122 改変リコンビナーゼを用いた新規ノックイン技術の創製

東京大学 大学院工学系研究科 化学生命工学専攻　　平泉　将浩

【背景・目的】DNA 型トランスポゾンの IS110 ファミリーは、特定のゲノム配列を標的とし、環状 DNA 中間体を介して転移する独特な性質を有するが、その分子機構は不明であった。本研究は、IS110 ファミリーのリコンビナーゼが特異的な非コード RNA（ブリッジ RNA）と複合体を形成し、RNA を介して標的 DNA（tDNA）とドナーDNA（dDNA）の配列特異的組換えを触媒する仕組みを明らかにし、その構造基盤と応用可能性を探ることを目的とした。

【方法】大腸菌由来の IS110 ファミリーの IS621 を用いて RNA-seq 解析によりブリッジ RNA を同定し、その構造を二次構造予測および相同性解析で決定した。さらに、精製した IS621 リコンビナーゼとブリッジ RNA を用いた *in vitro* 組換え反応系を構築した。また、クライオ電子顕微鏡（cryo-EM）による IS621 リコンビナーゼ - ブリッジ RNA-DNA 複合体の構造解析を行い、反応途中の複数の中間状態の立体構造を高分解能で決定した。

【結果】IS621 は、環状 DNA から約 177 塩基の非コード RNA（ブリッジ RNA）を発現していた。この RNA は 2 つのループ構造を持ち、それぞれ tDNA および dDNA と塩基対を形成して両 DNA 間を特異的に認識していた。構造解析により、この複合体が 4 分子の IS621 リコンビナーゼから成る二量体同士の四量体複合体であることが明らかとなった。各二量体はブリッジ RNA の異なるループと結合し、それぞれ tDNA と dDNA を識別していた。さらに、複合体の中央には RuvC 様ドメインと Tnp ドメインにより構成される活性部位が形成され、ここで tDNA および dDNA の特定部位が切断され、共有結合型のセリン-5'リン酸中間体が形成されていた。続いて、DNA 鎖が交換され、ホリデイジャンクション中間体が生じる過程も捉えることに成功した。

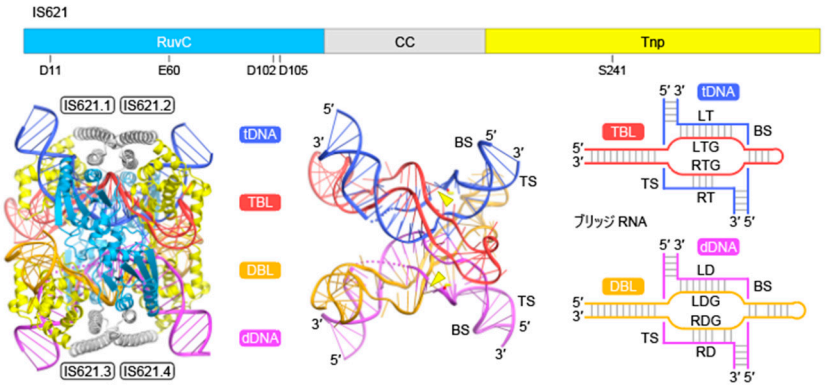
【考察】本研究により、IS110 ファミリーが従来知られていなかった RNA 誘導型の DNA 組換え機構を利用していることが初めて明らかとなった。特に、ブリッジ RNA の存在はタンパク質のみを介した従来型トランスポゾン機構とは異なり、配列特異的なゲノム再編成を実現する新規なシステムである。また、この RNA 誘導システムは tDNA および dDNA のガイド配列の人工的改変により、任意のゲノム配列間で、精密かつ効率的な組換え反応を引き起こせることから、今後ゲノム編集ツールとして広く応用されることが期待される。

【発表】

1）　2024 年 7 月　第 30 回日本遺伝子細胞治療学会学術集会、招待講演

2）　Hiraizumi M, Perry N, Durrant M, Soma T, Nagahata N, Okazaki S, Athukoralage J, Isayama Y, Pai J, Pawluk A, Konermann S, Yamashita K, Hsu P* & Nishimasu H*. Structural mechanism of bridge RNA-guided recombination. Nature. 2024, 630, 994–1002. Epub 2024 Jun 26. PMID: 38926616 DOI: 10.1038/s41586-024-07570-2

3）　Durrant M, Perry N, Pai J, Jangid A, Athukoralage J, Hiraizumi M, McSpedon J, Pawluk A, Nishimasu H, Konermann S & Hsu P*. Bridge RNAs direct programmable recombination of target and donor DNA. Nature. 2024, 630, 984–993. Epub 2024 Jun 26. PMID: 38926615 DOI: 10.1038/s41586-024-07552-4



IS621 リコンビナーゼ－ブリッジ RNA－dDNA－tDNA 複合体の立体構造