

令和6年5月1日

公益財団法人富山第一銀行奨学財団

理事長 横田 格 殿

助成研究成果概要報告書

教育機関名 : 富山大学	助成金額 : 950 千円	
研究代表者 : 迫野 昌文	所属 : 学術研究部 工学系	職位 : 准教授
研究題目 : 安全なゲノムの書き換えを実現する DNA 結合タンパク質の開発		

研究概要

本研究は、DNA の一塩基の違いを高正確に認識可能なゲノム編集技術を開発し、安全な遺伝子治療手法の構築を目的とする。近年、ゲノム中の特定の塩基配列を改変するゲノム編集技術、遺伝子疾患の治療に適応する試みがなされている。生体内で直接ゲノム編集を行う治療は“in vivo 遺伝子修正”と呼ばれ、次世代遺伝子治療技術として注目されている。遺伝子修正による治療効果を上げるためには、ターゲット以外の書き換え（オフターゲット効果）の抑制が重要であり、予定外の遺伝子書き換えにともなうガン化リスクを避ける必要がある。一塩基の違いを区別できるゲノム編集方法が開発されれば、異常な細胞の遺伝子のみを選択的に編集する新しい遺伝子治療が発展することが期待される。

成果要約

本研究では、転写活性化因子様エフェクター（TALE）ベースゲノム編集ツールを用いた。TALE リピート3 のミスマッチが DNA-TALE 複合体形成に及ぼす影響を調べた。KRASwt 配列に結合する TALE1 のリピート3 にミスマッチが1つ存在する dsDNA を用いて蛍光偏光アッセイを行った。その結果、この TALE1 は dsDNA1 と良好に相互作用した。dsDNA1 と TALE の推定会合定数は $3.50 \mu\text{M}^{-1}$ で、KRASwt 配列との会合定数とほぼ同じであった。リピート2 と3 の2ヶ所にダブルミスマッチを持つ dsDNA でも同様の実験を行ったところ、シングルミスマッチの結果とは異なり、複合体形成量が著しく減少することが示された。TALE1 とダブルミスマッチ dsDNA の推定会合定数は $0.77 \mu\text{M}^{-1}$ 以下であり、二重のミスマッチが TALE-DNA 複合体形成に悪影響を及ぼしていることが示唆された。

ダブルミスマッチを用いた標的配列の正確な認識は、類似配列の非選択的ゲノム編集を効果的に抑制することが期待される。TALEN による in vitro DNA 配列切断は、ダブルミスマッチに基づいて設計した TALE を用いて行った。TALEN-L と TALEN-R を設計し、KRAS 遺伝子を含む DNA と混合し、一定時間後に電気泳動を行って DNA 切断を評価した。シングルミスマッチをベースとした TALEN-L を用いた場合、どの種類の DNA でも明らかなバンドの消失が観察されたが、ダブルミスマッチベースの TALEN-L を用いた場合は、KRASmut(GAT)配列を含む DNA バンドのみが消失した。したがって、ダブルミスマッチに基づく TALE 設計は、ゲノム編集における厳密な DNA 認識特異性の向上につながると期待される。

<p>研究成果 発表状況</p>	<p>【雑誌論文、学会発表、図書、新聞掲載、作成 Web ページ、特許権等の出願・取得状況】</p> <p>田村 和也・迫野 昌文(富山大院理工)酵素修飾法を用いた DNA 結合タンパク質 TALE の機能化, 第 13 回 CSJ 化学フェスタ 2023 年 10 月</p>		
<p>経費の 執行状況</p>	<p>区 分</p>	<p>執行額 (円)</p>	<p>備 考</p>
	<p>【物品費】</p> <p>試薬類</p> <p>プラスチック消耗品</p> <p>生物試料</p> <p>合成 DNA</p>	<p>685000</p> <p>70000</p> <p>25000</p> <p>10000</p>	
	<p>【旅費】</p>		
	<p>【謝金】</p>		
	<p>【その他】</p> <p>DNA シーケンス解析</p> <p>実験ノート</p>	<p>140000</p> <p>20000</p>	
	<p>合計</p>	<p>950000 円</p>	