

ホーミングエンドヌクレアーゼの配列特異性の改変

DNA を配列特異的に切断する制限酵素の、生物学、医学における重要性は計り知れない。II 型制限酵素のように 1 種類のタンパク質で配列特異的に DNA を切断するものとして、他にホーミングエンドヌクレアーゼ、そして、配列特異的なレトロトランスポゾンのエンドヌクレアーゼがある。これらの配列特異的なエンドヌクレアーゼの標的配列を改変して、自由に新しい配列特異性を持ったエンドヌクレアーゼを作ることができるならば、さぞ便利であろう。多くの研究者がそう考えて研究を行ってきたが、配列特異性は疎水性、水素結合、静電相互作用など様々な要素が絡み合って実現されており、改変は至難の業である。

しかしながら、LAGLIDADG ファミリーのホーミングエンドヌクレアーゼに関しては幾ばくかの成功を収めていると言って良いだろう。ホーミングエンドヌクレアーゼは制限酵素に比べてかなり長い DNA 配列を認識するため、DNA 配列あるいはタンパク質のアミノ酸配列の変化に対してある程度の耐性を持っている。また、結晶構造が決定されたものが多く、II 型制限酵素に比べると配列の保存性が高いのも改変が試みられている理由であろう。

Chevalier らは I-DmoI と I-CreI の 2 つのホーミングエンドヌクレアーゼを融合して新しい配列特異性を持ったエンドヌクレアーゼを作ること成功した

(Chevalier et al. 2002)。LAGLIDADG ファミリーのホーミングエンドヌクレアーゼには、LAGLIDADG モチーフを 1 つ持ち二量体で働くものと、モチーフを 2 つ持ち単量体で働くものがある。I-DmoI は後者、I-CreI は前者である。モチーフを 2 つ持つものは元々 1 つ持つものが 2 つ融合した由来を持つものであり、標的配列の前側、後ろ側をそれぞれの LAGLIDADG モチーフが認識し、切断する。そこで、I-DmoI の N 末側の半分と I-CreI とを融合したタンパク質を合成し、E-DreI と命名した。しかし、そのまま融合させるとアミノ酸同士が衝突してしまうため、コンピュータを使ったモデリングによってそのような残基を改変した。残念ながらこのタンパク質は不溶化してしまったため、さらに DNA との結合領域のコンピュータモデリングからより安定な構造を予測し、多数の改変ホーミングエンドヌクレアーゼを作成した。また、2 つのドメインの間には、-NGN- のリンカーを挟んだ。最終的には 3 種類の E-DreI が可溶化し、精製できた。

I-DmoI、I-CreI の標的配列とそれを真ん中でつなぎ変えた DNA を用意し、I-DmoI、I-CreI と 3 種類の E-DreI のそれぞれの DNA の切断活性を調べた。I-DmoI、I-CreI は本来の標的配列のみを切断した。E-DreI は 5' 側が I-CreI の標的配列で 3' 側が I-DmoI の標的配列となっているキメラ標的配列は切断したが、逆の並び順の DNA は切断しなかった。内一つの E-DreI では特定の位置を切断することが確認され、4 塩基の 3' 突出となるように切断した。I-DmoI も I-CreI も 4 塩基の 3'

突出ができるように切断する性質を持つので、E-DreI もこの性質が保存されていると言える。続いて E-DreI と DNA との共結晶構造を決定したところ、コンピュータによる予測とかなり良く似ており、RMSD は 0.8 Å だった。(RMSD はモデルと実際の結晶構造が近いほど小さな数値となる。) DNA との結合表面もよく予測されていた。

既存のエンドヌクレアーゼのアミノ酸を少しいじって新しい配列特異性を持たせる方法も考えられる。Ashworth らはコンピュータモデリングを利用して、ホーミングエンドヌクレアーゼ I-MsoI の標的配列を改変することに成功した (Ashworth et al. 2006)。I-MsoI は LAGLIDADG ファミリーに属するホーミングエンドヌクレアーゼで 20-24 塩基対の長い DNA を標的として認識し、特異的に切断する。実際の標的配列は、

```
gCAGAACGTC  GTGA ↓ GACAGTTCc      標的 DNA
cGTCTTGcAG ↑ CACT  CTGTCAAGGc
```

である。

コンピュータを使って DNA と I-MsoI との結合表面での原子レベルの力場を計算することで、最もエネルギー的に不安定になるような DNA 上の塩基置換を探したところ、中心から 6 塩基遡った C:G 対を G:C 対に変更し、6 塩基下流の A:T 対を C:G 対に変更する (下図参照) と +3.2kcal だけ不安定になることが予測された。続いて、この置換 DNA (-6G:C&+6C:G) に対して最も安定して結合するような I-MsoI の変異をモンテカルロサンプリング法によって探索したところ、28 番目のリシンをロイシンに (K28L)、83 番目のスレオニンをアルギニンに (T83R) すると -4.2kcal だけ安定化することが予測された。この変異 I-MsoI (I-MsoI-K28L-T83R) は I-MsoI の標的 DNA (-6C:G&+6A:T) に対しては、I-MsoI に比べて +1.6kcal だけ不安定化すると予想される。

```
gCAGAAGGTC  GTGA ↓ GACCGTTCCg      変異 DNA
cGTCTTCcAG ↑ CACT  CTGGCAAGGc
```

実際に *in vitro* で切断特異性を検定したところ、野生型の I-MsoI が標的 DNA を効率よく切断し、変異 DNA をあまり切断しないのに対して、変異 I-MsoI は変異 DNA を効率よく切断した。酵素の濃度を変化させて、同一量の DNA に対する切断能を調べると、I-MsoI は濃度 100nM で標的 DNA を切断し始め、6.4 μM でもほとんど変異 DNA を切断しなかった。逆に変異 I-MsoI は 200nM で変異 DNA を切断でき、3.2 μM 以上の場合に野生型 DNA の切断が起こった。つまり、I-MsoI は野生型 DNA に対して変異 DNA の 128 倍以上の特異性を示し、変異 I-MsoI は変異 DNA に対して野生 DNA の 32 倍の特異性を示した。ここからは、配列特異性に 4000 倍の変化が生じた計算になる。切断だけではなく、DNA との結合においても顕著な配列特異性が観察され、ゲルシフトアッセイでは 13000

倍もの違いが見られた。更に Ashworth らは原子モデルの信頼性を確かめるために変異 I-MsoI の変異 DNA との結合結晶構造を決定し、モデルと非常に良く似ていることを示している。

この2本の論文に共通するのは、コンピュータによる原子モデリングを利用することで効率よく新しい配列特異性を持ったホーミングエンドヌクレアーゼを作成していることである。コンピュータによるモデリングの精度が上がれば、より容易に新しい配列特異性を付与できる可能性がある。とはいえ、新しい配列特異性は元の配列特異性に強く依存しており、これまでのように自然界にある新しい配列特異的エンドヌクレアーゼの探索も並行して進められるべきであることは確かである。

Chevalier BS, Kortemme T, Chadsey MS, Baker D, Monnat RJ, Stoddard BL.

Design, activity, and structure of a highly specific artificial endonuclease.

Mol Cell. 2002 Oct;10(4):895-905.

Ashworth J, Havranek JJ, Duarte CM, Sussman D, Monnat RJ Jr, Stoddard BL, Baker D.

Computational redesign of endonuclease DNA binding and cleavage specificity.

Nature. 2006 Jun 1;441(7093):656-659.

2006/07/24

小島 健司 著
禁 無断複写転載