

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月29日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22710213

研究課題名（和文） リズミクな遺伝子発現を誘起する人工時計タンパク質の創製

研究課題名（英文） Creation of artificial clock proteins to induce rhythmic gene expression

研究代表者

今西 未来 (IMANISHI MIKI)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：80362391

研究成果の概要（和文）：代表的な DNA 結合モチーフである C2H2 型ジンクフィンガーモチーフを用いて、時計遺伝子プロモーターに選択的に作用する人工転写因子をデザインした。これにより、遺伝子発現リズムを制御することに成功した。また、本来は振動発現しない遺伝子にもリズミクな遺伝子発現を誘起する人工タンパク質をデザインすることができた。

研究成果の概要（英文）：An artificial zinc finger transcription factor targeting a core clock gene was designed and it successfully changed the circadian time. A simple system to manipulate gene expression patterns to be circadian was also constructed using a zinc finger motif. These artificial proteins would be useful for elucidating the mechanism of rhythmic gene expression and for manipulating gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物分子科学

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子化学

キーワード：遺伝子発現・ジンクフィンガー・人工転写因子

1. 研究開始当初の背景

1日約24時間というサーカディアンリズムは、各細胞に存在する。リズムを司る「時計遺伝子」は、それら自身が周期的な発現パターンを示し、また時計タンパク質の制御を受ける様々な遺伝子もリズミクに発現することが知られている。近年、真核生物において、概日時計を司る時計遺伝子の同定が進展し、その振動発現のメカニズムの解明が精力的に進められてきた。また、周期的遺伝子発現に関する理論モデルも提唱されてきた。一方、実際に細胞内で人工的にリズムを生み出

したり、遺伝子発現リズムを制御するという試みはほとんど無かった。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子配列選択的に作用する人工 DNA 結合タンパク質および人工転写因子をデザインすることによって、(1) 細胞の時計システムに遺伝子配列選択的に人為的な摂動を与え、また、(2) 本来は振動発現しない遺伝子に対してもリズミクな遺伝子発現を誘起することを目的とした。さらに、これにより、リズミクに振動する時計シス

テムの制御メカニズムに関する知見が得られることを期待した。

3. 研究の方法

(1) 代表的な DNA 結合モチーフとして知られる C2H2 型亜鉛フィンガーは、「各フィンガーあたり 3 塩基を認識し、複数フィンガーが連結した状態で連続する DNA 配列に単量体で結合する」という、特徴的な DNA 結合様式を有する。この性質を利用して、様々な 3 塩基に結合するフィンガー同士を連結することにより、目的の DNA 配列に選択的に結合できる人工 DNA 結合タンパク質のデザインが可能になってきている。本研究では、これを利用し、時計遺伝子 *period1* (*Per1*) プロモーターに存在するグルココルチコイド応答配列 (GRE) に選択的に作用する人工転写因子を作製し、細胞時計のリセット、すなわち、時計遺伝子発現リズムの位相シフトの誘起を試みた。

標的 DNA 配列としては、*Per1* GRE への特異性を期待し、GRE とその周辺配列を含む 18 塩基対を選んだ。対応する 6 つのジンクフィンガーモチーフを組み合わせた ZF (GRE) を作製し、まず、大腸菌発現系から精製した ZF (GRE) を用いて、その DNA 結合親和性と選択性をゲルシフト法により調べた。ゲルシフトアッセイには、*Per1* GRE をはじめ、様々な遺伝子プロモーター中の GRE 含有配列をもつ蛍光標識二本鎖 DNA フラグメントを用いた。また、ZF (GRE) をマウス繊維芽細胞 NIH3T3 に発現させ、クロマチン免疫沈降法によってゲノム中の標的領域への選択性を調べた。

さらに、この人工転写因子の活性 (蓄積量) をリガンド添加によってスイッチするために、Destabilizing domain (DD) を融合した人工転写因子 DD-ZF-AD をデザインし、細胞内で発現させた。リガンド添加による DD-ZF-AD の蓄積量の変化は、ウエスタンブロット法により調べた。さらに、リアルタイム PCR 法によって、リガンド添加による DD-ZF-AD の転写活性化能および標的遺伝子選択性を調べた。

DD-ZF-AD の時計遺伝子発現リズムへの影響は、時計遺伝子プロモーター駆動性のルシフェラーゼ遺伝子をコードしたレポーターベクターを用い、ルシフェラーゼ活性のリアルタイムモニタリングによって評価した。

(2) 任意の遺伝子にリズム的な発現を誘起できるシステムの構築を目指して、ジンクフィンガードメインと時計タンパク質

(BMAL1 もしくは CLOCK) との融合タンパク質、Zif-BMAL、Zif-CLOCK をデザインした。モデル系として、ジンクフィンガードメインには、転写因子 Zif268 由来のジンクフィンガーを用いた。

まず、この融合タンパク質の転写機能を調

べるため、レポーターアッセイを行った。レポーター遺伝子としてはルシフェラーゼ遺伝子の制御プロモーター中にジンクフィンガー結合配列を挿入したものを作製した。発現ベクター、レポーターベクターを NIH3T3 細胞へトランスフェクションし、インキュベート後の細胞を溶解してルシフェラーゼ活性を測定した。

さらに、遺伝子発現リズムへの効果を調べる為に、ルシフェラーゼ遺伝子の制御領域に SV40 プロモーターおよびジンクフィンガー結合配列を挿入した、ZBS-luc を作製した。コントロールとして、ジンクフィンガー結合配列に変異を導入した mtZBS-luc、および、ジンクフィンガー結合配列を欠損させた、noZBS-luc を作製した。発現ベクターとレポーターベクターを NIH3T3 細胞へトランスフェクションし、フォルスコリンを添加後、ルシフェラーゼ活性をリアルタイムでモニタリングした。

4. 研究成果

(1) ゲルシフトアッセイの結果、作製した ZF (GRE) は高い結合親和性と選択性で標的とする *Per1* GRE 配列へ結合することが明らかになった。また、クロマチン免疫沈降の結果から、クロマチン状態であっても、ZF (GRE) は標的領域へ高い選択性で結合していることが確認できた。内在のグルココルチコイドレセプターがゲノム中の膨大な遺伝子プロモーターの GRE へ作用してしまうのに対して、デザインしたジンクフィンガーは、高い選択性で *Per1* GRE のみに結合できることが示唆された。

人工転写因子 DD-ZF-AD に対するリガンド添加の効果に関しては、ウエスタンブロットの結果、リガンド非添加時には蓄積がほとんどみられないが、リガンド添加によって、DD-ZF-AD が核内に蓄積することが明らかになった。また、リアルタイム PCR の結果、リガンド添加によって、*period1* 遺伝子の転写が上昇する一方で、グルココルチコイド応答性の他の遺伝子の発現には影響を与えないことが明らかになった。すなわち、DD-ZF-AD の機能がリガンドによってスイッチできることが明らかになった。

時計遺伝子発現リズムへの影響を調べた結果、DD-ZF-AD 発現細胞では、リガンド添加によって、*Per1*、*Per2*、*Bmal1* プロモーター駆動ルシフェラーゼレポーター遺伝子にリズム的な発現が誘起された。この結果は、DD-ZF-AD の作用によって、細胞の時計システムのリセットが誘起された可能性を示唆している。このことを確かめるために、リガンド添加のタイミング依存的に発現リズムにおける位相シフトが見られるかどうかを検証した。そのために、DD-ZF-AD の安定発現株

を構築し、その細胞へ Per2 駆動ルシフェラーゼレポーターベクターをトランスフェクションし、異なる位相において、リガンドを添加した。その結果、リガンド添加のタイミング依存的に、位相の前進もしくは後退がみとめられた。この結果は、period1 遺伝子がリズムの調節にとって重要な役割を果たしていることを示している。

これまで、細胞時計のリセットにはフォルスコリンやデキサメタゾンなどの化合物が用いられてきたが、これらは様々な遺伝子に影響を与えてしまう。高い選択性で時計遺伝子ネットワークに直接作用できるこの人工転写因子は、時間治療の新しい手段として、またリズム的な発現メカニズムを解明するためのプロモーター解析ツールとしての有用性が期待される。

(2) 時計遺伝子の周期的な調節を担う時計タンパク質には、E-box 配列に結合し転写を活性化する活性化因子として BMAL1/CLOCK ヘテロダイマー、およびこれらの抑制因子として PER や CRY などが知られている。本研究では、活性化因子が E-box 配列のみならず、様々な標的配列へ近づくことができれば、周期的に抑制因子による制御がかかり、結果として、リズム的な遺伝子発現が生じるのではないかと考え、Zif-BMAL、Zif-CLOCK をデザインした。

ジンクフィンガー結合配列を有するレポーターを用いたルシフェラーゼレポーターアッセイの結果、Zif-BMAL は CLOCK 依存的にレポーター遺伝子の転写を活性化し、CRY によってその活性が抑制されることが確認できた。また同様に、Zif-CLOCK は BMAL 依存的に転写を活性化し、CRY によってその活性が抑制されることが明らかになった。すなわち、BMAL1 と CLOCK が E-box 配列に直接結合していない状態であっても、ジンクフィンガー領域を介して標的プロモーター配列近傍でヘテロダイマーが形成され、その機能を発揮できることが示唆された。

さらに、レポーター遺伝子の発現をリアルタイムでモニタリングした結果、Zif-BMAL もしくは Zif-CLOCK のどちらかを発現させた細胞においても、プロモーター領域にジンクフィンガーの結合配列を有する場合にのみ、約 24 時間周期のリズム的な遺伝子発現が誘起された。

これらの結果は、時計タンパク質が直接 DNA に結合していなくても、リズム的な遺伝子発現を誘起できることを示した初めての例であり、また、任意の遺伝子をリズム的に発現させることができる可能性を示唆している。

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 3 件)

① Miki Imanishi, Kazutoshi Yamamoto, Hiroyuki Yamada, Yuka Hirose, Hitoshi Okamura, and Shiroh Futaki, “Construction of a rhythm transfer system that mimics the cellular clock” ACS Chem. Biol., 7, 1817-1821, (2012) (査読あり).

DOI: 10.1021/cb300432s

② Miki Imanishi, “Design of artificial DNA binding proteins toward control and elucidation of cellular functions”, Yakugaku Zasshi, 132, 1431-1436 (2012) (査読あり).

https://www.jstage.jst.go.jp/article/yakushi/132/12/132_12-00228/_article

③ Miki Imanishi, Atsushi Nakamura, Masao Doi, Shiroh Futaki, and Hitoshi Okamura, “Control of circadian phase by an artificial zinc finger transcription regulator”, Angew. Chem. Int. Ed., 50, 9396-9399 (2011) (査読あり).

DOI: 10.1002/anie.201103307

[学会発表] (計 10 件)

① 今西未来 「ジンクフィンガー型人工転写因子の創製と細胞機能の制御」日本薬学会第 132 年会、2012 年 3 月 29 日、北海道大学 (札幌市)

② Kazutoshi Yamamoto, Miki Imanishi, Hitoshi Okamura, and Shiroh Futaki, “Circadian rhythmic gene expression induced by artificial clock proteins” The 38th International Symposium on Nucleic Acid Chemistry, 2011 年 11 月 10 日、北海道大学 (札幌市)

③ 山本和俊、今西未来、岡村 均、二木史朗 「人工時計タンパク質を用いた周期的遺伝子発現システムの構築」第 61 回日本薬学会近畿支部大会、2011 年 10 月 22 日、神戸学院大学 (神戸市)

④ 今西未来、山本和俊、岡村 均、二木史朗 「人工時計タンパク質によるリズム的な遺伝子発現の誘起」第 5 回バイオ関連化学シンポジウム、2011 年 9 月 14 日、つくば国際会議場エポカルつくば (つくば市)

⑤ 今西未来、中村篤史、岡村 均、二木史朗 「ジンクフィンガー型人工転写因子を用いた細胞時計の制御」日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会、2011 年 5 月 25 日、東京工業大学大岡山キャンパス (東京都)

⑥ 今西未来 「ジンクフィンガーモチーフを用いた新規 DNA 結合タンパク質の創製」日本薬学会第 131 年会、2011 年 3 月 30 日、静岡市

⑦ Miki Imanishi, “Creation of

artificial DNA binding proteins based on properties of a C2H2 zinc finger motif”, 日本農芸化学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 28 日、京都女子大学（京都市）

⑧ Miki Imanishi, Kazutoshi Yamamoto, and Shiroh Futaki, “Design of artificial clock proteins” 2010 環太平洋国際化学会議、2010 年 12 月 18 日、Honolulu, Hawaii (USA)

⑨ 今西未来、中村篤史、土居雅夫、二木史朗、岡村均 「亜鉛フィンガー型人工転写因子を用いた細胞時計制御」第 17 回日本時間生物学学会学術大会、2010 年 11 月 20 日、早稲田大学（東京都）

⑩ 中村篤史、今西未来、土居雅夫、岡村均、二木史朗 「ゲノムレベルでの時計遺伝子プロモーター解析を目指した亜鉛フィンガー型人工転写因子の創製とその機能」日本ケミカルバイオロジー学会第 5 年会、2010 年 5 月 10 日、慶応大学日吉キャンパス（横浜市）

[その他]

ホームページ等

<http://www.scl.kyoto-u.ac.jp/~bfdc/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今西 未来 (IMANISHI MIKI)

京都大学・化学研究所・助教

研究者番号：80362391

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし