

平成22年12月3日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20700389

研究課題名（和文）

人工転写調節因子の設計と細胞内センシング及び機能制御基盤技術の開発

研究課題名（英文）

Design of novel transcriptional regulators for the development of an intracellular sensing and functional regulation platform in mammalian cells

研究代表者 三上 あかね（MIKAMI AKANE）

独立行政法人物質・材料研究機構・生体材料センター・NIMSポスドク研究員

研究者番号：70469782

研究成果の概要（和文）：本研究では、任意の分子を認識する転写調節因子（Transcriptional regulator,TR）として、設計し、これを用いたユニバーサルな細胞内計測及び細胞機能制御基盤技術の開発を目的とした。まず新規 TRs となる基質結合タンパク質と LacI 型 TR を利用したキメラ蛋白質の構築法及び、本蛋白質が *in vitro* 及び動物細胞内において、TRs として機能することを示した。また、本蛋白質に基づく目的遺伝子の標的分子依存的な発現制御が可能であり、今後の多様な標的分子に対応する細胞内計測及び細胞機能制御基盤技術としての可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：Novel transcriptional regulators (TRs) for a versatile system of intracellular monitoring and transcriptional regulation in mammalian cells have been investigated. Substrate binding proteins and LacI-family TRs chimeric proteins(SLCPs) were designed as novel TRs. SLCPs functioned as TRs *in vitro* and in mammalian cells, and regulated expression levels of desired genes in a designed target molecule dependent manner, showing their possibility as tools for versatile intracellular sensing/ gene regulation systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学/医用生体工学・生体材料学

キーワード：生体情報・計測、細胞内センシング、細胞機能制御

1. 研究開始当初の背景

(1)背景：細胞内分子のリアルタイムモニタリングを可能とする細胞内計測技術は、疾患

メカニズムの解明、薬物応答評価など医学・生化学・創薬等の広い分野において重要な技術である。細胞内モニタリング法として、こ

れまでに刺激応答性発現プロモーターを融合したレポーター遺伝子を細胞に導入し、レポーターの発現量を指標に細胞内外の刺激を検出する技術が多く報告されている。しかし、これらの技術はいずれも発現プロポーターの応答性に依存して、計測できる分子に制限がある。このため、任意の標的分子に応答し、遺伝子発現制御を可能とする技術の開発が期待されている。

(2)動機：これまでに研究者らは、細菌由来の基質結合蛋白質(Substrate binding proteins, SBPs)を用いたバイオセンサ素子の開発を行ってきた。これまでに①リガンド特異的の異なる多種の SBPs や、更に SBPs の基質特異性改変法が多く報告されている、②SBPs が細菌由来の TR であるラクトースリプレッサー(LacI)型 TRs (LR) の標的分子認識領域 (Ligand binding domain, LBD) と類似した構造を取ることが明らかとなっている、③LR を TR とした動物細胞発現制御技術が既に実用化されている。このことから SBPs と LacI 型 TRs を融合することによって、多様な標的分子に対応する TRs の構築、更にこれらの TRs を用いた新規動物細胞内分子モニタリング技術の構築が期待された。

2. 研究の目的

本研究では、人工転写調節因子の設計と細胞内センシング及び機能制御基盤技術の開発を目的とした。まず任意の標的分子を認識する SBPs と LRs の簡便なキメラ蛋白質 (SBP-LR chimeric protein, SLCP) の設計法を開発し、これを TR として用いた動物細胞内での任意の標的分子の計測及び標的分子に依存した目的遺伝子の発現制御を可能とする細胞内センシング及び細胞機能制御基盤技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1)SLCP の設計：まず代表的な TR である大腸菌由来 LacI の LBD を種々の SBP で置換した蛋白質の立体構造モデルを、コンピューターシミュレーションを用いて構築した。次に立体構造モデルを基に、LacI 遺伝子の LBD と SBPs の遺伝子の挿げ替えを可能とした SLCP 遺伝子カセットを設計し、SLCP の大腸菌発現用、及び動物細胞発現用ベクターを構築した。

(2)In vitro における SLCP の特性検討：まず大腸菌組換え SLCP を調製し、これを用いて

①SLCP のリガンド特異性及び結合能の検討を、自家蛍光測定法を用いて行った。SBP の自家蛍光の変化は、リガンド結合により変化する SBP の構造変化を反映することから、各リガンド濃度における SLCP の自家蛍光強度を測定し、SLCP のリガンド結合能を評価した。

②次に、SLCP の DNA 配列特異性および結合能の検討を、SPR を用いて行った。まず LacI オペレーターDNA 配列(O_{opsi})または LacI 非結合性の変異型 Lac オペレーターDNA 配列(O_{neg})をセンサチップに固定化し、各 SLCP 濃度におけるセンサグラムを観測し、それぞれの DNA 配列に対する SLCP 結合能を評価した。③蛍光偏光法を用いて SLCP の FITC 修飾オペレーターDNA 結合能へのリガンドの影響を検討し、in vitro における SLCP の TR としての機能を評価した。

(3)動物細胞内における SLCP の機能評価：上流に Lac オペレーターを融合したルシフェラーゼ遺伝子の発現ベクターを作製し、(1)で作製した SLCP 発現ベクターと共にヒト培養細胞にコトランスフェクションし、リガンド濃度が異なる数種類の培地でインキュベートした。細胞回収後、細胞破砕液を調製し、各リガンド濃度におけるルシフェラーゼ活性を測定し、動物細胞内における SLCP の TR 機能

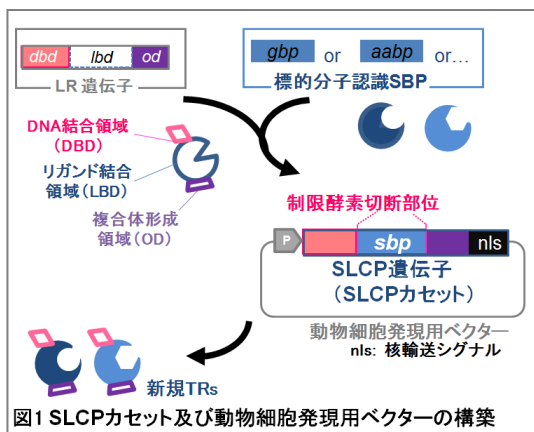
を評価した。またこの時、IPTG およびグルコースを含まない培地にてインキュベートした細胞の破碎液のルシフェラーゼ活性をコントロールとした。

(4)SLCP の改変: SLCP の遺伝子発現制御能の向上を目的に、LacI の立体構造及び SLCP の立体構造モデルの比較を行い、これを指標に、変異を導入した SLCP を作製し、その機能評価を行った。

(5)SLCP の汎用性の検討: 異なる基質特異性を持つ複数の SBPs を用いて、先に開発した SLCP カセットにそれぞれ導入して多様な基質に対応する SLCPs を作製し、機能評価を行った。

4. 研究成果

(1)SLCP の設計: コンピュータシミュレーションの結果を基に、任意の SBP 遺伝子をそれぞれ LBD コード領域(*lbd*)に導入できるよう、*lbd* の 5'-及び 3'-末端に制限酵素認識部位を導入した SLCP カセットを作製し、これを含む SLCP 大腸菌及び動物細胞発現用ベクターを構築した (図 1)。



(2)In vitro における SLCP の特性検討: SLCP のモデルとして、LacI とグルコースに対する SBP (Glucose BP, GBP) の SLCP (SLCP_{GL}) を作製し、大腸菌組換え SLCP_{GL} の DNA 及びリガンド結合能を評価した。①まずリガンド非存在下における SLCP の自家蛍光強度 (F_0)

に対する各リガンド濃度における SLCP 自家蛍光強度(F)の変化 ($\Delta F = F - F_0$) の割合を自家蛍光強度変化率 ($\Delta F/F_0$) とすると、SLCP_{GL} の $\Delta F/F_0$ は、挿入された SBP のリガンドであるグルコース濃度に依存した増加した一方、LacI のリガンドである IPTG の濃度に依存した $\Delta F/F_0$ の増加は見られなかった。これらの結果から、SLCP_{GL} は、グルコースに対して GBP と同等の結合能を示し、また IPTG には結合しないことが明らかとなった(図 2 A)。

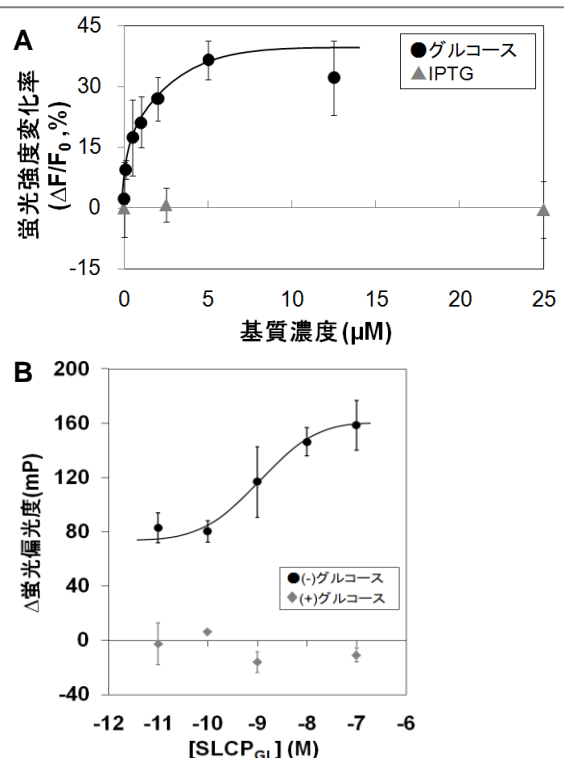


図 2. In vitro における SLCP の TR 機能評価

A. SLCP のリガンド結合能

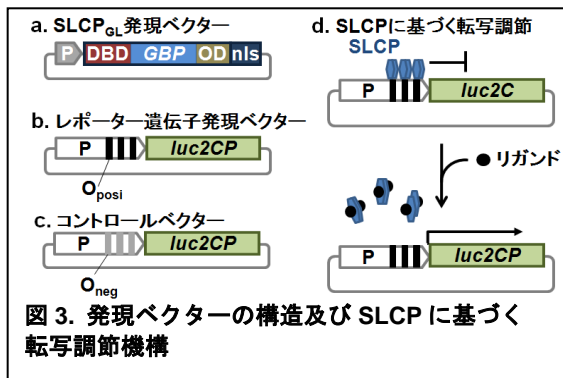
B. SLCP の DNA 結合能へのリガンドの影響の検討

②次に、SPR を用いた検討から、グルコース非存在下において、SLCP_{GL} の O_{opsi} に対する K_d 値が O_{neg} に対する K_d 値の 10^{-3} 以下であったことから、SLCP_{GL} が O_{opsi} 特異的な DNA 結合能を持つことが明らかとなった。

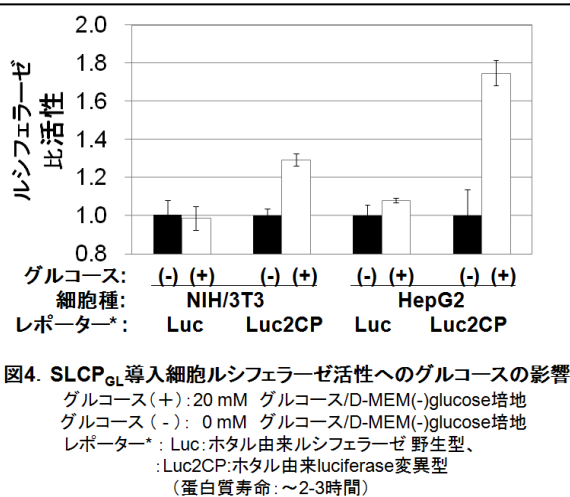
③更に、FITC 修飾 O_{opsi} の蛍光偏光度を測定したところ、グルコース非存在下では SLCP_{GL} の濃度依存的に変化したのに対し、グルコース存在下では SLCP_{GL} 濃度依存的な蛍光偏光

度の変化は見られなかった (図 2 B)。これらの結果から、 $SLCP_{GL}$ はリガンドであるグルコース存在下において O_{opsi} に結合しないことが示された。以上の結果より *in vitro* において $SLCP_{GL}$ が、①設計された標的分子特異的結合能、及び②LacI オペレーター特異的 DNA 結合能を有し、更に③標的分子存在下で DNA 結合能を失うことが明らかとなり、TR の特性を有することが示された。

(3)動物細胞内における $SLCP$ の機能評価: まず $SLCP_{GL}$ 発現ベクター (図 3 a) 及びレポーター遺伝子発現ベクターを細胞にコト



ランスフェクトし、IPTG を含む培地にてインキュベートしたところ、その細胞破碎液のルシフェラーゼ活性は、コントロールと比べて、差が見られなかった。一方、グルコース含有培地にてインキュベートすると、その細胞破碎液のルシフェラーゼ活性は、コントロールより高く、特に動物細胞としてヒト肝ガン細胞 HepG2 およびレポーターとしてルシフェラーゼ変異体(Luc2CP)を用いた時、ルシフェラーゼ活性の顕著な増大が見られた(図 4)。また、レポーター遺伝子発現ベクターの代わりにコントロールベクター(図 3 c)をコトランスフェクトした HepG2 細胞では、コントロールとグルコース含有培地でインキュベートした細胞のルシフェラーゼ活性に差は見られなかった。更に、各グルコース濃度でインキュベートした後、細胞破碎液のルシフェラーゼ活性を測定したところ、培地中のグ



ルコース濃度 10^{-6} から 10^{-4} M の範囲において、グルコース濃度に依存した活性の増大が見られた。これらの結果から、 $SLCP_{GL}$ を導入した細胞では、ルシフェラーゼ遺伝子の発現量が、グルコース濃度に依存して変化すると示唆された。以上の結果より、 $SLCP_{GL}$ が、動物細胞内において①標的分子であるグルコースおよび②オペレーター配列を特異的に認識し、③グルコース濃度依存的にルシフェラーゼ遺伝子の発現を制御することが示され、動物細胞内においても TR として機能すること、また $SLCP$ に基づく細胞内分子計測及び遺伝子発現制御システムの構築が可能であることが確認された。立体構造類似性の高く、リガンド特性の異なる SBPs を用いた新規転写調節因子の設計法は、多様な標的分子に対応する細胞内計測技術及び遺伝子発現制御基盤技術開発を可能にすると考えられる。一方、 $SLCP$ を用いることで、培地中のグルコース濃度に依存した目的遺伝子の発現制御が可能となったが、細胞内計測技術として実用化するためには、実際の細胞内グルコース濃度とレポーター分子の発現量の相関、検出限界、細胞種に因る感度の違いなどを検討する必要がある。

(4)TR 機能向上を目指した $SLCP_{GL}$ の改変: 先に (1) — (3) にて構築された $SLCP_{GL}$ は、細胞内における転写調節能が LacI に比較して低かった。*in vitro* 実験の結果から、これは $SLCP$

の DNA 結合能が低いと考えられた。よって、より高い遺伝子発現制御能を持つ SLCPgl の開発を目的とし LacI と SLCP の構造の違いと、DNA 結合能への影響、遺伝子発現制御能への影響の検討を行った。LacI の立体構造及び SLCP の立体構造モデルを指標に、SLCPgl に変異を導入した。SLCPgl 分子間相互作用領域への変異導入によって SLCPgl の DNA 結合能が変化し、SLCP の TR 機能に影響することが示唆された。

(5) SLCP の汎用性の検討：これまでにグルコースを標的とする SLCP_{GL} が、TR として機能することを示した。そこで多様な標的分子に対応する細胞内計測及び発現制御機構基盤技術の転写調節因子としての汎用性を示すため、他の分子を標的とする複数の SLCP を作製し TR 機能の検討を行った。In vitro での特性検討の結果、SLCPs はグルコースに対する SLCP と同様に、目的の標的分子に特異的で TR としての機能を持つことが示唆された。今後、更に細胞内における TR 機能の検討が求められるが、GBP だけではなく、他の SBP を用いても、TR として機能する SLCPs が構築できることが示唆された。

以上の研究では、多様な SBPs を用いた新規転写調節因子 SLCP の設計法をしめし、本 SLCP に基づく細胞内計測技術及び遺伝子発現制御技術を開発した。また SLCP の TR 機能向上において重要な知見および SBPs を用いた基質特異性の異なる複数の転写調節因子の簡便な作製が可能であることを示したことで、構築された SLCP を用いた動物細胞内分子のセンシング及び遺伝子発現制御と共に、SLCP に基づくユニバーサル遺伝子発現制御技術の可能性を示した。このようなユニバーサル細胞内計測/遺伝子発現制御基盤技術は、医学・生化学・創薬等、広い分野での応用が期待さ

れる。

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 5 件)

- ① A. Sakaguchi-Mikami, A. Taniguchi, K. Sode, T. Yamazaki, “Construction of a novel glucose sensing molecule based on a substrate-binding protein for intracellular sensing”, *Biotechnology and Bioengineering*, in press, 査読有
- ② T. Yamazaki and A. Sakaguchi, “Indonesian Nanoletter, “Protein Engineering Approaches to Novel Glucose Sensing Elements Construction”, 2010, 3(1):44-46 査読無
- ③ A. Taneoka, A. Sakaguchi-Mikami, T. Yamazaki, W. Tsugawa, K. Sode, “Glucose sensing luciferase”, *Biosensors & Bioelectronics*, 2009, 25:76-81, 査読有
- ④ A. Sakaguchi-Mikami, A. Taneoka, R. Yamoto, S. Ferri, K. Sode, “Engineering of ligand specificity of periplasmic binding protein for glucose sensing”, *Biotechnology Letters*, 2008, 30(8):1453-1460, 査読有
- ⑤ 坂口あかね, 山崎智彦、谷口彰良, “細菌由来基質結合タンパク質を用いた人工転写調節因子の設計”, *生体の科学*, 2008, 59:313-319, 査読無

[学会発表] (計 10 件)

(1) 国際学会

- ① T. Yamazaki, A. Sakaguchi-Mikami, “Protein Engineering Approaches to Molecular Recognition Element Construction for Biosensor Application”, *Nanotech Indonesia*,

2009年11月11日, ジャカルタ (インドネシア) (招待講演)

- ② T. Yamazaki, A. Taniguchi, A. Sakaguchi-Mikami, "The universal cell-based sensing system utilizing designed transcriptional regulators", International Conference on Quality Control of Biomaterials and Tissue Engineering Products, 2009年9月28日, 天津 (中国) (招待講演)
- ③ A. Sakaguchi-Mikami, A. Taniguchi, T. Yamazaki, "Development of novel designed transcriptional regulators for the universal cell-sensing system", 22nd European conference on Biomaterials, 2009年9月9日, ローザンヌ (スイス)
- ④ T. Yamazaki, A. Mikami, A. Taniguchi, "Building a novel transcriptional regulator as a universal switch platform", MANA International Symposium 2009, 2009年2月27日, つくば (日本)
- ⑤ T. Yamazaki, A. Mikami, A. Taniguchi, "Design and Construction of Novel Engineered Transcriptional Regulators", The 5th Sweden-Japan Bio-Nano Workshop, 2008年11月25日, ストックホルム (スウェーデン)
- ⑥ A. Sakaguchi-Mikami, T. Yamazaki, K. Sode, A. Taniguchi, "Towards the development of the universal mammalian cell-sensing system utilizing bacterial substrate binding proteins", Japan-Korea Joint Symposium 2008 on Biomaterials and Regenerative Medicine, 2008年8月21日, つくば
- ⑦ A. Sakaguchi-Mikami, T. Yamazaki, K. Sode, A. Taniguchi, "the development of the universal mammalian cell-sensing system utilizing bacterial periplasmic binding proteins", Biosensors 2008, 2008年5月15日, 上海 (中国)

(2)国内学会

- ① 坂口あかね, 谷口彰良, 山崎智彦, "転写調節因子の設計による細胞内センシング技術の開発", 日本バイオマテリアル学会, 2009年11月16日, 京都
- ② 坂口あかね, 山崎智彦, 谷口彰良, "人工転写調節因子を用いた遺伝子発現制御技術の開発", 農芸化学会, 2009年3月29日, 福岡
- ③ 坂口あかね, 山崎智彦, 奥田順子, 早出広司, 谷口彰良, "分子生物学会, 日本分子生物学会, 基質結合タンパク質を用いた新規転写調節因子の開発", 2008年12月7日, 神戸

[その他]

ホームページ等

<http://www.nims.go.jp/bmc/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

三上 あかね (MIKAMI AKANE)

独立行政法人物質・材料研究機構・生体材料センター・NIMS ポスドク研究員
研究者番号: 70469782

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし