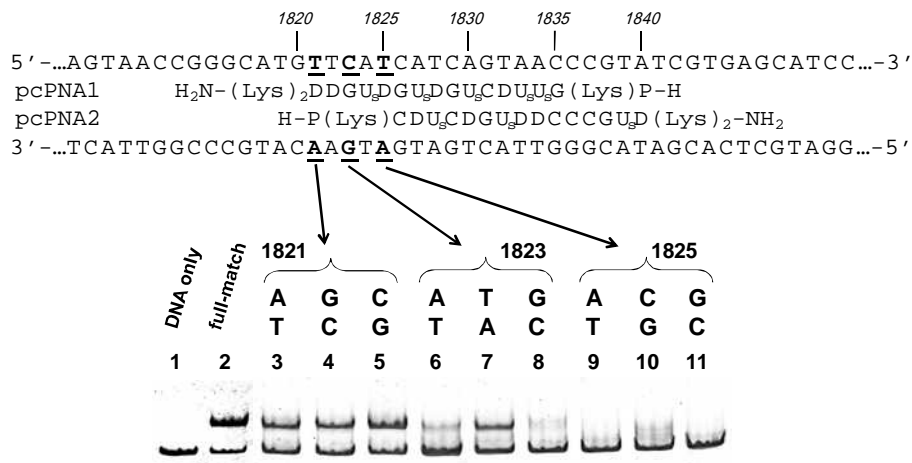


Figure 3-1. Gel-shift assay for the formation of invasion complex under the conditions for the ARCUT scission ([NaCl] = 100 mM). (a) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-14, one base-pair in the central double-invasion region (underlined) was changed to another base-pair. (b) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-11, one base-pair in the flanking single-invasion region (underlined) was changed. Reaction conditions: [DNA] = 20 nM, [each of pcPNAs] = 100 nM, [NaCl] = 100 mM, and [HEPES] = 5 mM at pH 7.0 and 50 °C.

(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

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(Figure 3-1a, 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

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

結果を Figure 3-1b に示す。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 では、インベージョン複合体の形成はほぼ抑制される。また同様に、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も、ミスマッチを含むインベージョン複合体は、ほとんど形成しない。したがって、gap 形成領域においても、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。これは、pcPNA1/DNA 二本鎖間に G-T の wobble 塩基対が形成し、複合体が安定化したためと考えられる。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。

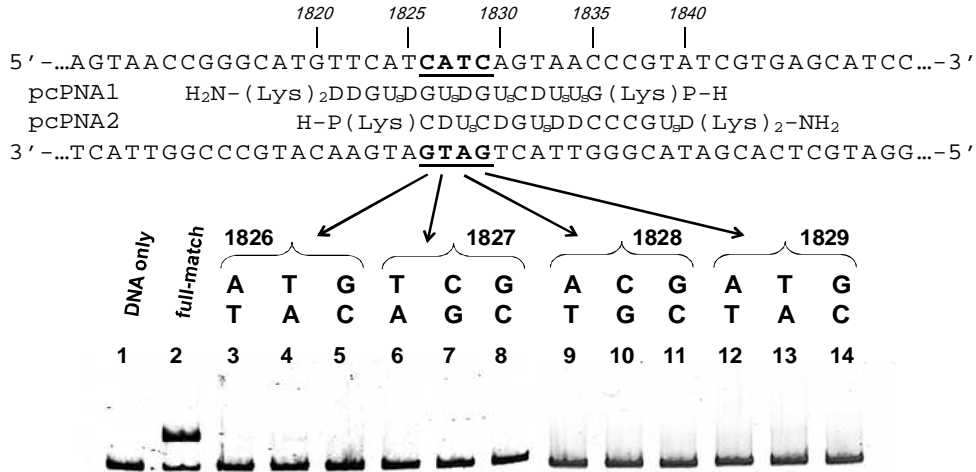
これらの結果と、第 2 章で述べた ARCUT による切断実験の結果との間には相関関係が成り立つ。つまり Figure 3-1 において、インベージョン複合体が形成した場合のみ、Ce(IV)/EDTA 錯体による切断が起こる。このことから ARCUT による DNA 切断は、インベージョンにより支配されているといえる。すなわち ARCUT では、ミスマッチの有無にかかわらず、インベージョン複合体が形成した場合に切断が起こる。

3-2 KCl 存在下([KCl] = 100 mM)でのインベージョン複合体形成について

第2章ではNaClの代わりにKClを用いた場合でも、類似配列を厳密に識別し、望みの配列のみを切断できることを述べた。そこで、KCl 存在下でのインベージョン複合体形成についてゲルシフトアッセイにより検討した結果を Figure 3-2 に示す。

Invasion at [KCl] = 100 mM

(a) Mismatches in the central double-invasion region



(b) Mismatch in the flanking single-invasion region

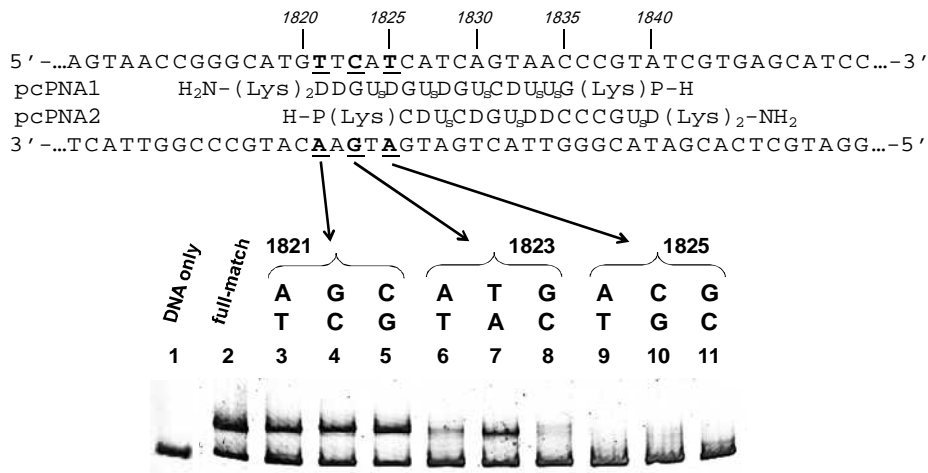


Figure 3-2. Gel-shift assay for the formation of invasion complex in the presence of KCl ([KCl] = 100 mM). (a) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-14, one base-pair in the central double-invasion region (underlined) was changed to another base-pair. (b) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched 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 3-1, except for [KCl] = 100 mM instead of [NaCl] = 100 mM.

[NaCl] = 100 mM 存在下の場合と同様に、二本の pcPNA がインベージョンする領域に一塩基対の変異を導入した場合では、ミスマッチを含むインベージョン複合体は形成せず、目的の配列のみがインベージョンにより認識される (Figure 3-2a)。その一方で、gap 形成領域の一塩基対を別の塩基対に置換した場合には、Figure 3-1b の場合と全く同様に、ミスマッチを含むインベージョン複合体が形成する場合がある (Figure 3-2b)。つまり、1823 部位の C/G 塩基対を T/A 塩基対に置き換え pcPNA1/DNA 二本鎖間に G-T の wobble 塩基対が生じる lane 7 と、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 lanes 3-5 では、ミスマッチが識別されずにインベージョン複合体が形成してしまう。

以上のことから、NaCl の代わりに KCl を用いた場合においても、ARCUT による DNA 切断反応の結果と、インベージョン複合体形成との間には、相関関係が成り立つ。つまり、この場合においても、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のみ、Ce(IV)/EDTA 錯体による切断が起こる。この結果からも、ARCUT における切断反応が、インベージョンに支配されているといえる。

3-3 PNA/DNA 二本鎖の熱力学的な安定性(T_m)からの解析

Figure 3-1 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 3-2 に切断実験条件下([NaCl] = 100 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 °C、83.9 °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 °C ~ 13.4 °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($\Delta T_m = 0.4$ °C ~ 1.3 °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 °C ~ 12.6 °C、 T_m が低下した。ここで、Figure 3-1a 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。

Table 3-2. Melting temperatures of the DNA/PNA duplexes in the invasion site^a

(a) upper DNA/pcPNA1 duplex

Base-pair change pattern		Sequence of DNA (5'-3')	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
Fully-matched DNA		5' - TTCATCATCAGTAAC - 3'	78.2	—
	<u>A</u> /T	5' - TTCATCAT <u>A</u> AGTAAC - 3'	66.3	11.9
C/G1829	T/ <u>A</u>	5' - TTCATCAT <u>T</u> AGTAAC - 3'	71.2	7.0
	<u>G</u> /C	5' - TTCATCAT <u>G</u> AGTAAC - 3'	64.8	13.4
	<u>A</u> /T	5' - TTCAT <u>A</u> ATCAGTAAC - 3'	66.2	12.0
C/G1826	T/ <u>A</u>	5' - TTCAT <u>T</u> ATCAGTAAC - 3'	70.6	7.6
	<u>G</u> /C	5' - TTCAT <u>G</u> ATCAGTAAC - 3'	65.6	12.6
	<u>A</u> /T	5' - TT <u>A</u> ATCATCAGTAAC - 3'	69.6	8.6
C/G1823	T/ <u>A</u>	5' - TT <u>T</u> ATCATCAGTAAC - 3'	71.6	6.6
	<u>G</u> /C	5' - TT <u>G</u> ATCATCAGTAAC - 3'	70.0	8.2
	<u>A</u> /T	5' - <u>A</u> TTCATCATCAGTAAC - 3'	77.7	0.5
T/A1821	<u>G</u> /C	5' - <u>G</u> TTCATCATCAGTAAC - 3'	78.0	0.2
	<u>C</u> /G	5' - <u>C</u> TTCATCATCAGTAAC - 3'	77.9	0.3

(b) lower DNA/pcPNA2 duplex

Base-pair change pattern		Sequence of DNA (5'-3')	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
Fully-matched DNA		5' - TACGGGTTACTGATG - 3'	83.9	—
	A/ <u>T</u>	5' - TACGGGTTACT <u>T</u> ATG - 3'	77.9	6.0
C/G1829	T/ <u>A</u>	5' - TACGGGTTACT <u>A</u> ATG - 3'	77.7	6.2
	<u>G</u> /C	5' - TACGGGTTACT <u>C</u> ATG - 3'	78.0	5.9
	<u>A</u> /T	5' - TACGGGTTACTGAT <u>T</u> - 3'	83.5	0.4
C/G1826	T/ <u>A</u>	5' - TACGGGTTACTGAT <u>A</u> - 3'	83.1	0.8
	<u>G</u> /C	5' - TACGGGTTACTGAT <u>C</u> - 3'	82.6	1.3

^a Measurement conditions: [each of strands] = 1 μ M, [NaCl] = 100 mM, and [HEPES(pH = 7.0)] = 5 mM.

(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 3-1b 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 3-1b 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 ($\Delta T_m = 0.2\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$)。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 3-1b 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。したがって現状の ARCUT では pcPNA の配列設計において、切断配列の末端にミスマッチが形成する配列、及び、末端付近に G-T の wobble 塩基対が形成する配列を避ける設計が重要となる。

3-4 ARCUT における塩の効果

Ce(IV)/EDTA 錯体による DNA 切断は、DNA の非特異的切断を抑えるために、通常 100 mM の NaCl 存在下で行う。仮に、NaCl を加えずに切断実験を行うと、DNA 二本鎖が不安定なために、非特異的な切断反応が起こってしまう (Figure 3-3)。そこで ARCUT では、NaCl を加えることにより、切断部位以外の二本鎖を安定化させた状態で、切断を行う。

これまでの結果から、 $[\text{NaCl}] = 100\text{ mM}$ の切断実験条件下では、インベージョンで一塩基対の変異を識別できるために、その後の切断反応で、目的配列のみを切断できることが分かった。しかし、インベージョンの厳密な配列認識が、NaCl の存在により DNA/DNA 二本鎖が安定なために実現したのか、または、インベージョンそのもののミスマッチ認識能が高いために実現したのかは定かでない。そこで、塩の非存在下におけるインベージョンについて、ゲルシフトアッセイを行った結果を Figure 3-4 に示す。

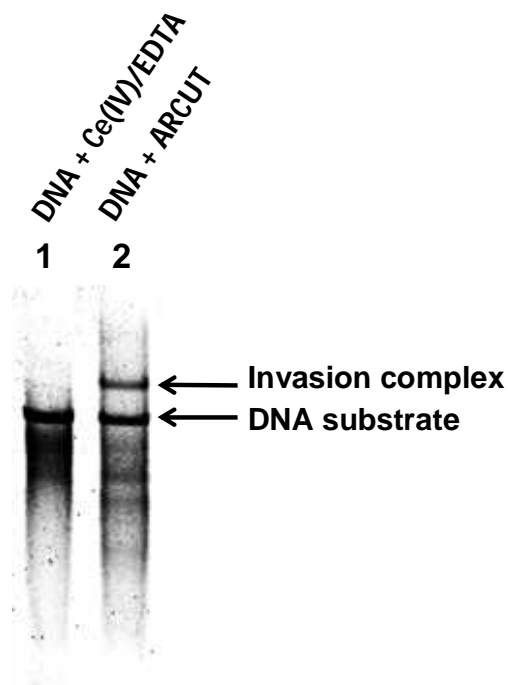
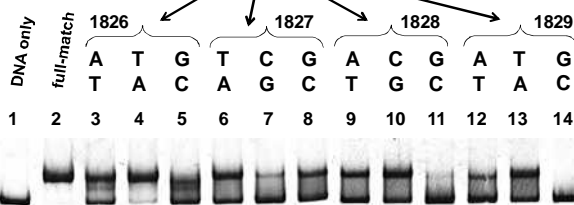


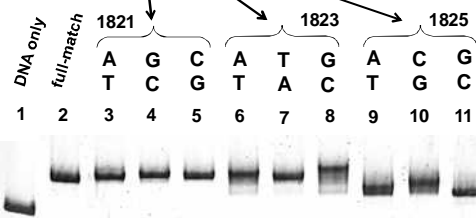
Figure 3-3. Non-denaturing PAGE assay for DNA scission by ARCUT in the absence of NaCl. Under these conditions, non-specific DNA scission occurred and clear scission bands were hardly observed. Lane 1, without two pcPNA additives; lane 2, with ARCUT system. Reaction conditions: $[\text{DNA}] = 20\text{ nM}$, $[\text{each of pcPNAs}] = 100\text{ nM}$ (in lane 2), $[\text{Ce(IV)/EDTA}] = 50\text{ }\mu\text{M}$, $[\text{HEPES}] = 5\text{ mM}$ at pH 7.0 and 50 °C for 14 h.

(a) Mismatches in the central double-invasion region

(a) Mismatches in the central double-invasion region



5'...AGTAACCGGGCATG**TTCA**TCATCAGTAACCCGTATCGTGAGCATCC...-3'
 pcPNA1 H₂N-(Lys)₂DDGU¹⁸²⁰DGU¹⁸²⁵DGU¹⁸³⁰CDU¹⁸³⁵UG¹⁸⁴⁰(Lys)P-H
 pcPNA2 H-P(Lys)CDU¹⁸²⁰CDGU¹⁸²⁵DDCCGU¹⁸³⁰D(Lys)₂-NH₂
 3'...TCAATTGGCCCGTCA**AGTA**GATAGTCATTGGGCATGACACTCGTAGG...-5'



まず pcPNA と DNA とが完全に相補的な場合では、基質 DNA は完全にインベージョン複合体を形成する (lane 2)。しかし、ターゲット部位の一塩基対を別の塩基対に置き換えたほぼ全ての場合においても、インベージョン複合体が形成する結果となった³⁾。これは NaCl 非存在下では、DNA 二本鎖が不安定なために、ミスマッチを含むインベージョン複合体でさえも、高い効率で生成してしまうためと考えられる。そこで、pcPNA がインベージョンする部位における DNA/DNA 二本鎖 (1821T/A-1840A/T) の T_m の塩濃度依存性を Figure 3-5 に示す。NaCl が 100 mM 存在する切断実験条件下では、DNA/DNA 二本鎖の T_m が 62.1 °C であるのに対し、NaCl が 1 mM 存在する低塩濃度条件下では T_m が 22.7 °C 低下し、39.4 °C であった。この T_m の大幅な低下に見られるように、DNA/DNA 二本鎖の安定性は、NaCl 濃度に大きく依存する。すなわち、NaCl 非存在下では、DNA 二本鎖が大きく不安定化するため、

ミスマッチを含むインベージョン複合体でさえも、高い効率で形成してしまったと考えられる。したがって、インベージョンで高いミスマッチ認識を実現するためには、NaCl を加えることで DNA 二本鎖を安定化させる必要がある。以上の結果から、ARCUT において塩を加えることで、インベージョンのミスマッチ認識能が顕著に向上する、切断配列以外での非特異的な切断が抑制される、という二つの効果の実現していることが分かった。

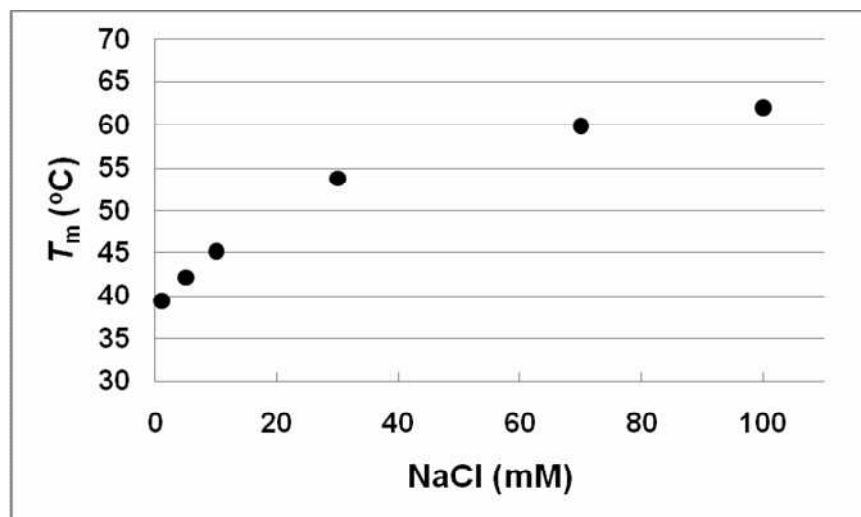


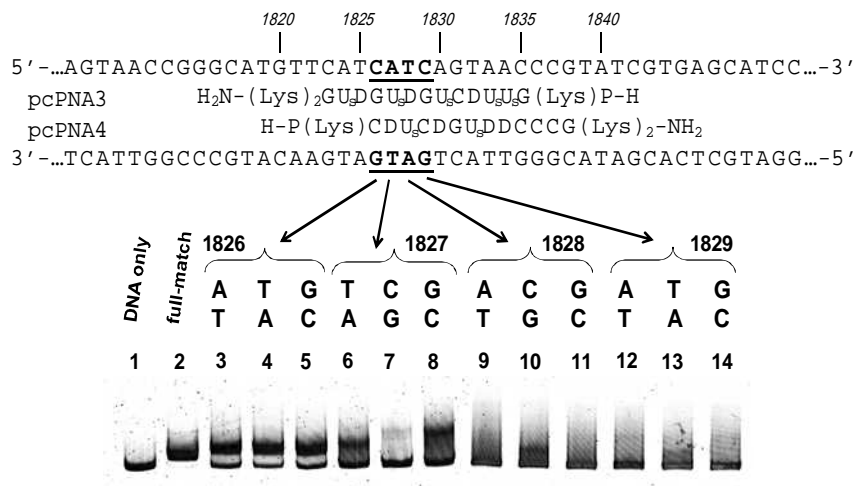
Figure 3-5. Effect of NaCl concentration on the thermal stability of DNA/DNA duplex. Measurement conditions: [each of DNAs] = 1 μ M, [HEPES(pH = 7.0)] = 5 mM, and NaCl at the designated concentration.

3-5 ARCUT の設計指針

これまで述べた ARCUT に関連する一連の実験では 15-mer の pcPNA により、最大で二本鎖 DNA 中の 20 塩基を、インベージョンで認識する設計を用いてきた。しかし、実際には、15-mer pcPNA で厳密に認識できる切断配列の長さは、16 塩基程度であった。そこで、C 末端 2 塩基分を除いた 13-mer の pcPNA を用いて 3 gap の系を設計し、インベージョンさせることで、16 塩基を厳密に認識できないかと考えた。すなわち、pcPNA の長さを短くすることで、ミスマッチの認識能が向上し、末端に存在する一塩基対の変異でさえも識別できるのではないかと考え、実験を行った。そこで、まず NaCl 非存在下で pcPNA をインベージョンさせた結果を Figure 3-6 に示す。

Invasion at [NaCl] = 0 mM

(a) Mismatches in the central double-invasion region



(b) Mismatch in the flanking single-invasion region

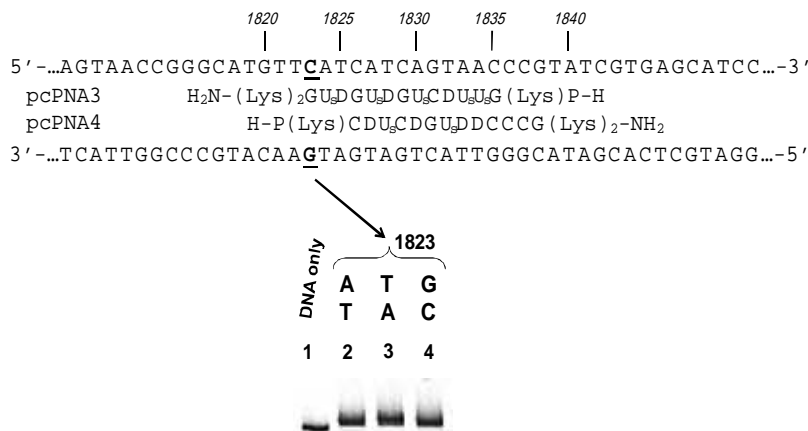


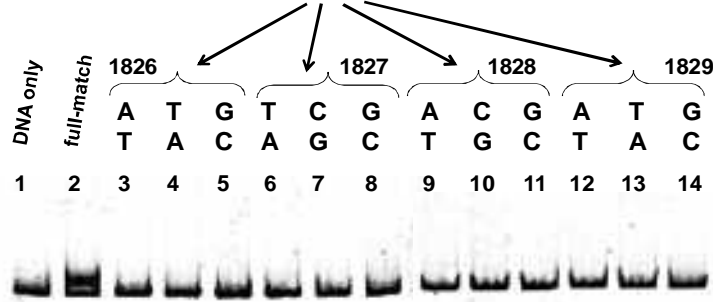
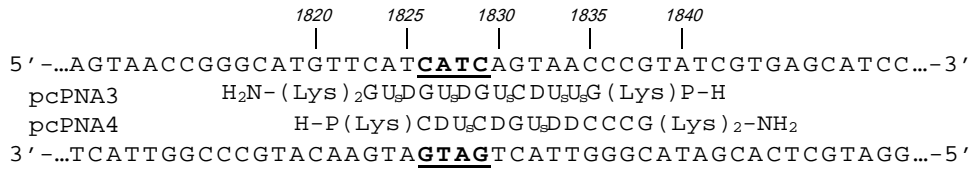
Figure 3-6. Gel-shift assay for the formation of invasion complex in the absence of NaCl. (a) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-14, one base-pair in the central double-invasion region (underlined) was changed to another base-pair. (b) Lane 1, DNA only; lanes 2-4, the C/G pair at 1823 site was changed to another base-pair as indicated. Invasion conditions: [DNA] = 20 nM, [each of pcPNAs] = 100 nM, and [HEPES] = 5 mM at pH = 7.0, 50 °C, for 1 h.

結果が明確に示すように、NaCl 非存在下においては、15-mer の pcPNA を用いた場合と同様に、インベーションのミスマッチ認識能は低い。すなわち、13-mer の pcPNA を用いた場合でも、インベーションで特定配列のみを識別することは難しいことが分かった。

次に、NaCl 非存在下でインベーションさせた後に、100 mM の NaCl を加えた場合の、インベーション複合体形成について検討した結果を Figure 3-7 に示す。

Invasion at [NaCl] = 100 mM

(a) Mismatches in the central double-invasion region



(b) Mismatch in the flanking single-invasion region

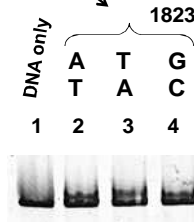
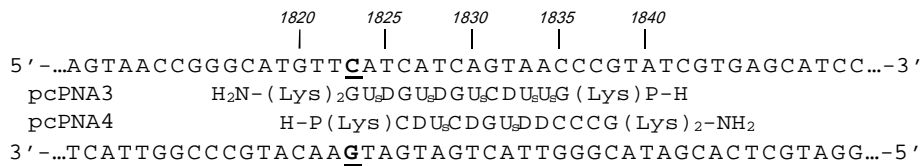


Figure 3-7. Gel-shift assay for the formation of invasion complex in the presence of NaCl ([NaCl] = 100 mM). (a) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-14, one base-pair in the central double-invasion region (underlined) was changed to another base-pair. (b) Lane 1, DNA only; lanes 2-4, the C/G pair at 1823 site was changed to another base-pair as indicated. After all the invasion complexes were formed in the absence of NaCl, NaCl was added to a final concentration of 100 mM, and the mixtures were further incubated at 50 °C for 15 min. Reaction conditions: [DNA] = 20 nM, [each of pcPNAs] = 100 nM, [HEPES] = 5 mM, [NaCl] = 100 mM at pH = 7.0.

15-mer pcPNA を用いた場合と同様に、二本の pcPNA がインベージョンする領域の塩基対を別の塩基対に置換した場合では、インベージョン複合体形成に伴うゲルシフトがみられずに、一塩基対の置換を厳密に識別できることが分かった(Figure 3-7a)。しかし、切断配列の末端にあたる 1823 部位の C/G 塩基対を別の塩基対に置換した Figure 3-7b では、生じるミスマッチの種類によらずインベージョン複合体を形成してしまう結果となった。すなわち、13-mer の pcPNA を用いた場合でも、15-mer pcPNA を用いた場合と同様に、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。

以上の結果から、13-mer pcPNA を用いた場合では、16 塩基配列を厳密に認識することは難しい。そのために、現状の ARCUT で 16 塩基配列を厳密に認識するためには、15-mer pcPNA を用いて、5 gap を形成させ切断する系の設計が必須であるといえる。

第4節 まとめ

本章では ARCUT の切断反応における高いミスマッチ認識が実現する機構をインベージョン複合体形成の観点から検討した。その結果、ARCUT の切断反応はインベージョンに支配されていることが明らかになった。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。

15-mer の pcPNA を用いたインベージョンでは、切断実験条件下 ($[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$) で、末端のミスマッチを識別することができない。したがって、認識配列の末端の一塩基対のみが異なる類似配列に関しては切断が起こってしまう（第2章参照）。しかし、このような類似配列を避けるように pcPNA の配列を設計することで、末端でのミスマッチ認識の低下を十分に防ぐことができる。

また、インベージョンにおけるミスマッチ認識は、塩濃度に大きく依存することが分かった。すなわち ARCUT 切断条件下 ($[\text{NaCl}] = 100 \text{ mM}$) で、インベージョンの高いミスマッチ認識が実現したのは、NaCl により二本鎖 DNA が安定化したためである。実際、NaCl が存在しない条件下でインベージョンさせた場合には、インベージョンのミスマッチ認識能は著しく低下し、ミスマッチを含むインベージョン複合体が高効率で生成してしまう。したがって、インベージョンで高いミスマッチ認識を実現させるためには、系中に存在する塩濃度が極めて重要となる。

第3章 参考文献・脚注

- 1) M. Komiyama, Y. Aiba, Y. Yamamoto, and J. Sumaoka, *Nat. Protoc.*, **3**, 655 (2008).
- 2) J. Lohse, O. Dahl, and P. E. Nielsen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11804 (1999).
- 3) Figure 3-4b では、インバージョン複合体に由来するバンドの位置が lane ごとに明らかに異なる。これは、gap 部位にミスマッチを導入した場合に生じる複合体の構造そのものが、異なるためと考えられる。

第4章 Double-duplex インベージョンのミスマッチ認識に関する基礎的検討

第1節 緒言

前章の結果から DNA 中に一本鎖構造を生じるインベージョンの Fidelity は、塩濃度に大きく依存し、 $[\text{NaCl}] = 0 \text{ mM}$ の条件下でインベージョンの Fidelity が低いことが分かった。そこで本章では ARCUT とは異なり、非対合部位をもたない pcPNA による double-duplex インベージョンのミスマッチ認識について詳細な検討をする。

Double-duplex インベージョンに関する過去の研究では、取り扱う DNA のサイズが数百塩基対からプラスミドサイズの DNA であったため、DNA 中に存在する類似配列の出現頻度はそれほど高くない。そのために、インベージョンのミスマッチ認識が大きな問題になることはなく、詳細な検討は行われてこなかった。しかし、今後、インベージョンを用いて、ゲノム DNA 中の特定配列を認識する場合には、インベージョンで類似配列を厳密に識別できるかどうかといった基礎的な知見が不可欠となる。そのため、本章で得られる知見は、ARCUT をはじめ double-duplex インベージョンを用いた応用研究を進める上で、非常に重要な意味をもつ。

第 2 節 実験方法

2-1 インベージョン実験

本章での実験では、pcPNA(10-mer ならびに 8-mer)をずらした形でインベージョンさせるのではなく、そろえた形でインベージョンさせるため、二本鎖 DNA 中に一本鎖構造は生じない。また、基質としては 130 bp の DNA を用いた。基質 DNA の配列を Figure 4-1 に、10-mer pcPNA ならびに 8-mer pcPNA を MALDI-TOF-MS により同定した結果を、Table 4-1 にそれぞれ示す。

TACCGCCAGTTGTTTACCCTCACAACGTTCCAG
TAACCGGGCATGTTTCATCATCAGTAACCCGTAT
CGTGAGCATCCTCTCTCGTTTCATCGGTATCAT
TACCCCCATGAACAGAAATCCCCCTTACACG

Figure 4-1. The whole sequence of 130 bp fully-matched DNA substrate. Only one of the strands is shown, and the invasion site of pcPNA^(10a) (10-base sequence) was underlined.

Table 4-1. Molecular mass of pcPNAs measured by MALDI-TOF Mass Spectrometry

Sequence ^{a)}		Calcd.	Found.
pcPNA ^(8a)	H ₂ N- (Lys) U _s DG U _s CD U _s U _s -H	2340.8	2342.0
pcPNA ^(8b)	H-D U _s CDG U _s DD (Lys) -NH ₂	2384.9	2385.1
pcPNA ^(10a)	H ₂ N- (Lys) DG U _s DG U _s CD U _s U _s (Lys) -H	3049.1	3049.4
pcPNA ^(10a)	H- (Lys) U _s CD U _s CDG U _s DD (Lys) -NH ₂	3031.2	3031.5

a) D and U_s bear 2,6-diaminopurine and 2-thiouracil in place of conventional bases, respectively.

一連のインベージョン実験は、前章までと同様に行った。実験の詳細に関しては、第 3 章の第 2 節を参照。

2-2 T_m測定

PNA/DNA 二本鎖の T_m 測定条件を、以下に示す。

Measurement conditions: [each of strands] = 2 μM, [NaCl] = 10 mM or 100 mM, [HEPES(pH = 7.0)] = 5 mM.

実際の測定では、1 min で 1 °C 温度変化させた。

第3節 実験結果

3-1 非対合部分をもたない 10-mer pcPNA による double-duplex インベージョン

まずは、10-mer pcPNA をそろえた形でインベージョンさせた場合の、ミスマッチ認識について検討を行った。

3-1-1 低塩濃度条件下([NaCl] = 10 mM)での、インベージョン複合体形成について

一般的に PNA のインベージョンに用いられる低塩濃度条件下で、インベージョン実験を行った。典型的な結果を Figure 4-2 に示す。

Invasion at [NaCl] = 10 mM

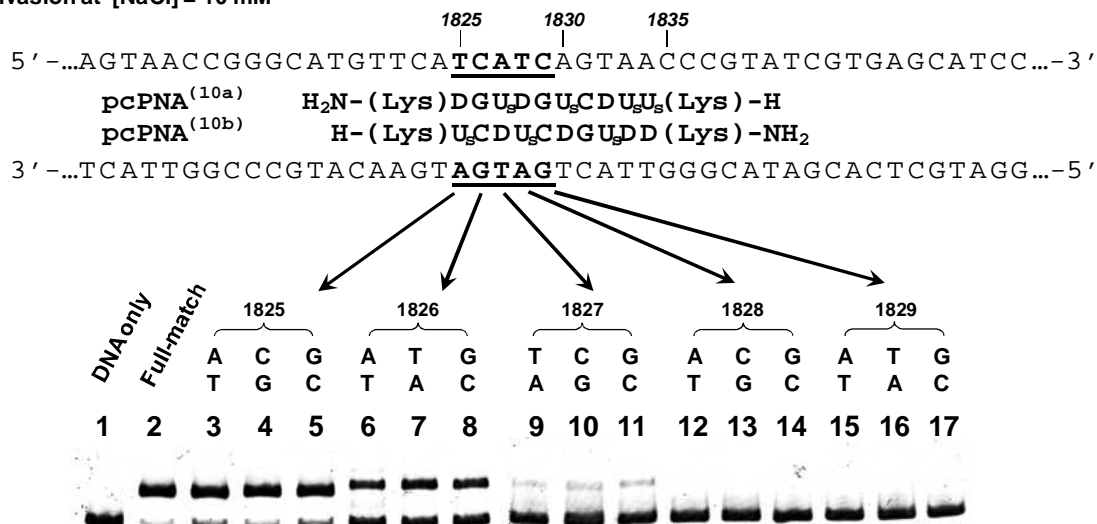


Figure 4-2. Gel-shift assay for the formation of invasion complex under the low salt conditions ([NaCl] = 10 mM). (a) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-17, one base-pair (underlined) was changed to another base-pair as indicated. Reaction conditions: [DNA] = 20 nM, [each of pcPNAs] = 60 nM, [HEPES] = 5 mM, [NaCl] = 10 mM at pH = 7.0, 50 °C for 1 h.

まず、二本の pcPNA と認識配列が完全に相補的な場合では、高効率でインベージョンが起こる(lane 2)。また、認識配列の中央付近にあたる 1828 及び、1829 部位の一塩基対を、別の塩基対に置き換えた場合では、いずれのミスマッチが生じる場合であっても、一塩基対の置換が識別され、複合体形成は抑制される結果となった(lanes 12-17)。また、1827 部位の A/T 塩基対を置換した場合では、インベージョン複合体の形成をわずかに確認できるが、効率から考えれば、ほぼ識別されているといえる。

その一方で、1825 部位の T/A 塩基対、1826 部位の C/G 塩基対を別の塩基対に置換した場合では、生じる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してしまう。また、インベージョン効率に関しては、末端にミスマッチが存在するほど高いことが明確に分かる。つまり、1826 部位の C/G 塩基対を置換した場合に比べ、1825 部位の T/A 塩基対を置換した場合のインベージョン効率は高く、フルマッチの場合と同程度であった。

以上の結果から、低濃度条件下では、認識配列の末端付近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。この結果は、対称性を考慮すれば、10 bp の認識配列のうち中央付近の 6 bp 程度しか、塩基配列を認識できないことを示す。

低塩濃度存在下での、インベージョン複合体の安定性について検討するために、複合体形成時に生じる PNA/DNA 二本鎖の T_m を測定した([NaCl] = 10 mM 存在下)。結果を Table 4-2 に示す。

(1) 中央付近(1827~1829)の塩基対を別の塩基対に置換した場合

まず DNA と PNA とが完全に相補的な場合の T_m は、upper DNA/pcPNA^(10a) が 66.0 °C、lower DNA/pcPNA^(10b) が 67.9 °C であった。それに対し認識配列の中央にあたる 1829 部位の C/G 塩基対を置換した場合では、ミスマッチにより二組の DNA/PNA 二本鎖が、同時に、大きく不安定化する($\Delta T_m = 14.0$ °C ~ 22.7 °C)。そのために、インベージョン複合体の形成は抑制されたと考えられる(Figure 4-2 中の lanes 15-17)。

また、この際の ΔT_m の大きさは、生じるミスマッチ塩基対の種類に応じて変化する。例えば、C/G 塩基対を T/A 塩基対に置き換えた場合では、upper DNA/pcPNA^(10a)二本鎖には、安定なミスマッチである G-T の wobble 塩基対が形成する。そのために ΔT_m 値は、他の場合と比べると顕著に小さくなり 14.0 °C であった。すなわち wobble 塩基対が形成する場合には、 T_m 値は低下するものの、他のミスマッチと比較すると DNA/PNA 二本鎖を不安定化する度合は、小さくなる。しかし、たとえ安定な G-T の wobble 塩基対が生じる場合であっても、インベージョン複合体中の DNA/PNA 二本鎖が、共に大きく不安定化するために、複合体は形成しない。

1829 部位と同様に、1828 部位ならびに 1827 部位の一塩基対を置換した場合であっても、ミスマッチ塩基対により二組の DNA/PNA 二本鎖は同時に、大きく不安定化する。そのために、ミスマッチを含むインベージョン複合体形成は、ほぼ抑制されたと考えられる¹⁾。

Table 4-2. Melting temperatures of the DNA/PNA duplexes in the invasion site in the presence of [NaCl] = 10 mM^a

(a) upper DNA/pcPNA ^(10a) duplex				
Base-pair change pattern		Sequence of DNA (5'-3')	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
Fully-matched DNA		5' -TCATCAGTAA-3'	66.0	–
	<u>A</u> /T	5' -TCAT <u>A</u> AGTAA-3'	44.2	21.8
C/G1829	T/ <u>A</u>	5' -TCAT <u>T</u> AGTAA-3'	52.0	14.0
	<u>G</u> /C	5' -TCAT <u>G</u> AGTAA-3'	43.3	22.7
	<u>A</u> /T	5' -TCA <u>A</u> CAGTAA-3'	47.7	18.3
T/A1828	<u>G</u> /C	5' -TCAG <u>G</u> CAGTAA-3'	48.7	17.3
	<u>C</u> /G	5' -TCA <u>C</u> CAGTAA-3'	59.3	6.7
	T/ <u>A</u>	5' -TC <u>T</u> TCAGTAA-3'	54.0	12.0
A/T1827	<u>G</u> /C	5' -TC <u>G</u> TCAGTAA-3'	53.4	12.6
	<u>C</u> /G	5' -TC <u>C</u> TCAGTAA-3'	52.3	13.7
	A/ <u>T</u>	5' -T <u>A</u> ATCAGTAA-3'	55.6	10.4
C/G1826	T/ <u>A</u>	5' -T <u>T</u> ATCAGTAA-3'	57.7	8.3
	<u>G</u> /C	5' -T <u>G</u> ATCAGTAA-3'	55.7	10.3
	<u>A</u> /T	5' - <u>A</u> CATCAGTAA-3'	65.0	1.0
T/A1825	<u>G</u> /C	5' - <u>G</u> CATCAGTAA-3'	65.4	0.6
	<u>C</u> /G	5' - <u>C</u> CATCAGTAA-3'	64.7	1.3
(b) lower DNA/pcPNA ^(10b) duplex				
Base-pair change pattern		Sequence of DNA (5'-3')	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
Fully-matched DNA		5' -TTACTGATGA-3'	67.9	–
	A/ <u>T</u>	5' -TTACT <u>T</u> ATGA-3'	47.7	20.2
C/G1829	T/ <u>A</u>	5' -TTACT <u>A</u> ATGA-3'	46.2	21.7
	<u>G</u> /C	5' -TTACT <u>C</u> ATGA-3'	45.6	22.3
	A/ <u>T</u>	5' -TTACTG <u>T</u> TGA-3'	60.2	7.7
T/A1828	<u>G</u> /C	5' -TTACTG <u>C</u> TGA-3'	58.1	9.8
	<u>C</u> /G	5' -TTACTG <u>G</u> TGA-3'	59.2	8.7
	T/ <u>A</u>	5' -TTACTGA <u>A</u> GA-3'	58.9	9.0
A/T1827	<u>G</u> /C	5' -TTACTGA <u>C</u> GA-3'	60.0	7.9
	<u>C</u> /G	5' -TTACTGA <u>G</u> GA-3'	59.9	8.0
	A/ <u>T</u>	5' -TTACTGAT <u>T</u> A-3'	65.0	2.9
C/G1826	T/ <u>A</u>	5' -TTACTGAT <u>A</u> A-3'	64.5	3.4
	<u>G</u> /C	5' -TTACTGAT <u>C</u> A-3'	63.0	4.9
	A/ <u>T</u>	5' -TTACTGATG <u>T</u> -3'	67.8	0.1
T/A1825	<u>G</u> /C	5' -TTACTGATG <u>C</u> -3'	67.4	0.5
	<u>C</u> /G	5' -TTACTGATG <u>G</u> -3'	66.7	1.2

^a Measurement conditions: [each of strands] = 2 μ M, [NaCl] = 10 mM, and [HEPES(pH = 7.0)] = 5 mM.

(2) 1826 部位の C/G 塩基対を別の塩基対に置換した場合

ミスマッチ塩基対により DNA/PNA 二本鎖の T_m は低下するが($\Delta T_m = 2.9\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 10.4\text{ }^{\circ}\text{C}$)、その ΔT_m 値は 1827 ~ 1829 部位にミスマッチが存在する場合と比べ小さい。特に lower DNA/pcPNA^(10b) の ΔT_m 値は小さく($\Delta T_m = 2.9\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4.9\text{ }^{\circ}\text{C}$)、ミスマッチが DNA/PNA 二本鎖を不安定化する度合いは小さい。その結果、ミスマッチが含まれるインベージョン複合体でさえも、高い効率で生成してしまったと考えられる(Figure 4-2 中の lanes 6-8)。

(3) 1825 部位の T/A 塩基対を別の塩基対に置換した場合

生じるミスマッチの種類とは無関係に、顕著な T_m の低下は見られなかった($\Delta T_m = 0.1\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 1.3\text{ }^{\circ}\text{C}$)。そのために Figure 4-2 の lanes 3-5 において、インベージョン複合体が、フルマッチの場合と同程度の効率で形成してしまったといえる。この結果は ARCUT の系での結果と同様に、DNA/PNA 二本鎖の末端に存在するミスマッチは T_m に大きな影響を与えないことを示す。

以上の結果から DNA/PNA 二本鎖では、末端に近づくにつれて塩基対形成の効果が薄れ、末端においては塩基対を形成していない可能性が示唆される。過去に DNA/PNA 二本鎖のミスマッチ認識能を評価した研究例は数多くあり、一般的には、二本鎖の中央付近に存在するミスマッチによって T_m が $8 \sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 程度低下するといわれる²⁾。これは PNA が剛直なために、隣接する塩基対に与える影響が DNA/DNA 二本鎖の場合と比較すると大きいことに由来する。しかし、これまでに DNA/PNA 二本鎖の末端にミスマッチが存在した場合に関しては、詳細な検討がなされていない。したがって、今後、末端のミスマッチ認識に関しては、どの程度、水素結合が寄与するのか、あるいは、スタッキング相互作用のみが働くのかといった観点から、より詳細な検討をする必要がある。

3-1-2 インベージョンのミスマッチ認識にあたる塩濃度の影響

[NaCl] = 10 mM 条件下では、DNA 二本鎖の安定性が低いために、ミスマッチを含むインベージョン複合体の形成を抑制できなかったと考えられる。そこで、インベージョン時に存在する NaCl 濃度をあげ DNA 二本鎖を安定化させることで、インベージョンにおけるミスマッチ認識能の向上を試みた。Figure 4-3 に [NaCl] = 30 mM 存在下でインベージョンさせた場合の結果を示す。

Invasion at [NaCl] = 30 mM

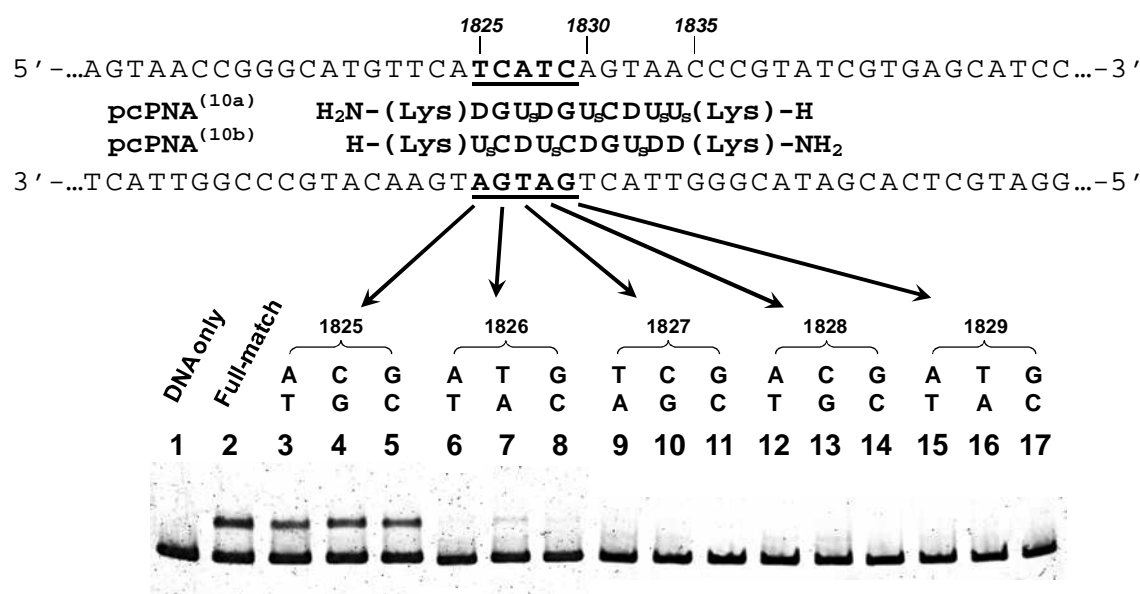


Figure 4-3. Gel-shift assay for the formation of invasion complex in the presence of 30 mM NaCl. (a) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-17, one base-pair (underlined) was changed to another base-pair as indicated. Reaction conditions: [DNA] = 20 nM, [each of pcPNAs] = 100 nM, [HEPES] = 5 mM, [NaCl] = 30 mM at pH = 7.0, 50 °C for 4 h.

結果から明らかなように、[NaCl] = 10 mM では識別できなかった 1826 部位の一塩基対の変異を、インベージョンで識別できる (lanes 6-8)。しかし、1825 部位の T/A 塩基対を置換した場合では、いずれのミスマッチが生じる場合であっても、インベージョン複合体が形成してしまう (lanes 3-5)。認識配列の末端に関しては、複合体形成時に生じる DNA/PNA 二本鎖の T_m が、ミスマッチの存在により、顕著に低下しないことを考えれば妥当であるといえる (Table 4-2 参照)。以上の結果から、インベージョン時に存在する塩濃度をあげることで、インベージョンの Fidelity を向上させることができるが、認識配列の末端の塩基対が置換された類似配列をインベージョンで識別できないことが分かった。そのため 10-mer の pcPNA をそろえた形でインベージョンさせた場合、インベージョンの Fidelity が保障される認識配列の部位は、末端を除く 8 塩基程度といえる。

塩濃度をさらに上げた高塩濃度条件下でも、[NaCl] = 30 mM の場合と同様な結果が得られた。一例として、[NaCl] = 10 mM 条件下でインベージョンさせた後に、終濃度が 100 mM になるように NaCl を加えた場合のゲルシフトアッセイの結果を Figure 4-4 に示す。

Invasion at [NaCl] = 100 mM

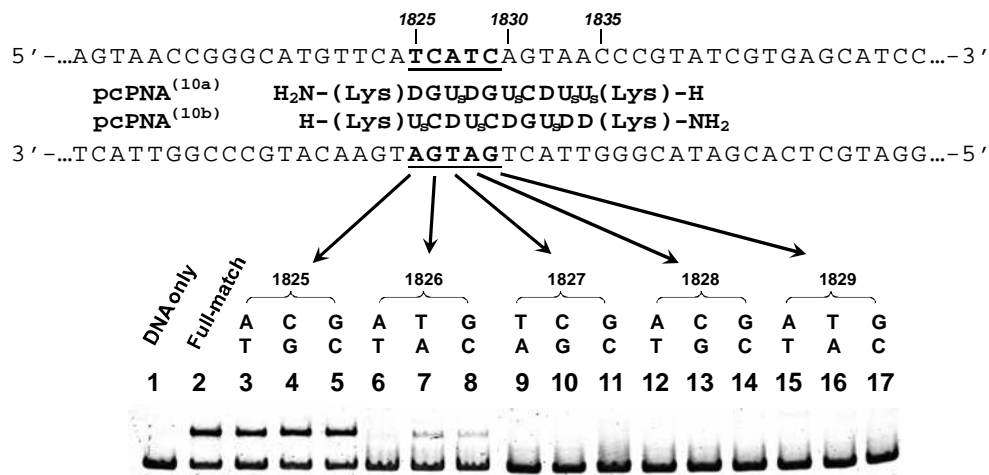


Figure 4-4. Gel-shift assay for the formation of invasion complex in the presence of [NaCl] = 100 mM. All gel-shift assays were carried out after the following reactions. Firstly, the invasion complex was formed in the presence of 10 mM NaCl. Then, NaCl was added to a final concentration of 100 mM, and the reaction solution was further incubated at 37 °C for 21.5 h. Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-17, one base-pair (underlined) was changed to another base-pair. Reaction conditions: [DNA] = 20 nM, [each of pcPNAs] = 100 nM, [HEPES] = 5 mM, [NaCl] = 100 mM at pH = 7.0, 37 °C.

結果から明らかなように、[NaCl] = 100 mM という高塩濃度条件下であっても、1825 部位の T/A 塩基対を置換した場合には、インベージョン複合体を形成してしまう。すなわち、10-mer pcPNA を用いたインベージョンでは、認識配列の末端が一塩基、置き換わった類似配列を識別できないことが、あらためて示された。

[NaCl] = 100 mM 存在下でのインベージョン複合体形成について詳細に検討するために、複合体形成時に生じる PNA/DNA 二本鎖の T_m を [NaCl] = 100 mM 存在下で測定した。結果を Table 4-3 に示す³⁾。全体的な傾向としては、[NaCl] = 10 mM 存在下で T_m を測定した Table 4-2 と全く同様であった。すなわち、内側にミスマッチが存在する場合には、ミスマッチにより DNA/PNA 二本鎖の T_m が大幅に低下する。しかし、認識配列の末端にあたる 1825 部位の T/A 塩基対を別の塩基対に置換した場合では、 T_m の低下は著しく小さい ($\Delta T_m = 0.9$ °C ~ 3.3 °C)。その結果、DNA/DNA 二本鎖が安定となる高塩濃度条件下であっても、末端にミスマッチを含むインベージョン複合体が形成してしまうと考えられる。

Table 4-3. Melting temperatures of the DNA/PNA duplexes in the invasion site in the presence of [NaCl] = 100 mM^a

(a) upper DNA/pcPNA ^(10a) duplex				
Base-pair change pattern		Sequence of DNA (5'-3')	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
Fully-matched DNA		5' -TCATCAGTAA-3'	60.0	–
C/G1829	<u>A</u> /T	5' -TCAT <u>A</u> AGTAA-3'	36.4	23.6
	T/ <u>A</u>	5' -TCATTAGTAA-3'	43.7	16.3
	<u>G</u> /C	5' -TCATGAGTAA-3'	35.6	24.4
T/A1828	<u>A</u> /T	5' -TCA <u>A</u> CAGTAA-3'	40.2	19.8
	<u>G</u> /C	5' -TCAGCAGTAA-3'	39.9	20.1
	<u>C</u> /G	5' -TCACCAGTAA-3'	49.8	10.2
A/T1827	T/ <u>A</u>	5' -TCTTCAGTAA-3'	45.3	14.7
	<u>G</u> /C	5' -TCGTCAGTAA-3'	44.2	15.8
	<u>C</u> /G	5' -TCCTCAGTAA-3'	44.1	15.9
C/G1826	<u>A</u> /T	5' -T <u>A</u> ATCAGTAA-3'	47.7	12.3
	T/ <u>A</u>	5' -T <u>T</u> ATCAGTAA-3'	49.3	10.7
	<u>G</u> /C	5' -T <u>G</u> ATCAGTAA-3'	46.9	13.1
T/A1825	<u>A</u> /T	5' - <u>A</u> CATCAGTAA-3'	56.7	3.3
	<u>G</u> /C	5' - <u>G</u> CATCAGTAA-3'	58.3	1.7
	<u>C</u> /G	5' - <u>C</u> CATCAGTAA-3'	58.0	2.0
(b) lower DNA/pcPNA ^(10b) duplex				
Base-pair change pattern		Sequence of DNA (5'-3')	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
Fully-matched DNA		5' -TTACTGATGA-3'	61.0	–
C/G1829	<u>A</u> /T	5' -TTACT <u>T</u> ATGA-3'	36.2	24.8
	T/ <u>A</u>	5' -TTACTAATGA-3'	35.8	25.2
	<u>G</u> /C	5' -TTACTCAGTA-3'	34.2	26.8
T/A1828	<u>A</u> /T	5' -TTACTG <u>T</u> TGA-3'	49.0	12.0
	<u>G</u> /C	5' -TTACTG <u>C</u> TGA-3'	44.4	16.6
	<u>C</u> /G	5' -TTACTG <u>G</u> TGA-3'	45.9	15.1
A/T1827	T/ <u>A</u>	5' -TTACTGA <u>A</u> GA-3'	46.1	14.9
	<u>G</u> /C	5' -TTACTGAC <u>G</u> A-3'	48.7	12.3
	<u>C</u> /G	5' -TTACTGAG <u>G</u> A-3'	47.7	13.3
C/G1826	<u>A</u> /T	5' -TTACTGAT <u>T</u> A-3'	55.5	5.5
	T/ <u>A</u>	5' -TTACTGAT <u>A</u> A-3'	55.0	6.0
	<u>G</u> /C	5' -TTACTGAT <u>C</u> A-3'	54.4	6.6
T/A1825	<u>A</u> /T	5' -TTACTGATG <u>T</u> -3'	60.1	0.9
	<u>G</u> /C	5' -TTACTGATG <u>C</u> -3'	59.5	1.5
	<u>C</u> /G	5' -TTACTGATG <u>G</u> -3'	59.6	1.4

^a Measurement conditions: [each of strands] = 2 μ M, [NaCl] = 100 mM, and [HEPES(pH = 7.0)] = 5 mM.

3-2 非対合部分をもたない 8-mer pcPNA による double-duplex インベージョン

これまでの結果から 10-mer の pcPNA をそろえた形でインベージョンさせた場合では、塩濃度を最適化した場合でも、末端のミスマッチを識別できなかった。そこで、より短い 8-mer の pcPNA をそろえた形でインベージョンさせた場合のミスマッチ認識を詳細に検討する。

3-2-1 低塩濃度条件下([NaCl] = 10 mM)での、インベージョン複合体形成について

一般的にインベージョンに用いられる低塩濃度条件下でインベージョン実験を行った。典型的な結果を、Figure 4-5 に示す。

Invasion at [NaCl] = 10 mM

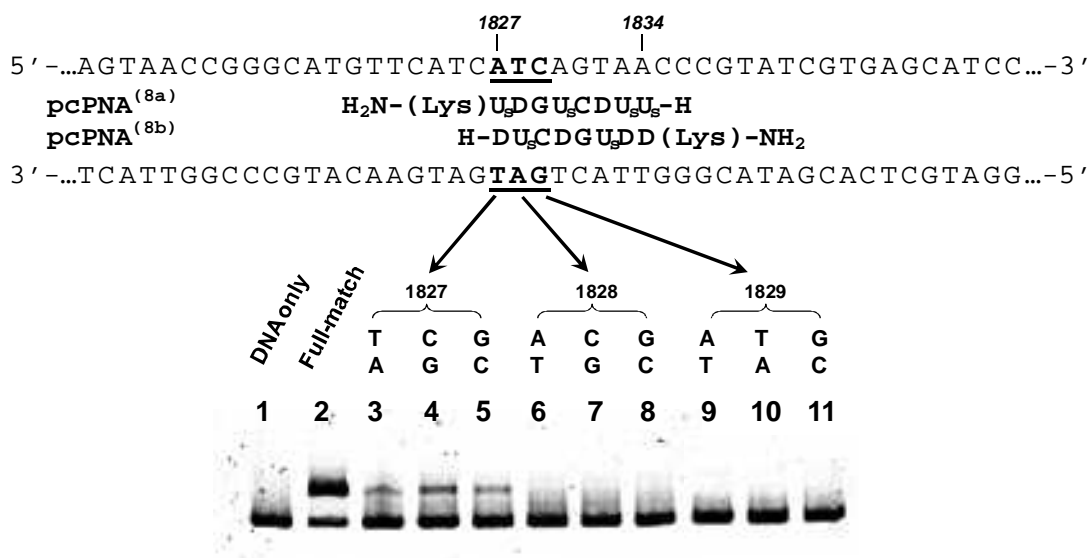


Figure 4-5. Gel-shift assay for the formation of invasion complex in the presence of [NaCl] = 10 mM. (a) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-11, one base-pair (underlined) was changed to another base-pair. Reaction conditions: [DNA] = 20 nM, [each of pcPNAs] = 100 nM, [HEPES] = 5 mM, at pH = 7.0 at 50 °C for 1 h.

まず、二本の pcPNA と認識配列が完全に相補的な場合では、高い効率で、インベージョン複合体が生じる(lane 2)。また、認識配列の中央付近である 1828 及び、1829 部位の一塩基対を置換した場合は、ミスマッチが識別され、インベージョン複合体の形成は抑制される結果となった(lanes 6-11)。その一方で、認識配列の末端にあたる 1827 部位の A/T 塩基対を別の塩基対に置き換えた場合は、生じる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してしまう (lanes 3-5)。つまり、末端部位でインベージョンの Fidelity が低下する結果となった。しかし 10-mer の pcPNA を用いた場合と比べ、インベージョン効率には明確な差が生じ、フルマッチの場合の方が高効率でインベージョンが起こることが分かった。

低塩濃度存在下での、インベージョン複合体の安定性について、複合体形成時に生じる DNA/PNA 二本鎖の T_m の観点から考察を行う。Table 4-4 に、[NaCl] = 10 mM における T_m 測定の結果を示す。

Table 4-4 Melting temperatures of the DNA/PNA duplexes in the invasion site in the presence of [NaCl] = 10 mM^a

(a) upper DNA/pcPNA ^(8a) duplex				
Base-pair change pattern		Sequence of DNA (5'-3')	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
Fully-matched DNA		5' - ATCAGTAA - 3'	47.8	—
	<u>A</u> /T	5' - AA <u>C</u> AGTAA - 3'	37.7	10.1
T/A1828	<u>G</u> /C	5' - AG <u>C</u> AGTAA - 3'	36.8	11.0
	<u>C</u> /G	5' - AC <u>C</u> AGTAA - 3'	39.2	8.6
	T/ <u>A</u>	5' - <u>T</u> TCAGTAA - 3'	44.5	3.3
A/T1827	<u>G</u> /C	5' - <u>G</u> TCAGTAA - 3'	43.6	4.2
	<u>C</u> /G	5' - <u>C</u> TCAGTAA - 3'	43.0	4.8
(b) lower DNA/pcPNA ^(8b) duplex				
Base-pair change pattern		Sequence of DNA (5'-3')	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
Fully-matched DNA		5' - TTACTGAT - 3'	55.1	—
	A/ <u>T</u>	5' - TTACTG <u>T</u> T - 3'	51.7	3.4
T/A1828	<u>G</u> /C	5' - TTACTG <u>C</u> T - 3'	52.4	2.7
	<u>C</u> /G	5' - TTACTG <u>G</u> T - 3'	49.3	5.8
	T/ <u>A</u>	5' - TTACTGA <u>A</u> - 3'	51.8	3.3
A/T1827	<u>G</u> /C	5' - TTACTGAC <u>C</u> - 3'	52.3	2.8
	<u>C</u> /G	5' - TTACTGAG <u>G</u> - 3'	53.2	1.9

^a Measurement conditions: [each of strands] = 2 μ M, [NaCl] = 10 mM, and [HEPES(pH = 7.0)] = 5 mM.

(1) 1828 部位の T/A 塩基対を別の塩基対に置換した場合

まず DNA と PNA とが完全に相補的な場合の T_m は、upper DNA/pcPNA^(8a) が 47.8 °C、lower DNA/pcPNA^(8b) が 55.1 °C であった。それに対し T/A 塩基対を別の塩基対に置換した場合、upper DNA/pcPNA^(8a) ではミスマッチの種類によらず T_m は大きく低下した(ΔT_m = 8.6 °C ~ 11.0 °C)。また同様に lower DNA/pcPNA^(8b) においても、 T_m の低下が見られた(ΔT_m = 2.7 °C ~ 5.8 °C)。すなわち、ミスマッチ塩基対の存在により、二組の DNA/PNA 二本鎖が同時に不安定化するために、インベージョン複合体の形成が抑制されたと考えられる(Figure 4-5, lanes 6-8)。

(2) 1827 部位の A/T 塩基対を別の塩基対に置換した場合

認識配列の末端部位にあたる A/T 塩基対を別の塩基対に置換すると、二組の DNA/PNA 二本鎖の T_m が共に低下する結果となった($\Delta T_m = 1.9\text{ }^{\circ}\text{C} \sim 4.8\text{ }^{\circ}\text{C}$)。1828 部位を置換した場合と比較すると、 ΔT_m 値は小さいものの、いずれのミスマッチが生じる場合であっても T_m は明確に低下する。しかし、 $[\text{NaCl}] = 10\text{ mM}$ 存在下では、この部位に存在する一塩基対の変異を、インベージョンで識別できない (Figure 4-5, lanes 3-5)。この要因は、塩濃度が低いために DNA 二本鎖が不安定であることに起因する。すなわち、後述するように、インベージョン時に存在する塩濃度をあげることで、1827 部位のミスマッチを厳密に識別できる。

3-2-2 インベージョンのミスマッチ認識にあたる塩濃度の影響

8-mer pcPNA を用いたインベージョンでは、インベージョン時に存在する塩濃度を上げることで、一塩基対の変異を完全に識別できる。Figure 4-6 に、[NaCl] = 30 mM 存在下でインベージョンさせた結果を示す。

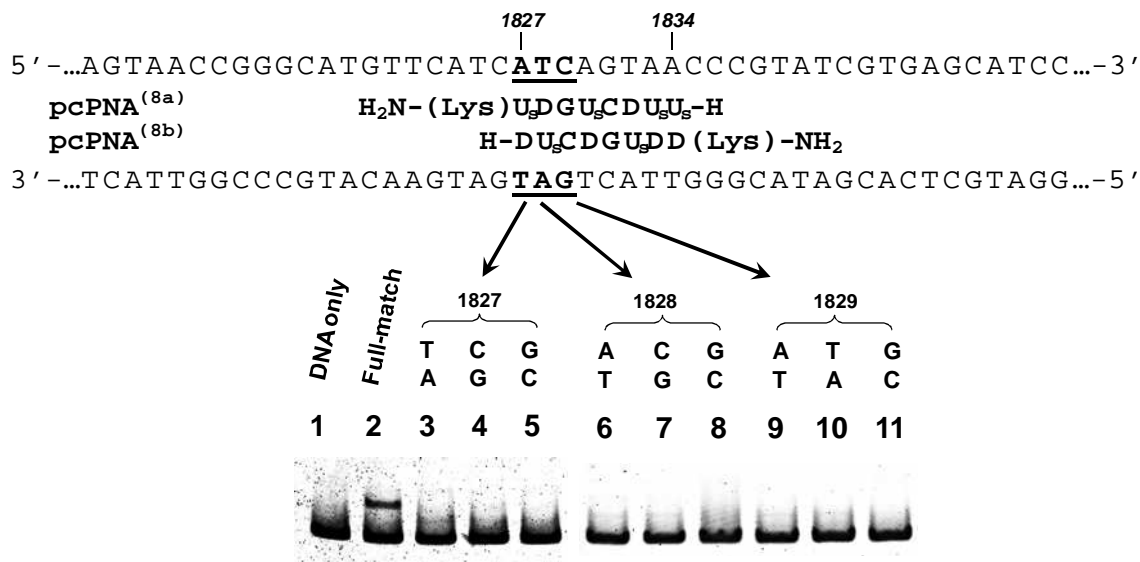


Figure 4-6. Gel-shift assay for the formation of invasion complex in the presence of [NaCl] = 30 mM. (a) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-11, one base-pair (underlined) was changed to another base-pair as indicated. Reaction conditions: [DNA] = 20 nM, [each of pcPNAs] = 100 nM, [NaCl] = 30 mM, [HEPES] = 5 mM, at pH = 7.0 at 50 °C for 4 h.

結果から明らかなように、[NaCl] = 30 mM 存在下で、インベージョンさせることで、末端に存在する一塩基対の置換を識別できる。つまり、8-mer pcPNA を用いれば、8 bp の認識配列を、完全な Fidelity で認識することができる。

塩濃度をさらに上げた高塩濃度条件下でも、8 bp の認識配列を厳密に認識できる。一例として NaCl が 100 mM 存在する条件下での、インベージョン複合体形成について、ゲルシフトアッセイにより評価した(Figure 4-7)。

Invasion at [NaCl] = 100 mM

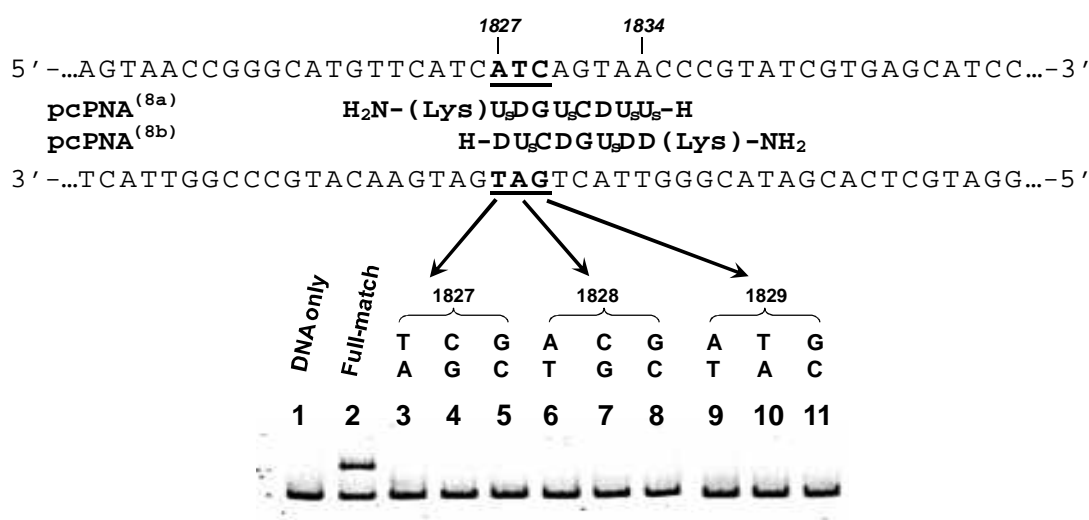


Figure 4-7. Gel-shift assay for the formation of invasion complex in the presence of [NaCl] = 100 mM. (a) Lane 1, DNA only; lane 2, fully-matched DNA; lanes 3-11, one base-pair (underlined) was changed to another base-pair. After all the invasion complexes were formed in the presence of 10 mM NaCl, NaCl was added to a final concentration of 100 mM, and the mixtures were further incubated at 50 °C for 15 min. Reaction conditions: [DNA] = 20 nM, [each of pcPNAs] = 100 nM, [HEPES] = 5 mM, [NaCl] = 100 mM at pH = 7.0.

まず、二本の pcPNA が完全に相補的な lane 2 では、インベージョン複合体の形成を確認することができる。その一方で、1827 ~ 1829 部位中の一塩基対を別の塩基対に置き換えた場合には、ミスマッチを含むインベージョン複合体の形成は抑制される(lane 3-lane 11)。すなわち、8-mer pcPNA を用いた場合には、10-mer pcPNA を用いた場合とは異なり、認識配列の末端に存在する一塩基対の違いを厳密に識別できることが、この結果からも示された。

高塩濃度条件下でのインベージョン複合体の安定性について検討するために、複合体形成時に生じる PNA/DNA 二本鎖の T_m を測定した([NaCl] = 100 mM 存在下)。結果を、Table 4-5 に示す。

Table 4-5. Melting temperatures of the DNA/PNA duplexes in the invasion site in the presence of [NaCl] = 100 mM^a

(a) upper DNA/pcPNA^(8a) duplex

Base-pair change pattern		Sequence of DNA (5'-3')	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
Fully-matched DNA		5' -ATCAGTAA-3'	42.1	-
T/A1828	<u>A</u> /T	5' -AA <u>A</u> CAGTAA-3'	30.1	12.0
	<u>G</u> /C	5' -AG <u>G</u> CAGTAA-3'	28.8	13.3
	<u>C</u> /G	5' -AC <u>C</u> CAGTAA-3'	31.4	10.7
	T/ <u>A</u>	5' - <u>T</u> TCAGTAA-3'	38.1	4.0
A/T1827	<u>G</u> /C	5' - <u>G</u> TCAGTAA-3'	36.7	5.4
	<u>C</u> /G	5' - <u>C</u> TCAGTAA-3'	36.4	5.7

(b) lower DNA/pcPNA^(8b) duplex

Base-pair change pattern	Sequence of DNA (5'-3')	T_m (°C)	ΔT_m (°C)
Fully-matched DNA	5' - TTACTGAT - 3'	49.9	–
T/A1828	A/T 5' - TTACTG T T - 3'	44.7	5.2
	G/C 5' - TTACTG C T - 3'	43.7	6.2
	C/G 5' - TTACTG G T - 3'	42.6	7.3
	T/A 5' - TTACTG A - 3'	46.3	3.6
A/T1827	G/C 5' - TTACTG A C - 3'	46.8	3.1
	C/G 5' - TTACTG A G - 3'	46.9	3.0

^a Measurement conditions: [each of strands] = 2 μ M, [NaCl] = 100 mM, and [HEPES(pH = 7.0)] = 5 mM.

全体的な傾向は Table 4-4 と同様であった。10-mer の pcPNA を用いた場合と異なり、8-mer pcPNA を用いた場合は、DNA/PNA 二本鎖の末端にミスマッチが存在する場合であっても、 T_m が顕著に低下する。そのために、末端のミスマッチでさえも、識別できたと考えられる。

第4節 まとめ

本章では ARCUT の系とは異なり、二本の pcPNA をそろえた形でインベージョンさせた場合のミスマッチ認識について、10-mer ならびに 8-mer の pcPNA を用いて検討した。まず 10-mer の pcPNA によるインベージョンでは、ゲルシフトアッセイを中心とした実験の結果、インベージョンのミスマッチ認識は、予想に反し、それほど高くないことが分かった。実際、低塩濃度条件下 ($[\text{NaCl}] = 10 \text{ mM}$) では、一塩基対変異の導入部位が末端に近づくにつれ、インベージョンの Fidelity は明らかに低下した。特に認識配列の末端の一塩基対が置き換わった場合は、フルマッチの場合と同程度のインベージョン効率で、ミスマッチを含むインベージョン複合体が形成される。

ARCUT の系と同様に、系中に存在する塩濃度を上げることで、インベージョンの Fidelity を高めることができる。しかし、塩濃度を最適化した場合であっても、末端に存在する一塩基対の変異をインベージョンで識別できないことが分かった。以上の結果から 10-mer の pcPNA によるインベージョンで厳密に認識可能な塩基配列は、塩濃度を最適化した場合であっても、認識配列の両末端を除く 8 塩基程度といえる。

一方で 8-mer の pcPNA を用いた場合では、適切な塩濃度条件下 (e.g., $[\text{NaCl}] = 30 \text{ mM}$) で、認識配列の末端に存在する一塩基対の変異を厳密に識別できる。つまり 8-mer pcPNA を用いれば、本来の認識配列とは一塩基対のみ異なる類似配列を、完全に識別できるといえる。したがって 10-mer pcPNA を用いるよりも、8-mer pcPNA を用いて 8 塩基の特定配列をインベージョンで認識する方が合理的である。

第4章 参考文献・脚注

- 1) 例外的に、1828 部位の T/A 塩基対を C/G 塩基対に置換し、upper DNA/pcPNA^(10a)間に D-C 塩基対が生じる場合は T_m 値が高く 59.3 °C であったが、複合体の形成は抑制された (Figure 4-2, lane 13)。このことから考えると、インベージョン複合体を形成するためには、複合体形成に関与する二本の DNA/PNA 二本鎖が共にある一定の熱力学的安定性をもつ必要があるといえる。すなわち 1828 部位の T/A 塩基対を C/G 塩基対に置換した場合は、対応する lower DNA/pcPNA^(10b)における不安定化が大きいために、複合体形成が抑制されたと考えられる。なお D-C 塩基対の T_m が、他のミスマッチの T_m よりも高くなる実験結果は、過去にも報告されている (G. Haaima, H. F. Hansen, L. Christensen, O. Dahl, and P. E. Nielsen, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 4639 (1997))。
- 2) a) M. Egholm, O. Buchardt, L. Christensen, C. Behrens, S. M. Freier, D. A. Driver, R. H. Berg, S. K. Kim, B. Nordén, and P. E. Nielsen, *Nature*, **365**, 566 (1993). b) K. K. Jensen, H. Ørum, P. E. Nielsen, and B. Nordén. *Biochemistry*, **36**, 5072 (1997).
- 3) [NaCl] = 100 mM 存在下での T_m 値は、[NaCl] = 10 mM 存在下での T_m 値に比べ低下する。これは、二本鎖形成時に、Na⁺を放出する必要があるためである。なお、この傾向は DNA/PNA 二本鎖の長さによらず、共通にみられる。

第5章 総括

第1節 本研究のまとめ

ここでは各章ごとの、簡単なまとめを行う。まず第2章では、ARCUTの切断反応におけるミスマッチ認識を詳細に検討するために、望みの切断配列とわずか一塩基対のみ異なる類似配列もつDNAを調製し、実際に、ARCUTによる切断実験を行った。その結果、15-merのpcPNAをインベージョンに用いるARCUTでは、14~16塩基配列を厳密に認識できることが分かった。すなわち、ARCUTの切断配列は $4^{14} \sim 4^{16}$ 塩基に一度だけ現れることになる。この配列認識能は、多くのゲノムDNAを位置選択的に切断できることを示唆する。したがって、巨大DNAのマニピュレーションを実現するうえで、ARCUTが強力なツールになることは疑う余地がない。

次に第3章ではpcPNAのインベージョンのミスマッチ認識に焦点をあて、ARCUTによる配列認識の機構について詳細な検討を行った。その結果、インベージョン複合体形成と、第2章で検討したDNA切断反応との間には、相関関係が成立することが分かった。すなわち、ミスマッチの有無にかかわらず、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。これはARCUTによるDNA切断が、インベージョンに支配されることを意味する。

また、インベージョンのFidelityが、系中に存在する塩濃度に大きく依存することが明らかになった。実際、ARCUTの切断実験で使った15-merのpcPNAを、塩の非存在下でインベージョンさせたところ、インベージョンのFidelityは全く保障されなかった。この結果は、塩の非存在下ではDNA二本鎖が不安定であるために、ミスマッチを含む複合体でさえも、高効率で形成することを示す。したがって、インベージョンで高いFidelityを実現するためには、塩を加えDNA二本鎖を安定化させることが必要である。

以上、第3章の実験結果から、pcPNAを用いたインベージョンのミスマッチ認識能は、必ずしも高くないことが明らかになった。しかし、ARCUTで用いているインベージョンは、Ce(IV)/EDTA錯体で切断可能なgap部位を生じる特殊な設計となっているために、一般的でない。そこで、過去に応用研究が行われている二本のpcPNAをそろえた形でインベージョンさせる場合のミスマッチ認識について、第4章で検討した。

まず10-merのpcPNAによるインベージョンのミスマッチ認識を検討した。一般的にインベージョンで用いられる低塩濃度条件下([NaCl] = 10 mM)でインベージョンさせたところ、インベージョンのFidelityは低く、末端付近に存在するミスマッチを識別できなかった。実験結果を基にすれば、10 bpからなる認識配列の両末端2 bpについてはFidelityが保障されない。すなわち、低塩濃度条件下([NaCl] = 10 mM)で、インベージョンで認識可能な塩基配列の長さは、中央付近のわずか6 bpのみである。

インベージョン時に存在する塩濃度を上げた場合、インベージョンのFidelityを高めることができる。たとえば、[NaCl] = 30 mM条件下でインベージョンさせれば、認識配列の両末端を除く8 bpを厳密に認識できる。しかし、この場合であっても、認識配列の末端の一

塩基対が置換された類似配列を識別できなかった。つまり 10-mer の pcPNA を用いたインベージョンにより、厳密に、認識可能な塩基配列の長さは両末端を除く 8 bp である。その一方で 8-mer の pcPNA をそろえた形で用いたインベージョンについて同様な検討をしたところ、塩濃度を最適化すれば、完全な Fidelity を実現できることが分かった。

以上、第 4 章の結果から、一般的に用いられるインベージョンにおいて、低塩濃度条件下([NaCl] = 10 mM)では、インベージョンの Fidelity が低いことが分かった。そのため、インベージョンを実際に応用する場合には、塩濃度をあげ Fidelity を改善させた状態で応用することが望ましい。しかし、その場合であっても、10-mer の pcPNA を用いた場合は、認識配列の末端の一塩基対が異なる類似配列をインベージョンで識別できないことに注意を払う必要がある。

第2節 結論

本研究での結論を以下に示す。

- ARCUT は 14-16 塩基配列を厳密に認識するために、ゲノム DNA を望みの配列のみで切断可能な高い位置特異性をもつ人工ツールといえる。
- ARCUT による DNA 切断反応は、インベージョンにより支配される。
- 低塩濃度条件下(e.g., $[\text{NaCl}] = 10 \text{ mM}$)におけるインベージョンの Fidelity は、従来の知見ほど高くない。しかし、塩濃度を上げることで、インベージョンの Fidelity を高めることができる。
- インベージョン時の塩濃度を最適化した場合でも、用いる PNA の長さによっては、末端のミスマッチを識別できないため、末端の認識に関しては特別な注意が必要となる。

業績リスト

学術論文

1. **Y. Miyajima**, S. Mizoguchi, A. Nakamura, Y. Kuroiwa, Y. Kato, and T. Watanabe
“Sensitization of the Primary Charge Separation in Photosystem I to Green Light by an Amphiphilic Polymer Bearing Rhodamine 6G”
Chem. Lett., **2006**, 35, 1034-1035.
2. S. Ye, **Y. Miyajima**, T. Ohnishi, Y. Yamamoto, and M. Komiyama
“Combination of peptide nucleic acid beacon and nuclease S1 for clear-cut genotyping of single nucleotide polymorphisms”
Anal. Biochem., **2007**, 363, 300-302.
3. **Y. Miyajima**, Y. Yamamoto, and M. Komiyama
“Promotion of PNA double-duplex invasion by glutaric dialdehyde”
Nucleic Acids Symp. Ser., **2007**, 51, 271-272.
4. **Y. Miyajima**, T. Ishizuka, and M. Komiyama
“Mismatch recognition in PNA double-duplex invasion”
Nucleic Acids Symp. Ser., **2008**, 52, 125-126.
5. **Y. Miyajima**, T. Ishizuka, Y. Yamamoto, J. Sumaoka, and M. Komiyama
“Origin of High Fidelity in Target-Sequence Recognition by PNA-Ce(IV)/EDTA Combinations as Site-Selective DNA Cutters”
J. Am. Chem. Soc., accepted.
6. **Y. Miyajima**, T. Ishizuka, and M. Komiyama
“Fidelity of PNA Double-Duplex Invasion is Poor Except for Under Optimal Salt Conditions”
in preparation.

解説論文

1. **宮島佳孝**、溝口信二、仲村亮正、黒岩善徳、加藤祐樹、渡辺正
“人工色素による光化学系Ⅰ電荷分離反応の分光増感”
生産研究、2006, 58, 147-151.
2. 堅田仁、**宮島佳孝**、小宮山眞
“人工ヌクレアーゼ”
超分子サイエンス ～基礎から材料への展開～ 投稿中.

学会において本人が口頭発表もしくはポスター発表した論文リスト

- (1) **宮島佳孝**・溝口信二・仲村亮正・黒岩善徳・加藤祐樹・渡辺正
“人工色素を修飾した両親媒性ポリマーによる光化学系 I 電荷分離反応の分光増感”
日本化学会第 85 回春季年会、神奈川（2005 年 3 月、口頭発表）
- (2) **宮島佳孝**・溝口信二・仲村亮正・黒岩善徳・加藤祐樹・渡辺正
“人工色素を修飾した両親媒性ポリマーによる新規光捕集系の構築”
電気化学会秋季大会、千葉（2005 年 9 月、口頭発表）
- (3) **宮島佳孝**・溝口信二・仲村亮正・黒岩善徳・加藤祐樹・渡辺正
“光化学系 I 電荷分離反応の分光増感 両親媒性ポリマーを用いた光捕集系の構築”
第 20 回生体機能関連化学シンポジウム、名古屋（2005 年 9 月、ポスター発表）
- (4) **宮島佳孝**・溝口信二・仲村亮正・黒岩善徳・加藤祐樹・渡辺正
“両親媒性ポリマーを用いた光捕集系による光化学系 I 電荷分離反応の分光増感
光捕集系の設計指針及びその最適化”
日本化学会第 86 回春季年会、千葉（2006 年 3 月、口頭発表）
- (5) **宮島佳孝**・溝口信二・仲村亮正・黒岩善徳・加藤祐樹・渡辺正
“人工色素を修飾した両親媒性ポリマーによる光捕集系の構築
増感波長領域および増感作用の検討”
電気化学会第 73 回大会、東京（2006 年 4 月、口頭発表）
- (6) **宮島佳孝**・大西利征・叶盛・山本陽治・小宮山眞
“PNA ビーコンとヌクレアーゼ S1 を併用した SNPs 検出”
バイオ関連化学合同シンポジウム・第 21 回生体機能関連化学シンポジウム、京都
（2006 年 9 月、口頭発表）
- (7) **宮島佳孝**・山本陽治・小宮山眞
“PNA のクロスリンクを利用した Double-duplex インベージョンの高効率化”
日本化学会第 87 回春季年会、大阪（2007 年 3 月、口頭発表）
- (8) **宮島佳孝**・山本陽治・小宮山眞
“架橋反応を利用した環状 PNA の合成とインベージョン特性の評価”
第 22 回生体機能関連化学シンポジウム、宮城（2007 年 9 月、ポスター発表）

- (9) **Yoshitaka Miyajima**, Yoji Yamamoto, and Makoto Komiyama
“ Promotion of PNA double-duplex invasion by glutaric dialdehyde ”
Fifth International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Tokyo, November, 2007, Poster presentation,
- (10) **宮島佳孝**・石塚匠・山本陽治・小宮山眞
“ ARCUT による DNA 切断におけるミスマッチ認識 ”
日本化学会第 88 回春季年会、東京（2008 年 3 月、口頭発表）
- (11) **宮島佳孝**・愛場雄一郎・石塚匠・堅田仁・任宜・尾谷孝祐・鈴木裕太・
ロンバリトマス・嶋成実・須磨岡淳・小宮山眞
“ 巨大 DNA をターゲットとした人工 DNA カッター(ARCUT)の実用性評価 ”
第 18 回バイオ・高分子シンポジウム、東京（2008 年 7 月、口頭発表）
- (12) **Yoshitaka Miyajima**, Takumi Ishizuka, and Makoto Komiyama
“ Mismatch recognition in PNA double-duplex invasion ”
Joint Symposium of 18th International Roundtable on Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids and 35th International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, Kyoto, September, 2008, Poster presentation,
- (13) **宮島佳孝**・石塚匠・山本陽治・小宮山眞
“ ARCUT による DNA 切断におけるミスマッチ認識 ”
バイオ関連化学合同シンポジウム・第 23 回生体機能関連化学シンポジウム、京都
（2008 年 9 月、口頭発表）

受賞歴

日本化学会第 87 回春季年会 学生講演賞(2007 年 3 月)

謝辞

本研究をまとめるにあたり、的確な指導を頂きました東京大学教授、小宮山眞先生に心より感謝を申し上げます。また、本博士論文の審査をお願いした渡辺正教授、菅裕明教授、鈴木勉教授、須磨岡淳講師に感謝いたします。

セミナー等を通じ、本研究に関して様々な助言をしていただきました、葛谷明紀助教、徐岩助教、嶋成実助教に感謝を申し上げます。また、日々の研究生活において、多くの面でサポートしていただいた、博士課程在学中の愛場雄一郎氏、石塚匠氏、堅田仁氏に感謝します。同時に、この 3 年間、様々な角度から鋭い指摘を下さった修士課程、大西利征氏をはじめ、日々の生活を共にした研究室の皆様に深く感謝致します。また、本研究のベースとなる人工制限酵素 ARCUT の開発に大きく貢献された山本陽治博士、北村佳仁博士に深く感謝いたします。

最後に、物心両面において私の研究生活を支えてくれた両親、兄弟はじめ、多くの友人達に感謝します。