

2023 年度年次報告書
生命現象と機能性物質
2023 年度採択研究代表者

平泉 将浩

東京大学 大学院工学系研究科
助教

リコンビナーゼ改変体を用いた新規ノックイン技術の創製

研究成果の概要

近年、様々なゲノム編集ツールの利用により、遺伝子ノックアウトなどのゲノム編集が可能になった。しかし、長鎖 DNA のノックインは依然として難しい。従来の長鎖 DNA のノックイン技術は、2本鎖切断による予期せぬゲノムの欠失変異の危険性、相同組換え活性の低さ、非分裂細胞に適用できない課題を抱えている。そこで注目されているのが、2本鎖切断を起こさず、相同組換えに依存せずに様々な細胞で利用可能なラージセリンリコンビナーゼ (LSR) である。LSR はファージが自己ゲノムを宿主ゲノムに組み込む際に用いられる部位特異的組換え酵素である。

本研究では、LSR ホモログの多様な標的 DNA 認識機構に着目し、その詳細なメカニズムを生化学的・構造生物学的手法(クライオ電子顕微鏡や次世代シーケンサー等)によって解明する。構造機能解析の結果から、LSR の標的 DNA 認識機構を包括的に理解し、塩基特異性の異なる様々な LSR 改変体を開発する。これにより、LSR を用いた遺伝子ノックイン技術の適用範囲を大幅に拡張する。

今年度は、DNA 特異性の高い LSR ホモログとヒトゲノムの配列に直接ターゲット可能な LSR ホモログに注目して、タンパク質調製検討・構造解析・機能解析を進めた。DNA 特異性の高い LSR ホモログについては、クライオ電子顕微鏡による単粒子構造解析を用いて複数の反応過程の構造決定に成功した。さらに、得られた構造をベースに配列認識を改変可能な変異体を同定した。ヒトゲノムの配列に直接ターゲット可能な LSR ホモログについては、タンパク質調製の際に凝集してしまう問題等が発生してしまっていたが、精製バッファーに界面活性剤を加えることで、高純度の精製試料の調製に成功した。今後は、標的 DNA との再構成方法を詰め、構造解析検討を実施する。