

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19890184

研究課題名（和文） ペプチド工学に基づいた人工転写因子による、新規癌予防法の開発

研究課題名（英文） A novel approach for cancer prevention by artificial transcription factor based on peptide engineering

研究代表者 仲 裕美 (NAKA HIROMI)

京都府立医科大学・医学研究科・助教

研究者番号：10453119

研究成果の概要：近年、癌抑制遺伝子 p53 の失活が発癌の引き金になっていることが明らかにされた。変異した p53 蛋白質に代わって p53 下流遺伝子 p21 の転写を促進するような人工転写因子を開発し、癌予防への応用を試みた。本研究では、二本鎖 DNA に結合して三重鎖を形成することができる TFO に転写活性化能を持つペプチド配列を融合させて、三重鎖形成領域の転写を活性化できる『人工転写因子』の作製法を確立し、人工転写因子を使った転写活性化システムの構築が可能かを検証した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,240,000	0	1,240,000
2008 年度	1,260,000	378,000	1,638,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	378,000	2,878,000

研究分野:医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：癌・ペプチド・核酸・転写・p53

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 癌予防法の開発は社会的に重要な課題である。

近年の研究により、発癌のメカニズムの大部分が明らかにされており、癌抑制遺伝子 p53 の失活が、多くのヒト発癌の引き金になっていると考えられている。したがって、この経路の回復が効果的な癌予防法につながる。

(2) p53 下流遺伝子の発現促進は癌予防につながる。

正常な状態では、細胞の遺伝子に損傷が生じると p53 タンパクは p21 遺伝子のような p53 下流遺伝子の転写を促進して（転写 ON）、p21 のタンパク量を増加させる。p53 タンパクは、p21 遺伝子の発現量を調節するプロモーター領域に結合し転写因子として働く。p21 タンパクは細胞の増殖を停止させる働きを持つので、細胞増殖が抑制されて損傷した



遺伝子の修復が行われる。この p53 の働きが癌抑制に重要である。しかし、p53 遺伝子に変異が生じて変異型 p53 タンパクが作られた時には、p21 遺伝子のプロモーター領域に結合できなくなり、p21 遺伝子の転写を促進できなくなる (転写 OFF)。その結果、p21 タンパクが作られなくなり細胞増殖は促進してしまう。細胞内の様々な遺伝子に損傷が生じて修復することができなくなり発癌にいたる。したがって、p53 の機能を回復させることが癌予防に重要である。変異した p53 を元通りにすることは困難であるが、p53 タンパクに代わって p21 遺伝子の転写を促進することは可能である。そこで、私は p21 遺伝子の転写を促進する人工転写因子を開発し、発癌過程で失活した p53 の機能を相補することで癌予防に応用することを考案した。

## 2. 研究の目的

### p21 遺伝子の転写を促進する人工転写因子を開発する。

p53 下流遺伝子 p21 に変異が生じることはまれであるため、p21 の発現量を増やすことができれば、p53 の癌抑制機能を代償して癌を予防できると考えられる。そこで、p21 遺伝子だけの発現を特異的に増加させる働きを持つ人工転写因子の開発を試みる。

## 3. 研究の方法

図 1 に示したように、本研究で作製する人工転写因子は次のような三つの構造から構成される。

### (1) 膜透過性領域

人工転写因子を細胞内に導入するために TAT タンパクの膜透過性領域のペプチド配列を用いる。このペプチド配列は細胞および動物実験によって効率良く細胞内に導入できることが確認されており、また重篤な副作用も引き起こさない安全性も確かめられている。

### (2) 転写活性化領域

多くの転写因子が有するプロリンリッチ領域を最小限のペプチド配列として用いる。このプロリンペプチド配列は膜透過性ペプチド配列に連結させた形にしてペプチド合成機で合成する。

### (3) DNA 結合領域

p21 遺伝子のプロモーター領域の DNA 配列に特異的に結合するデオキシリボオリゴヌクレオチドを用いる。プロモーターの DNA は二本鎖として存在するが、配列特異的なデオキシリボオリゴヌクレオチドが結合して三本鎖を形成できるこのようなデオキシリボオリゴヌクレオチドは Triplex-forming oligonucleotide (TFO) と呼ばれている。TFO

を合成し上記ペプチドと架橋させる。

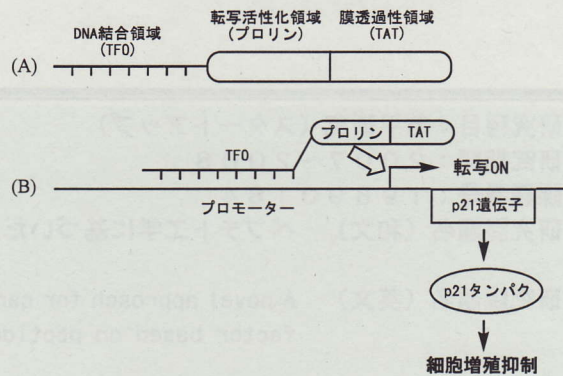


図 1

(A) 本研究で作成する人工転写因子の構造  
(B) 人工転写因子の作用

人工転写因子は p21 遺伝子プロモーターに結合し、p21 タンパク量を増やすことで細胞増殖を抑制する。

まずモデル実験として、TFO 結合配列を導入したレポータープラスミドを人工的に作製し、人工転写因子が転写活性化能を発揮できるか検証する。

### ① 人工転写因子の作製

膜透過性領域と転写活性化領域をつなげたペプチドをペプチド合成機にて合成する。外部発注にて合成した DNA 結合領域 (TFO) とペプチドを二価性架橋剤を用いてコンジュゲートする。

### ② 細胞内導入効率の検討

作成した転写因子は効率良く細胞内に導入されることが必要である。TAT 膜透過性ペプチドは高効率で細胞内に導入することができるので、作製した人工転写因子を FITC 蛍光標識し、導入効率を蛍光顕微鏡を用いて確認する。

### ③ レポータープラスミドを用いた転写活性化能の検討

ルシフェラーゼ遺伝子の上流に TFO 結合配列を導入したプラスミドを作製し、この配列に TFO オリゴヌクレオチドが結合できることをゲルシフト法にて確認する。次に、人工転写因子モデルが完成した後、この配列に結合が可能かゲルシフト法にて確認する。また、このプラスミドを導入した細胞に人工転写因子を添加し転写を活性化できるか、発光量を測定するルシフェラーゼ法にて検証する。

上記の結果をふまえて、実際に p21 遺伝子プロモーター上の TFO 結合配列を利用し、転写が活性化され p21 タンパク量を増やせるか確認する。



#### 4. 研究成果

平成19年度において、DNA型TFOを用いて初期人工転写因子モデルの作製に成功した。レポータープラスミドを利用したルシフェラーゼアッセイにて転写活性を評価したが、活性化能は認められなかった。

そこで、大阪大学大学院薬学研究科の今西武先生らが開発したBNA(bridged nucleic acid)という人工核酸を用いたTFOを用いることにした(図2)。このBNAは、天然核酸の“形の自由度”を拘束することにより、標的となるDNAやRNAに対する結合親和性を高め、かつヌクレアーゼ(核酸分解酵素)耐性をも獲得した架橋構造を核酸分子内に持つ人工核酸である。

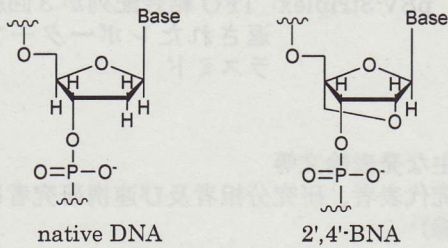


図2 DNAとBNA

#### 【本研究で利用したBNA型TFO】

Seq1 :  
Acr-5'-(mc)T(mc)TtCtTtT(mc)TtT(mc)-3'-(EG)<sub>6</sub>-C<sub>6</sub>SH

Seq-2 :  
Acr-5'-(mc)T(mc)TtCtTtT(mc)TtT(mc)-3'-TTTT-C<sub>6</sub>SH

Seq-3 :  
Acr-5'-(mc)T(mc)TtCtTtT(mc)TtT(mc)-3'-C<sub>6</sub>SH

(upper case : 2',4'-BNA(LNA), lower case : DNA, (mc) : 5-methyl-dC)

さらにリンカー部位の長いTFO、ペプチドを5'末端側につなげられるTFO

Seq1\* :  
Acr-5'-(mc)T(mc)TtCtTtT(mc)TtT(mc)-3'-(EG)<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>SH (long linker)

Seq1 reverse :  
HSC<sub>6</sub>-(EG)<sub>3</sub>-5'-(mc)T(mc)TtCtTtT(mc)TtT(mc)-3'-Acr (reverse type)

Seq1\* reverse :  
HSC<sub>6</sub>-(EG)<sub>3</sub>-5'-(mc)T(mc)TtCtTtT(mc)TtT(mc)-3'-Acr (long linker reverse type)

#### (1) 人工転写因子モデル POC (peptide oligonucleotide conjugate) の作製

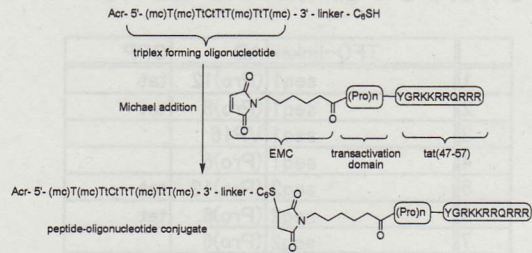


図3 POCの作製スキーム

ペプチド部位は、固相合成にてペプチド鎖の伸長を行い、樹脂からの切り出しの後、二価性架橋剤EMCSを反応させた。精製にはHPLCを用いた。

一方オリゴヌクレオチド部位は外注し、メルカプト基をフリーにした後、マレイミド化ペプチドとコンジュゲートした。マイケル付加反応により、オリゴヌクレオチドとペプチドをコンジュゲートし、HPLC精製により目的物を得た(図4)。MALDI-TOF-MSにより目的物の質量数を確認した(図5)。

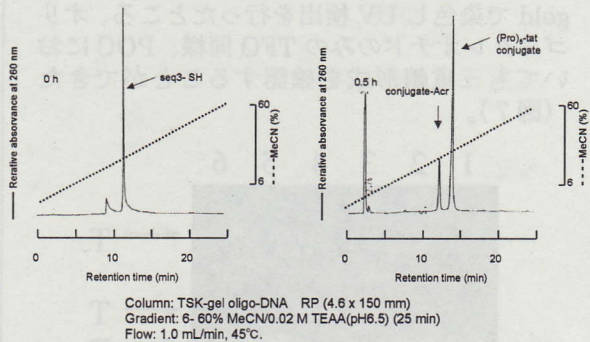


図4 POC:Seq3-(Pro)6-tatの反応例

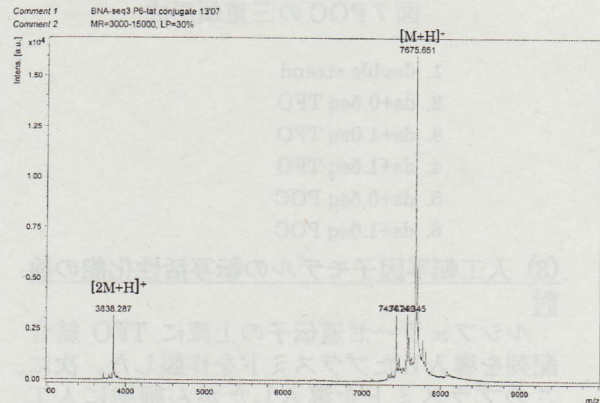


図5 MALDI-TOF MSによる質量分析結果例  
POC:Seq3-(Pro)<sub>6</sub>-tat (M.W. = 7674.84)  
found for m/z = 7675.651

同様に、TFOとペプチド間のリンカーの違い、



TFOの向き、転写活性能をもつペプチドの違いなどを考慮して、種々の人工転写因子モデルを作製することに成功した(図6)。

	TFO-linker	AD	CPP
1	seq1	(Pro)12	tat
2	seq1	(Pro)6	tat
3	seq1	VP16	
4	seq1	(Pro)6	
5	seq2	(Pro)12	tat
6	seq2	(Pro)6	tat
7	seq2	(Pro)6	
8	seq3	(Pro)12	tat
9	seq3	(Pro)6	tat
10	seq1-long	(Pro)12	tat
11	seq1-reverse	(Pro)12	tat
12	seq1-long-reverse	(Pro)12	tat

図6 作製した人工転写因子モデル配列

### (2) 人工転写因子モデルの三重鎖形成の確認

作製した POC の三重鎖形成を確認するため、対応する二重鎖とバッファー中でインキュベートし、非変性ゲル上で泳動した。SYBR gold で染色し UV 検出を行ったところ、オリゴヌクレオチドのみの TFO 同様、POC においても三重鎖形成を確認することができた(図7)。



図7 POC の三重鎖形成

1. double strand
2. ds+0.5eq TFO
3. ds+1.0eq TFO
4. ds+1.5eq TFO
5. ds+0.5eq POC
6. ds+1.0eq POC

### (3) 人工転写因子モデルの転写活性化能の検討

ルシフェラーゼ遺伝子上流に TFO 結合配列を導入したプラスミドを作製した。次に、このプラスミドを導入したがん細胞に人工転写因子モデルを添加し、転写活性化が認められるかルシフェラーゼ法にて検討を行った。TFO 結合配列の繰返し、トランスフェクション法、培地中の血清の有無など、種々の検討を行ってみたが、いずれの POC においても転写活性化を認めることはできなかった(図8)。

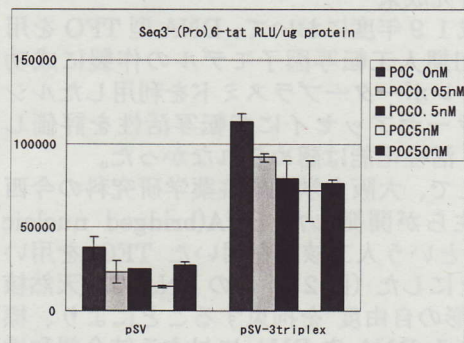


図8 ルシフェラーゼアッセイ結果例  
POC: no.9 Seq3-(Pro)6-tat  
pSV: control plasmid  
pSV-3triplex: TFO 結合配列が3回繰返されたレポータープラスミド

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)  
なし

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

仲 裕美 (NAKA HIROMI)  
京都府立医科大学・医学研究科・助教  
研究者番号: 10453119

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

なし

#### (4) 研究協力者

小比賀 聡 (OBIKA SATOSHI)  
大阪大学・薬学研究科・教授  
研究者番号: 80243252