

機関番号： 3 4 3 1 1
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2008~2010
 課題番号： 2 0 5 1 0 2 0 6
 研究課題名 (和文) 亜鉛フィンガータンパク質をフレームワークとする人工ペプチダーゼの開発
 研究課題名 (英文) Creation of artificial peptidase based on zinc finger framework
 研究代表者
 根木 滋 (NEGI SHIGERU)
 同志社女子大学・薬学部・助教
 研究者番号： 5 0 3 7 8 8 6 6

研究成果の概要 (和文) : 本研究では、Sp1 亜鉛フィンガーの各フィンガードメインに対して、亜鉛イオン配位部位を His4 型に変えた変異体 (FxH4, x=1,2,3) を作製し、それらが加水分解能を有していることを見出した。F1H4 の場合、他のドメインと比べ高い加水分解能を示すことが分かった。また、Sp1 の C 末端に F2H4 を融合させたキメラタンパク質や、FxH4 の N および C 末端に Sp1 野生型を融合させた 7 フィンガーの作製に取り組んだ。その結果、いずれの His 型フィンガーも触媒活性を有していることが明らかとなった。

研究成果の概要 (英文) : Zinc finger protein is naturally occurring DNA-binding protein found in many transcription factors. Zinc finger protein has two precious molecular recognition abilities: (1) metal ion binding and (2) DNA-binding abilities with high affinity and selectivity. Because of these characteristic, zinc finger protein is promising framework for designing artificial zinc finger proteins. In this project, I tried to introduce the catalytic activities, hydrolytic, nuclease and peptidase activities, to Sp1 zinc finger protein itself by redesign of metal binding site. At first, three His4-type zinc finger domains (FxH4, x=1,2 and 3) were created by mutation of two Cys residues to His residues for each three zinc finger domain of Sp1. All His4-type zinc finger peptides possess the high hydrolytic activities for BNPP having phosphate ester bond. Especially, F1H4 has much higher hydrolytic activity for phosphate ester compare to that of F2H4 and F3H4. Next, new types of fusion zinc finger nuclease, ZWH4 and Sp1fxH4Sp1, were prepared. ZWH4 was created by connecting F2H4 domain to c-terminus of Sp1 zinc finger protein. ZWH4 could efficiently cleavage plasmid pUC19 DNA containing target sequence. In addition, ZWH4 showed also peptidase activity. In order to increase the binding affinity for target DNA sequence and the catalytic activity of His4-type zinc finger protein, Sp1FxH4Sp1 (x=1 and 2), 7-finger proteins, were created by combine wild-type Sp1 to both N- and C-terminus of FxH4 zinc finger domain. Sp1FxH4Sp1 can produce as His-tag fusion protein using *E coli* protein expression systems. In gel mobility shift assay, Sp1FxH4Sp1 could bind to target DNA sequence. Moreover, in preliminary DNA cutting experiment, Sp1F2H4Sp1 showed week hydrolytic activity for plasmid DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：蛋白質、生体機能利用、生体分子、核酸・薬学

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムプロジェクトが終了し、ゲノムからプロテオームへの研究の流れによって、タンパク質の構造生物学とともに、新しい機能を持った人工タンパク質のデザイン研究に大きな注目が集まりつつある。実際、2007年1月に米国ベンチャーで開かれたゴードン国際研究会議(Metals in Biology)においても、金属タンパク質のデザインと分子生物学が主題テーマに取り上げられ、幸いにも申請者はこの会議において招待講演をする機会を与えられ、申請者が行っている最新のタンパク質デザインに関する研究成果(演題 Designer Zinc Finger Proteins: Tools for creating artificial DNA-binding functional proteins)を発表することができた。研究開始当時から現在においても、タンパク質に関する研究はポストゲノムの重要課題と考えられ、その位置づけは極めて重要なものとなっている。そのような背景を受けて、申請者は天然タンパク質をターゲットとし、それを化学的および遺伝子工学的的手法により改変(リデザイン)することで、より高機能な人工タンパク質を開発することを目指した。

2. 研究の目的

タンパク質はユニークな立体構造を形成することにより様々な機能を生体内で発揮している。したがって、タンパク質を人工的にデザインする上で、天然タンパク質における立体構造と機能の関係を正しく理解することが重要である。しかしながら、タンパク質研究はその複雑さゆえ多くの困難が伴い、これらの研究課題に取り組むには物理、化学、生物それぞれの分野からの複合的なアプローチが必要不可欠であると思われる。本研究課題の基本的コンセプトおよび最終目標は、天然のタンパク質をフレームワークに用い、それをオーダーメイドにリデザインすることにより目的とする新しい機能(触媒機能など)を目的タンパク質に導入し、機能性人工タンパク質を創製することである。この場合、どのような天然タンパク質をターゲットに選択しデザインするかが、その後の研究の進展を大きく左右すると考えられる。申請者はタンパク質リデザイン研究におけるターゲットタンパク質として、金属タンパク質が有用な素材であると考えている。その一つの理由として、金属タンパク質は生体内において電子移動、触媒反応、分子認識をはじめとする多種多様な生体反応に関与しており、その

構造と機能の多様性は人工タンパク質のリデザインに有効に利用できると思われるからである。以上のような考えに基づき、申請者はこれまでの研究に用いてきた、亜鉛イオン含有の DNA 結合タンパク質である亜鉛フィンガータンパク質(図1)を用い、それら^をリデザインすることにより機能性人工亜鉛フィンガータンパク質の設計・創製に取り組むこととした。

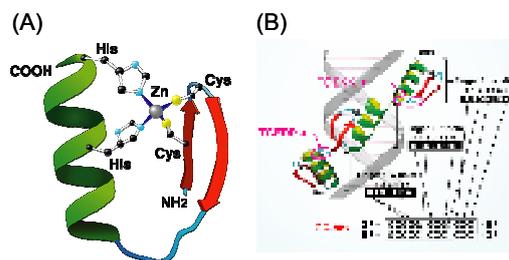


図1. Cys₂His₂型亜鉛フィンガーモチーフ(A)およびSp1亜鉛フィンガータンパク質のDNA認識様式(B).

特にここでは、亜鉛フィンガータンパク質の亜鉛イオン結合部位を人工的にリデザインすることにより、標的タンパク質に触媒活性(特にペプチド結合切断活性)を導入することを目的とした。野生型の亜鉛フィンガータンパク質は転写因子中で DNA 結合能を有しているが、酵素のような触媒活性は持ち合わせていない。したがって、亜鉛フィンガータンパク質に触媒活性を人工的に導入することはタンパク質デザインおよび新規遺伝子工学ツールの開発といった観点で非常に興味深い。本研究では、いくつもの亜鉛フィンガータンパク質の変異体を作成し、それらの構造および触媒機能について検討した。

3. 研究の方法

(1)ヒト転写因子由来の Sp1 亜鉛フィンガータンパク質全長および3つの各フィンガードメインの亜鉛イオン配位部位にある2つのCysをすべてHis残基に変異させることにより、天然の亜鉛フィンガータンパク質には全く認められない亜鉛イオン配位部位であるHis₄型の亜鉛フィンガータンパク質変異体を作製し(F1H4,F2H4,F3H4)、その金属配位挙動、DNA結合能ならびに触媒機能について検討した(図2、3)。

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)

[雑誌論文] (計2件)

- ① Shigeru Negi, Yoshiyuki Umeda, Saeko Masuyama Saeko, Koji Kano, Yukio Sugiura, Novel zinc finger nuclease created by combining the Cys₂His₂- and His₄-type zinc finger domains, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letter*, 査読有, Vol.19, 2009, pp.2789-2791.
- ② Muthu Dhanasekaran, Shigeru Negi, Miki Imanishi, Michiko Suzuki, Yukio Sugiura, Effects of Bulkiness and Hydrophobicity of an Aliphatic Amino Acid in the Recognition Helix of the GAGA Zinc Finger on the Stability of the Hydrophobic Core and DNA Binding Affinity, *Biochemistry*, 査読有, Vol.47, 2008, 11717-11724.

[学会発表] (計3件)

- ① Shigeru Negi, Yukio Sugiura, “Redesigned Zinc Finger Proteins: Design Strategy and Its Application” Pepcom2011 (Beijing) (Invited Lecture).
- ② Shigeru Negi, Yukio Sugiura, “Design of artificial zinc finger nuclease based on unnatural His₄-type zinc finger catalytic domain” Pacificchem 2010 (Hawaii).
- ③ Shigeru Negi, Yukio Sugiura, “Non FokI-type zinc finger nuclease” 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry (ICBIC14) 2008 (Nagoya).

[図書] (計1件)

- ① Shigeru Negi, et. al. “Non-FokI-based zinc finger nuclease” in Engineered Zinc Finger proteins, <Eds. by J. Mackay and D. Segal>, *Methods in Molecular Biology*, Vol.649, 337-349.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根木 滋 (NEGI SHIGERU)

同志社女子大学・薬学部・助教

研究者番号：50378866