

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510266

研究課題名(和文) 金属イオン結合およびレドックス制御における亜鉛フィンガータンパク質の構造と機能

研究課題名(英文) Structural and functional analysis of zinc finger protein in metal binding and redox reaction

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、GAGA亜鉛フィンガーを用いてCo(II)およびNi(II)金属置換体を作成し、構造、DNA結合能および酸化反応性について検討を行った。その結果、いずれの金属置換体も野生型に近い配位および二次構造を形成していることが分かった。また、金属置換体は野生型のDNA配列に結合することが明らかとなった。また、シアミドを用いた酸化反応を行った結果、反応性がアポ体>Ni(II)>Co(II)>Zn(II)となり、金属の種類に大きく反応性が依存することが明らかとなった。この反応性の違いは、配位結合の安定性やドメインの安定性の違いに依存すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried to create metallo finger with Co(II) and Ni(II) to investigate its metal-binding and secondary structure, DNA-binding property and oxidation reactivity using GAGA zinc finger protein (GAGA Zf). From UV and CD data, metallo fingers have almost similar coordinate and secondary structure as wild-type GAGA Zf. In DNA-binding assay using gel shift method, metallo finger can bind to cognate DNA sequence (GAGAG). From SELEX experiment, metal-substitution has no effect on the DNA sequence selectivity. Finally, we tried to study the oxidation reactivity metallo finger. As a result of an oxidation reaction with the diamide, reactivity became the following order, that is, apo>Ni(II)>Co(II)>Zn(II) indicating that reactivity strongly depended on the metal ion. Probably, this reactive difference caused by the difference in stability of coordinate bond and domain structure among metallo fingers.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学

キーワード：亜鉛フィンガー 転写因子 金属結合 DAN結合 レドックス SELEX法 タンパク質工学

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。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、タンパク質の構造と機能の基礎的知見の解明さらにより高機能な人工タンパク質の開発を目指してきた。

2. 研究の目的

申請者はタンパク質の構造機能解析および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考えられるからである。また、コファクターである金属イオンに基づく各種分光学的分析手法が利用できるので、構造および機能解析が容易であると考えられる。本研究では、金属タンパク質としてこれまで研究を行ってきた亜鉛フィンガータンパク質を用い(図1)、それをフレームワークとして金属イオン配位部位を中心としたリデザインを行い、亜鉛イオン以外の金属イオンと結合しうる金属置換型フィンガータンパク質の創製ならびにそれらの酸化還元挙動について検討を行う。

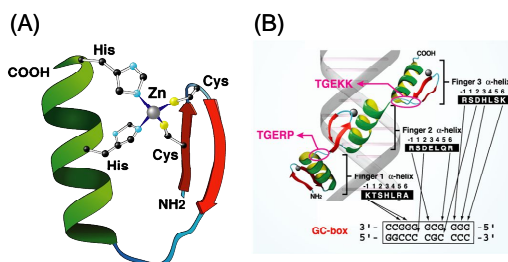


図1. Cys₂His₂型亜鉛フィンガーモチーフ(A)および Sp1亜鉛フィンガータンパク質のDNA認識様式(B).

具体的には、(1)金属置換型フィンガータンパク質のデザイン戦略の検討、(2)金属置換型フィンガーの構造および DNA 結合能の評価、(3)天然型および金属置換型フィンガータンパク質の酸化還元挙動、の三項目を中心に研究を展開し、亜鉛フィンガーの高い亜鉛イオン選択則の解明、人工金属タンパク質のデザイン手法の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究ではデザインの基本フレームなる天然亜鉛フィンガータンパク質としてショウジョウバエ由来の転写因子 GAGA ファクターに含まれる亜鉛フィンガードメイン (GAGA Zf) を選択した(図2)。

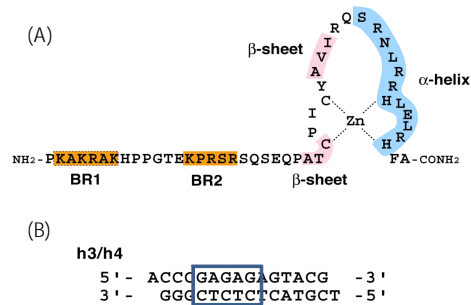


図2. GAGA亜鉛フィンガータンパク質のアミノ酸配列(A)およびターゲットDNA配列(B).

通常、亜鉛フィンガータンパク質は複数のフィンガードメインがタンデムに連結した構造を形成することにより、目的の DNA 配列に対して十分な親和性および特異性を持って結合することができる(図1B)。一方、GAGA Zf は1つのフィンガードメインと塩基性アミノ酸 (Lys, Arg)に富む BR 領域から構成されており(図2A)、従来のタンデム構造様式とは大きく異なる構造をもつ。さらに、GAGA Zf は1つのフィンガードメインのみでターゲット配列である GAGAG 配列(図2B)に高い親和性かつ特異性で結合することができる。今回の金属置換のテーマにおいて、複数のフィンガードメインが存在すると各フィンガー間の構造および機能上の等価性が問題となり、金属置換率の評価も複雑になることが予想されが、GAGA Zf の場合には、このような問題が生じることがない。金属置換体の構造評価は各種分光器 (UV, CD など) を用いて行い、DNA 結合評価としてはゲルシフト法を、配列選択性評価には SELEX 法をそれぞれ用いて検討した。さらに、野生型および金属置換型フィンガーの *in vitro* における酸化・還元挙動について HPLC や TOF - MASS を用いて検討を行った。

4. 研究成果

はじめに、GAGA Zf のアポ体および金属イオン添加に伴う二次構造形成について CD スペクトルにより検討を行った(図3)。

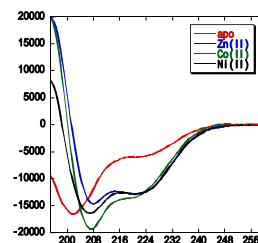


図3. 各種金属イオンを添加した際のGAGA ZfのCDスペクトル。

まず、アポ体の CD スペクトルを測定した結果、200 nm 付近に極小値が認められたことから、水溶液中でランダム構造をとっていることがわかった。次に、Zn(II)、Co(II)及び Ni(II)を添加した際の CD スペクトル測定を行った結果、いずれの場合においても 222 nm 及び 208 nm 付近における CD スペクトル強度が負に増加した。以上の結果から、金属イオン添加により金属置換体は野生型と似通ったββα構造を誘起する起ることが明らかとなった。

各金属イオン添加時における GAGA Zf の金属配位構造を検討するため、UV スペクトル測定を行った(図4)。

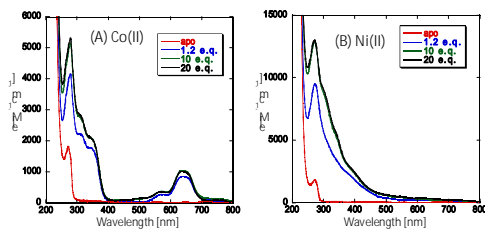


図4. 各種金属イオンを添加した際のGAGA ZfのUVスペクトル。

Co(II)添加時において、320 nm 及び 650 nm 付近に吸収帯が見られた。320 nm 付近に見られた吸収帯は、 S^- Co(II)に基づく電荷移動による LMCT バンドであると考えられ、650 nm 付近に見られた吸収帯は、Co(II)の d-d 遷移によるものであると考えられる。よって、Co(II)は GAGA Zf に配位することがわかった。また、Ni(II)添加時においては、305 nm 及び 400 nm 付近に吸収帯が見られた。この吸収帯は S^- Ni(II)に基づく電荷移動による LMCT バンドであると考えられ、Ni(II) も確かに GAGA Zf に配位していることが明らかとなった。

次に、CD および UV スペクトル測定から、Zn(II)と同様に Co(II)及び Ni(II)は GAGA Zf に配位し、二次構造を誘起することが分かったため、それらの DNA 結合能をゲルシフト法により評価した(図5)。

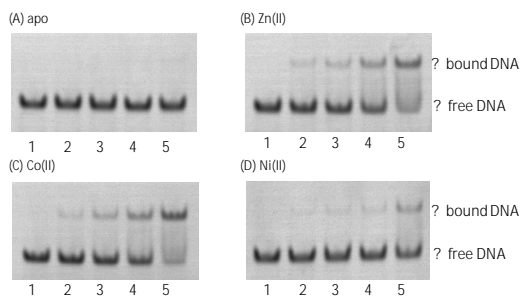


図5. アポ体および金属置換体GAGA Zfのゲルシフトアッセイ。

その結果、アポ体の場合は全くシフトバンドが見られなかったが、Zn(II)、Co(II)及び Ni(II)を添加した場合には明確なシフトバンドが認められた。また、そのシフト率から、DNA に対する親和性

はZn(II) > Co(II) > Ni(II)の順であることがわかった。これまでの本研究室の研究から亜鉛フィンガーの DNA 結合において、十分に安定な疎水性コアがフィンガードメインに形成されなければ、それ自体の構造の不安定化し、結果としてDNA 結合能が低下することが分かっている。以前の研究から、Zn(II)及び Co(II)と比較して Ni(II)の金属イオン配位の結合定数が小さいことが明らかとなっている。従って、Ni(II)は、Zn(II)及び Co(II)と比較して金属配位能が比較的弱いため、安定なドメインを誘起することが出来ず、DNA 結合能が低下すると考えられる。

次に、金属置換フィンガーの構造因子である金属イオン配位が DNA 配列選択性に対してどのような影響を与えるかを Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment (SELEX 法)を用いて行った(図6)。

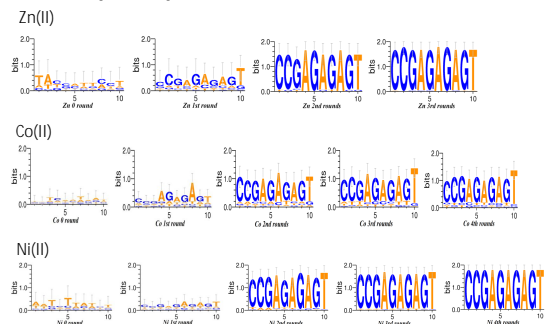


図6. SELEX法による金属置換体GAGA Zfの結合配列探索。

その結果、Zn(II)、Co(II)および Ni(II)置換体 GAGA Zf において、収束速度は異なるものの、すべて同じ CCGAGAGAGT 配列へ収束することが明らかとなり、金属置換による DNA 結合選択性に差は認められなかった。DNA 結合配列の収束率は Zn(II)と Ni(II)ではほぼ同じで、Co(II)ではやや低いことが分かった。本研究で得られた配列は野生型の結合部位である GAGAG の 5 塩基配列だけでなく、その周辺配列もゲノム DNA に見出された配列と完全に一致したため、GAGA Zf における DNA 結合には GAGAG 以外の周辺配列も重要な役割を示すことがわかった。

最後に、diazenedicarboxylic acid bis (*N,N*-dimethylamide)(以下ジアミドと略す)を用い GAGA Zf の酸化型タンパク質を作製し、Zn(II)添加に伴う構造誘起能、金属イオン配位挙動及び DNA 結合能について考察した。また、金属置換体 GAGA Zf を用いてジアミドとの酸化反応について検討を行った。金属置換により、ドメイン構造が類似し、かつ配位結合の安定性の異なるフィンガーを作製できたと考えられる。これを利用して、金属イオン配位の安定性の違いが GAGA Zf の酸化反応にどのような影響を与えるかを、これらの金属置換体フィンガーを用いて検討した。

酸化型 GAGA Zf の CD および UV スペクトルを測定した(図 7)。

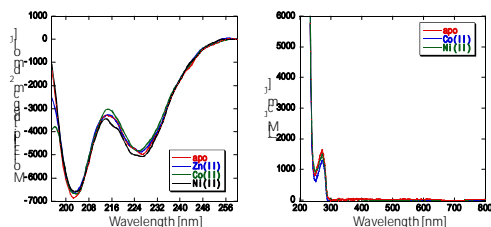


図7. 酸化型GAGA ZfのCDおよびUVスペクトル。

CD スペクトルにおいて、酸化型 GAGA Zf のアポ体では 200 nm 付近に極小値が認められたことからランダム構造をとっていることが示唆された。次に、Zn(II)、Co(II) 及び Ni(II) を 1.2 当量添加した酸化体 GAGA の CD スペクトルをそれぞれ測定したところ、すべてアポ体の CD スペクトルとほぼ一致した。以上の結果から、酸化型 GAGA Zf では金属イオン添加によっても二次構造は誘起されずランダム構をとっていることが明らかとなった。次に酸化型 GAGA Zf の Co(II) および Ni(II) 添加に伴うスペクトル変化を測定した。その結果、金属添加によりスペクトルには全く変化が認められなかったことから、酸化されることにより完全に金属配位能が失われることが明らかとなった。

次に、酸化型 GAGA Zf の DNA 結合能をゲルシフト法により評価した(図 8)。

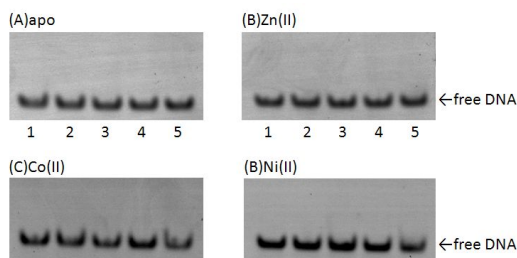


図8. アポ体および酸化型GAGA Zfのゲルシフトアッセイ。

その結果、アポ体および Zn(II)、Co(II) 及び Ni(II) を添加したいずれの場合においても DNA 結合によるシフトバンドは認められず、酸化により完全に DNA 結合能が失われることが明らかとなった。

最後に、アポ体および金属置換体 GAGA Zf に対して酸化剤であるジアミドを加え、酸化反応の経時的変化を HPLC により追跡し、酸化率を求めた(図 9)。

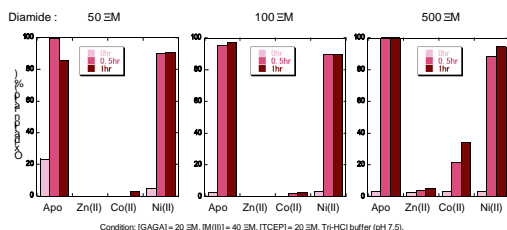


図9. ジアミドによる金属置換GAGA Zfの酸化反応の追跡。

その結果、アポ体ではいずれのジアミドの濃度においても速やかに酸化反応が進行することが分かった。次に金属置換体では、50 および 100 μM のジアミド添加時では、Zn(II)置換体は酸化反応がほとんど見られず、Co(II)置換体においても 1 時間後には 100 μM 添加時では 2.7%、50 μM 添加時でも 2.6% しか酸化されないことが明らかとなった。一方、Ni(II)置換体では、反応 30 分および 1 時間後には、100 μM 添加時に 90%、50 μM 添加時においても 90% とアポ体に匹敵するほどの酸化傾向があることが明らかとなった。本実験の結果から酸化反応性の高さは、アポ体 > Ni(II) > Co(II) > Zn(II) の順となり、恐らく配位結合およびドメインの安定性により反応性が違いが生じたと考えられる。

〔雑誌論文〕(計 3 件)

“Zn(II) binding and DNA binding properties of ligand-substituted CXHH-type zinc finger proteins” M. Imanishi, K. Matsumura, S. Tsuji, T. Nakaya, **S. Negi**, S. Futaki, Y. Sugiura, *Biochemistry*, 査読有, Vol. 24, pp. 3342-3348, (2012).

“Rational design of DNA sequence-specific zinc fingers” H. Kono, M. Imanishi, **S. Negi**, K. Tatsutani, Y. Sakaeda, A. Hashimoto, C. Nakayama, S. Futaki, Y. Sugiura, *FEBS Lett.* 査読有, Vol. 586, pp.918-923, (2012).

“An arginine residue instead of a conserved leucine residue in the recognition helix of the finger 3 of Zif268 stabilizes the domain structure and mediates DNA binding” **S. Negi**, M. Imanishi, M. Sasaki, K. Tatsutani, S. Futaki, Y. Sugiura, *Biochemistry*, 査読有, Vol 50, pp.6266-6272, (2011).

〔学会発表〕(計 2 件)

“GAGA metallo finger peptides; Its metal-binding, DNA-binding and Redox properties”, International conference on biological inorganic chemistry (ICBIC 16)(Grenoble).

Shigeru Negi, Yukio Sugiura

〔その他〕

http://research-bd.dwc.doshisha.ac.jp/rd/html/japanese/researchersHtml/2718/2718_Researcher.html

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