

平成22年4月21日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790099
 研究課題名 (和文) 構造変化を利用した転写因子型亜鉛イオンセンサーの開発
 研究課題名 (英文) Development of transcriptional Zn(II) sensor based on protein conformational change
 研究代表者
 堀 雄一郎 (HORI YUICHIRO)
 大阪大学・工学研究科・助教
 研究者番号：00444563

研究成果の概要 (和文)：

特定の遺伝子に結合する DNA 結合タンパク質は、人工転写因子やジーンターゲティングへの応用がなされており、医学・生命科学の分野で近年大きな注目を集めている。本研究では、亜鉛イオンとの結合により構造変化を誘起する蛋白質 Antennafinger (Ant-F) を利用して、亜鉛イオンセンサー DNA 結合タンパク質を設計する。このタンパク質により、転写活性により亜鉛イオンを検出する方法の基盤技術を構築する。

研究成果の概要 (英文)：

DNA-binding proteins have been attracting attention in the field of medical and life sciences and applied to the targeting and transcriptional control of particular genes. In this project, a Zn(II)-sensor protein, which binds to DNA, is designed by utilizing Antennafinger (Ant-F). Ant-F is an artificial protein, which induce structural change by binding Zn(II). This research will provide a basic tool, which could lead to the development of the technique for the detection of Zn(II) by transcriptional activity.

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	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

科研費の分科・細目：薬学・創薬化学

キーワード：構造変化・亜鉛イオン・亜鉛フィンガー・ホメオドメイン・転写因子・センサー

1. 研究開始当初の背景

特定の遺伝子に結合する DNA 結合タンパク質は、人工転写因子やジーンターゲティン

グへの応用がなされており、医学・生命科学の分野で近年大きな注目を集めている。なかでも亜鉛フィンガーとヘリックス・ターン・

ヘリックスは、構造・DNA 認識様式がよく理解されている代表的な DNA 結合モチーフである。これらのモチーフを有するタンパク質は、DNA に対する結合親和性と特異性が極めて高いため、DNA を標的とした機能分子として大変魅力的である。これまでの研究により、この二つの DNA 結合モチーフの構造変換を亜鉛イオンにより誘起することのできる人工タンパク質(Ant-F)の設計に成功してきた。一方、Ant-F は、その構造変換に伴い、DNA 結合親和性の制御が可能であることが明らかとなっているが、構造変換により DNA 認識配列を変換することのできる人工タンパク質の創製に関しては、いまだ報告されていない。このような DNA 認識変換型タンパク質は、スイッチ機能により異なった遺伝子を活性化する人工転写因子への応用が可能であり、その開発は医学・生命科学の発展に大きく貢献すると考えられる。

特に、亜鉛イオンによる構造スイッチをもつタンパク質は亜鉛イオンセンサーとして応用可能である。生体高分子に弱く結合または遊離した亜鉛イオンは、アポトーシスや神経系・免疫系での機能に関わっていると考えられているが、その詳細は不明瞭な点が多い。このため、亜鉛イオンを生体内で検出することのできるセンサーは、亜鉛イオンの役割を明らかにするうえで、有用な知見を与えると考えられる。これまでに開発された亜鉛イオンプローブは、おもに蛍光小分子化合物であるが、細胞の自家蛍光、測定精度の問題点が指摘されている。このため、亜鉛イオン濃度の変化を捉えることのできる新たなセンサーシステムが求められている。

2. 研究の目的

蛍光小分子プローブの感度は一般的に高いものの、生体シグナルに応じた化学量論的なアウトプットを生じるため、非常に低濃度(~pM 以下)の生体分子を捉えることは、困難である。一方、低濃度の生体分子のシグナルを増幅することにより、大きなアウトプットが得られれば、極めて高感度に生体シグナルを検出することができると考えられる。しかしながら、酵素と異なり、亜鉛イオンそのものは、そのままでは、酵素のように生体シグナルを増幅することはない。本研究では、亜鉛イオンとセンサータンパク質の結合が転写活性をアウトプットとして亜鉛イオン濃度に応じて増幅することを目指し、センサータンパク質が、亜鉛イオンとの結合により、認識する DNA の配列を変換させることができるようにする。このセンサータンパク質の土台となる人工タンパク質を Ant-F とした。

Ant-F は、これまでの研究により創製した人工タンパク質で、亜鉛イオンとの結合により大きく構造変化を誘起する。この蛋白質に

は、亜鉛イオンとの結合に関わる配列として、Cys2His2 型亜鉛フィンガーのコンセンサス配列である F/Y-x-C-X_{2,4}-C-X₃-F-X₅-L-X₂-H-X₃₋₅-H を有している。このコンセンサス配列のうち非保存アミノ酸は、全てが Ala の場合でも、亜鉛イオンと結合することが知られており、コンセンサス配列の存在が亜鉛イオンとの結合に決定的な役割を果たす。この亜鉛フィンガーは、コンセンサス配列のうち、2つの Cys と 2つの His が亜鉛イオンと四面体配位構造を形成し結合し、3つの疎水性アミノ酸が疎水性コアを形成した結果、ββα構造を獲得することが知られている。Ant-F は、このコンセンサス配列に類似したアミノ酸配列を持つタンパク質をモチーフ検索により検索し、得られた蛋白質 Antennapedia homeodomain をもとにしている。Antennapedia homeodomain は、ヘリックスターンヘリックス型の DNA 結合タンパク質で亜鉛フィンガーとは、立体構造や DNA 認識の点で大きく違う。この Antennapedia homeodomain に亜鉛フィンガーコンセンサス配列に類似した配列の部位に変異を導入し、亜鉛イオンと結合するようにしたものが、Ant-F である。Ant-F は、亜鉛イオン非存在下では、Antennapedia Homeodomain の立体構造を有し、AT リッチな配列を認識・結合する。一方、亜鉛イオンとの結合により、DNA 結合能は、立体構造を大きく変化させ、大きく低下する。

天然に存在する亜鉛フィンガーは、亜鉛イオン非存在下では、特定の構造を形成することができず、亜鉛イオンとの結合により二次・三次構造を形成し、DNA 結合能を獲得する。これとは対照的に、Ant-F は、亜鉛イオン非存在下において DNA 結合親和性を有する一方、亜鉛イオン添加により、DNA 結合活性をほとんど失うことが分かっている。そこで、この点に着目し、異なった DNA(GC 配列: GGGGCGGG)に結合する天然の亜鉛フィンガーを Ant-F(AT 配列: ATTA を認識)に融合させることで、亜鉛イオンにより認識配列を切り替えることのできるタンパク質を設計できると考えた。つまり、この融合タンパク質では、亜鉛イオン非存在下、亜鉛フィンガー部位が、DNA 結合能を失う一方、アポ Ant-F 部位が AT 配列に対して結合する。一方、亜鉛イオン存在下では、亜鉛フィンガー部位が GC 配列に対し結合し、ホロ Ant-F は DNA 結合能を失うことが期待される。そこで、本研究では、このストラテジーに基づいて、人工タンパク質を設計し、二つの DNA 配列に対する結合親和性と選択性に対する亜鉛イオンの影響を明らかにする。その結果、デザインした DNA 結合タンパク質に転写活性化ドメインを融合し、亜鉛イオン濃度

を異なるレポーター遺伝子の転写活性として検出するシステムの構築のための基盤技術を提供する。

3. 研究の方法

(1) Ant-F-Sp1ZF の遺伝子の設計とタンパク質発現・精製

前述したとおり、Ant-F は、亜鉛イオンとの結合により DNA 結合能を大幅に減少させる。天然の亜鉛フィンガーは、亜鉛イオンとの結合により DNA 結合能を獲得するため、Ant-F に天然の亜鉛フィンガーを融合させることにより、上記の目的が達成されると考えられる。本研究では、天然の亜鉛フィンガーは、ヒト由来転写因子 Sp1 の DNA 結合ドメインである Cys₂His₂ 型亜鉛フィンガー (Sp1ZF) とする。このドメインは、2 つの Cys と 2 つの His が亜鉛イオンに配位結合することにより構造形成し、DNA に結合することが知られている。この DNA 結合ドメインを選んだ理由は、このタンパク質の立体構造やその DNA 認識様式がよく理解されているうえ、アポ Ant-F が AT リッチな配列に結合するのに対し、ホロ Sp1ZF が GC リッチな配列に結合するためである。この融合タンパク質の遺伝子を作成し、大腸菌にて発現させた。精製は、イオン交換クロマトグラフィー法と逆相クロマトグラフィー法もしくはサイズ排除クロマトグラフィー法にて行った。精製タンパク質の確認は、SDS-PAGE ならびに質量分析法 (MALDI-TOF-MS) にて行った。

(2) Ant-F-Sp1ZF 融合タンパク質の DNA 結合解析

設計した人工タンパク質の DNA 結合選択性が亜鉛イオン添加により、どのように変化するかを検討した。亜鉛イオン非存在下での標的 DNA の配列は AT 配列とし、亜鉛イオン存在下での標的配列は GC 配列とする。DNA との結合はゲルシフト法により行った。ゲルシフト法では、目的とする配列を有する dsDNA の末端をポリヌクレオチドキナーゼを用いて、³²P 標識し、脱塩カラムで精製したものを基質とした。この dsDNA と融合タンパク質を反応させ、ゲル電気泳動を行い、オートラジオグラフィにより解析した。

4. 研究成果

設計した融合タンパク質の遺伝子配列を解析した結果、意図した遺伝子配列を有していることが明らかとなった。また、大腸菌での発現条件を検討した結果、可溶性画分に発現させることに成功した。クロマトグラフィー精製の後に、SDS-PAGE により純度確認を行ったところ、得られたタンパク質は、高純度であることが分かった。MALDI-TOF-MS により、精製したタンパク質の分子量を測定した結

果、理論値とほぼ一致したことから目的とするタンパク質であることが分かった。この結果から、融合タンパク質の創製に成功したといえる。

次に、この融合蛋白質を亜鉛イオンの有無に応じて、DNA 結合配列が変換できるかどうかをゲルシフト法で検討した。亜鉛イオン存在下においては、GC リッチな配列に結合し、亜鉛イオン非存在下においては、AT リッチな配列に結合することが明らかとなった。以上の結果より、亜鉛イオンとの結合により、DNA 結合配列を変換させることのできる人工蛋白質を創製した。

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 4 件)

- ① Hori, Y., Egashira, Y., Kamiura, R., Kikuchi, K. *ChemBiochem* 2010, *11*, 646-648. (査読有り)
- ② Hori, Y., Ueno, H., Mizukami, S., Kikuchi, K. Photoactive Yellow Protein-Based Protein Labeling System with Turn-on Fluorescence Intensity. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, *131*, 16610-16611. (査読有り)
- ③ Mizukami, S., Watanabe, S., Hori, Y., Kikuchi, K. Covalent protein labeling based on noncatalytic β -lactamase and a designed FRET substrate. *J. Am. Chem. Soc.* 2009, *131*, 5016-5017. (査読有り)
- ④ Vila-Perelló, M., Hori, Y., Ribó, M., Muir, T. W. Activation of protein splicing by protease- or light-triggered O to N acyl migration. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2008, *47*, 7764-7767. (査読有り)

[学会発表] (計 12 件)

- ① 堀 雄一郎、上野 秀樹、中木 恭平、菊地 和也、「Photoactive Yellow Protein をタグ蛋白質とした蛍光強度増大型蛋白質ラベル化法の開発」、日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 30 日 (岡山)
- ② 中木 恭平、堀 雄一郎、上野 秀樹、菊地 和也、「新規タグ蛋白質 Photoactive Yellow Protein (PYP) と蛍光強度増大型プローブを利用した蛋白質ラベル化システム」、日本化学会第 90 春季年会、2010 年 3 月 29 日 (大阪)
- ③ 堀 雄一郎、江頭 由佳、上浦 良介、菊地 和也、「小さなペプチドタグとインテンインを利用した共有結合型蛋白質ラベル化法の開発」、日本化学会第 90 春季年

- 会、2010年3月28日(大阪)
- ④ Ueno, H., Hori, Y., Kikuchi, K., 「Fluorogenic Protein Labeling System Based on Photoactive Yellow Protein」, 5th Spanish-Portuguese-Japanese Organic Chemistry Symposium (5th SPJ-OCS), 2009年11月7日(大阪)
 - ⑤ 江頭 有佳、堀 雄一郎、上浦 良介、菊地 和也、「小さなペプチドタグ配列を利用した共有結合型ラベリング法」、第24回生体機能関連化学シンポジウム、2009年9月14日(福岡)
 - ⑥ 堀 雄一郎、上野 秀樹、菊地 和也、「Photoactive Yellow Protein をタグ蛋白質とした蛍光強度増大型ラベル化法の開発」、第24回生体機能関連化学シンポジウム、2009年9月14日(福岡)
 - ⑦ 堀 雄一郎、上野 秀樹、菊地 和也、「小分子化合物を用いた膜蛋白質の分解法研究」、日本ケミカルバイオロジー学会第4回年会、2009年5月19日(神戸)
 - ⑧ 上野 秀樹、堀 雄一郎、菊地 和也、「Photoactive Yellow Protein をタグ蛋白質とした蛍光ラベリング法の開発」、日本分子イメージング学会第4回学術総会・学術集会、2009年5月15日(東京)
 - ⑨ 上野 秀樹、堀 雄一郎、菊地 和也、「Photoactive Yellow Protein をタグ蛋白質とした蛍光強度増大型ラベル化法の開発」、日本化学会第89春季年会、2009年3月29日(千葉)
 - ⑩ 堀 雄一郎、芝田 茜、菊地 和也、「小分子化合物を用いた膜タンパク質の翻訳後ノックダウン法」、日本化学会第89春季年会、2009年3月29日(千葉)
 - ⑪ 堀 雄一郎、芝田 茜、菊地 和也、「膜タンパク質の小分子化合物による新規分解法の開発」、日本薬学会第129年会、2009年3月26日(京都)

[産業財産権]

○出願状況(計2件)

名称：蛋白質を蛍光標識する方法
発明者：菊地和也，堀雄一郎，上野秀樹
権利者：大阪大学
種類：PCT 出願
番号：PCT/JP2010/054024
出願年月日：2010年3月10日
国内外の別：国外

名称：タンパク質を二段階標識する方法
発明者：菊地和也，堀雄一郎，上野秀樹
権利者：大阪大学
種類：特願
番号：2009-056306

出願年月日：2009年3月10日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 雄一郎 (HORI YUICHIRO)
大阪大学・工学研究科・助教
研究者番号：00444563