

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月 10日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23710251

研究課題名（和文）化学修飾型基質を特異的に取り込むDNAメチル化酵素を用いたメチル基継承機構の研究

研究課題名（英文）Development of orthogonal combinations of artificial DNA methyltransferases and their substrates for study of heritable patterns of DNA methylation.

研究代表者

野村 渉 (NOMURA WATARU)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授

研究者番号：80463909

研究成果の概要（和文）：メチル基の継承に関する解析を目的として、修飾型 S-アデノシル-L-メチオニン（SAM）の化学合成とそれを特異的に取り込みメチル基の代わりにシトシンに導入する DNA メチル化酵素の創製を目的とした。分割型メチル化酵素の会合様式を詳細に解析するためにアフィニティー精製によって得られた酵素を用いたカイネティクス解析を行った。その結果、標的 DNA 配列の非存在下では分割型ドメイン間の相互作用は無く、それぞれの構造に関しても変化が起きていないことが明らかにされた。標的 DNA が存在する場合は、各ドメインの DNA 結合活性が上昇することから、会合に際して相互作用が存在することが示唆された。また、細胞内における標的配列特異的な DNA メチル化を行うために、数種類の標的に対して結合するジンクフィンガードメインを構築し、ゲノム遺伝子に対する結合も確認された。細胞内における酵素反応においては酵素の発現量も重要な要素になることが考えられた。そこで、コドン配列を最適化することによってメチル化酵素の細胞内発現量が向上することに成功した。本研究で得られた知見は細胞内における DNA メチル化パターンの維持に関する知見を得るために必要な技術要素として重要なものであると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Covalent modification of DNA, such as cytosine methylation, can induce heritable gene silencing. If epigenetic modifications can be specifically targeted, new approaches to transcriptional therapy should result. To address this challenge we have constructed methyltransferases that would act only at a desired site by adapting the sequence-enabled assembly strategy. This is the first successful application of the sequence-enable enzyme reassembly approach in vivo. In this study, to determine the functions of split protein domains in DNA binding and methylation, the split domains were expressed and purified separately. Utilizing these domains, DNA binding analyses were performed. The results indicate cooperative binding of the domains to the specific DNA targets. This interaction between the domains shows a direct evidence of assembly on the target sequence of split domains. The complementary protein assays have been shown their usefulness in dissection of protein interaction in mammalian cells. However, a few of direct approach to evaluate kinetics of interaction of split domains have been performed. Moreover, to expand the targetable DNA sequences on genomic DNA, several zinc finger domains were constructed. These domains showed DNA binding on endogenous targets. To perform efficient DNA methylation in mammalian cells, the expression of methyltransferase would be a key factor. Thus, the codon usage of methyltransferase was optimized. The expression of methyltransferase was greatly increased. The present results would expand the knowledge in the design of split protein domains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生体機能関連化学

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：生体分子の化学修飾

1. 研究開始当初の背景

2003年のヒトゲノム全塩基配列の解読終了に始まるポストゲノム時代を迎えて以来、ゲノム情報を利用した医学研究、創薬（医薬品開発）研究が活発に行われている。現在、研究は更に発展を遂げ、包括的なエピジェネティクス情報（エピゲノム）を明らかにしようとする動きが世界的に盛んになってきている。エピジェネティックな化学反応、化学修飾にはヒストン修飾、ヒストンの存在位置やそれに伴うクロマチン密度の違い、ヌクレオソームの再構築機構、DNA塩基のメチル化、さらにはsmall RNAやnon-coding RNAの機能解析などが含まれる。これらエピジェネティクスの要素は転写因子の機能やDNA結合タンパク質の働きと密接な関係を持つため、それらが細胞の世代間をまたいで受け継がれる遺伝子発現パターンを決定付ける細胞記憶の長期にわたる維持に重要であると考えられている。申請者はこれまでの研究において標的遺伝子配列に対して特異的に結合するDNA結合タンパク質であるジンクフィンガータンパク質に関する研究を展開してきた。ジンクフィンガータンパク質は約30アミノ酸からなるββα構造を有するモジュールがリンカーを介して連結された構造をとる。1個のモジュール構造はDNA3塩基と相互作用することが知られている。すなわち、このモジュールを標的配列に応じて並べることで任意の遺伝子配列に対して結合するタンパク質を創製できる。このようなジンクフィンガータンパク質の特徴を生かして遺伝子診断もしくは遺伝子治療ツールとしての研究が展開されている。例としてDNA切断酵素、DNA組換え酵素、DNAメチル化酵素などDNA修飾酵素との融合タンパク質としての活用が挙げられる。申請者はDNAメチル化酵素を利用した融合酵素を創製し、これまでに報告している。この研究においてはメチル化酵素を分割型にし、それぞれをジンクフィンガータンパク質と融合させた。この結果、ジンクフィンガータンパク質が標的とする遺伝子配列部分においてのみメチル化が行うことができる酵素を構築することに成功した。メチル化反応を制御するためにはより特異性の高いDNAメチル化酵素が必要とされると考えられるためジンクフィンガータンパク質によってDNA結合を制御で

きる分割融合型メチル化酵素はメチル化反応を自在に操る分子の候補の一つとして有用であると考えている。本研究ではこのようなメチル化酵素を活用し、非天然型の基質取り込み機能を付加することでさらに高機能な酵素の創製を試みることにした。

2. 研究の目的

DNAのシトシンメチル化はゲノムを中心とした生命機能の発現において重要な役割を担う。メチル化パターンが細胞の世代間で継承され、長期的に細胞記憶が維持される。本研究では分子生物学的手法に化学的修飾手法を取り入れることでメチル基の継承機構の解明を試みる。具体的には化学修飾型S-アデノシル-L-メチオニンを基質として取り込むDNAメチル化酵素を設計、創製し、標的とする遺伝子配列に修飾型メチル基（もしくは代替官能基）を導入する。このシトシン標識法は同一の標的メチル基の観察、検出を継続して行えるという点で現在開発が進むメチル化パターンの可視化やシーケンズ技術とは一線を画すものであり、遺伝情報の継承機構について明確な答えを与える技術になると考えられる。

3. 研究の方法

本研究計画ではメチル基の継承に関する解析を目的として、修飾型S-アデノシル-L-メチオニン（SAM）の化学合成とそれを特異的に取り込みメチル基の代わりにシトシンを導入するDNAメチル化酵素の創製を行う。SAMはこれまでに報告がある誘導体に加え、アジド基を有する誘導体を合成する。このアジド基がシトシンに導入されることで、クリック反応によって蛍光基などのマーカー分子を容易に目的遺伝子に導入できる。DNAメチル化酵素に点変異を導入することで理論的にリガンド結合ポケットを修飾型SAMに最適化した酵素を創製する。創製した酵素の反応性はin vitroでの解析によって熱力学的に定量を行う。標的とする遺伝子に対して特異的な反応を行うために、DNAメチル化酵素のDNA結合ドメインはジンクフィンガードメインを用いる。DNAメチル化酵素として申請者が開発した分割型メチル化酵素も併用し、特異性の高い酵素の開発を試みる。哺乳

類細胞内でのシトシンの修飾を行うことを最終目標とする。ゲノム遺伝子に対する修飾に関する解析はシトシン修飾反応後にゲノム遺伝子を抽出して解析を行う。

4. 研究成果

分割型メチル化酵素の会合様式 (図 1) を詳細に解析するために精製酵素を用いたカイネティクス解析を試みた。

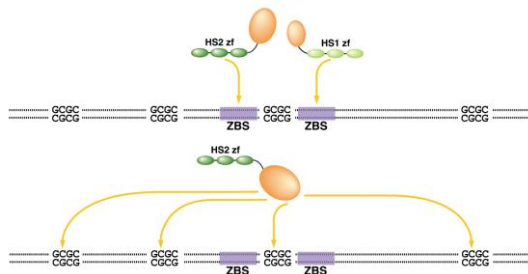


図 1. 分割型 DNA メチル化酵素の会合様式について 分割型 (上) にすることで標的 DNA 上でのみメチル化反応が行える。

これまでに、C 末端側ドメイン (MeCD) について T7 プロモーター発現系では発現が困難であったため、コールドショックプロモーターを有するプラスミドを用いてヒスチジンタグ融合タンパク質として発現を行った。その結果、可溶性画分に目的タンパク質を得ることができた。N 末端側ドメイン (MeND) は MBP 融合タンパク質として発現を行い、それぞれアフィニティー精製によって 90% 以上の純度で分割型メチル化酵素の各ドメインを得ることができた (図 2)。

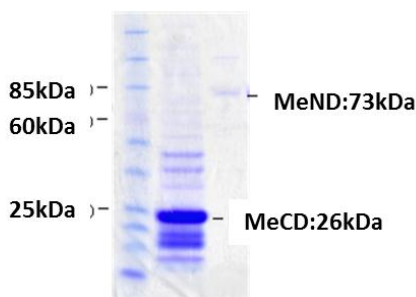


図 2. アフィニティー精製によって得られた各分割型ドメインの SDS-PAGE の結果について

また、DNA 結合実験のコントロールとして各分割型ドメインに含まれているジンクフィンガードメイン (ZF) を独立して発現・精製を行い、メチル化酵素との融合による DNA 結合への影響を確認することにした。DNA 結合については標的配列を含むヘアピン型オリゴをプレートに吸着させ、ターゲット ELISA 法を用いて行った。その結果、MeND 中の ZFP (HS2) は 48.4 nM、MeCD 中の ZF (HS1) は 67.5 nM という K_d 値を示し、十分

な DNA 結合親和性を有することが示された。次に同様の実験系を用いて MeND および MeCD の DNA 結合実験を行った。この結果、MeND においては K_d が 256 nM であり、ZFP のみと比較して 5 倍程度の親和性の低下が見られたものの、十分な DNA 結合活性を有することが示された。MeCD においては K_d 値が 10 μ M 以上であり、顕著な DNA 結合性の低下が確認された。次に分割型ドメイン間の相互作用について標的 DNA 配列存在下で検討を行った。MBP 融合タンパク質である MeND の DNA 結合を ELISA 法によって検出する系内に MeCD が存在することで DNA 結合親和性の上昇が確認された (図 3)。このことから分割型メチル化酵素は標的 DNA の存在下で効率的な会合をすることが示された。

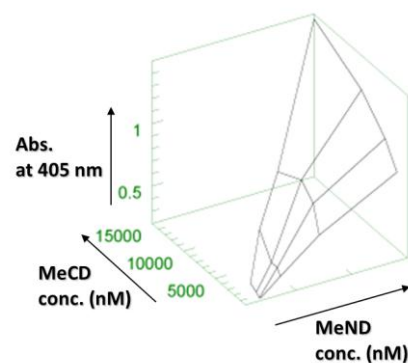


図 3. 各分割型ドメインを混合した場合の DNA 結合活性の上昇について

分割型 DNA メチル化酵素の会合様式に関するカイネティクス解析を詳細に行うために得た精製酵素を用いて CD スペクトルの測定を行った。各分割型ドメインのスペクトル、および混合した場合のスペクトルを比較したところ、C 末端ドメイン (MeCD) および N 末端ドメイン (MeND) について、混合時のスペクトルは和を示していた。よって、混合時はそれぞれの分割型ドメインの構造的な変化は起きていないことが明らかになった。この測定条件では標的 DNA が存在していないため、分割型 DNA メチル化酵素が標的配列に結合したのちに会合をしてメチル化活性を発現するという予測に対する根拠

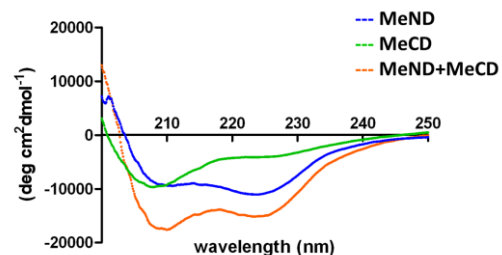


図 4. CD スペクトル測定の結果

の一つが得られたと考えられる。

また、標的とする DNA 配列の拡張を行うため、テロメア逆転写酵素のプロモーター配列、ASH1、ATF3 各遺伝子のコーディング配列に対して結合するジンクフィンガーの構築を行った。分割型酵素の DNA 結合ドメインとして、隣接する配列に結合する 2 個のジンクフィンガードメインが 1 対になる。それぞれの標的遺伝子に対して約 20 対のジンクフィンガードメインを構築し、その中から数—数 10 (nM) の高い DNA 結合活性を有するジンクフィンガードメインを得ることに成功した。また、哺乳類細胞内において活性を有するメチル化酵素の構築を検討するため、ジンクフィンガードメインと DNA メチル化酵素 M.HhaI の融合酵素を構築し、細胞内での発現に関する検討を行った。最初の段階では発現が見られなかったが、フェージ由来のメチル化酵素である M.HhaI の遺伝子配列についてコドンの最適化を行ったところ、良好な発現が確認された。発現が最適化されたメチル化酵素ドメインを基に分割型メチル化酵素の構築を行うことで、細胞内において配列特異的な DNA メチル化を行うことが可能になり、メチル基の継承に関する知見につながると期待される。

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 11 件)

- (1) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Hirota Y, Ohashi N, Hashimoto C, Nomura W, Matsushita S, Tamamura H. CD4 mimics as HIV entry inhibitors: Lead optimization studies of the aromatic substituents. *Bioorg. Med. Chem.* 21; 2518-2526, 2013.
DOI: 10.1016/j.bmc.2013.02.04
- (2) Narumi T, Aikawa H, Tanaka T, Hashimoto C, Ohashi N, Nomura W, Kobayakawa T, Takano H, Hirota Y, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Low-molecular-weight CXCR4 ligands with variable spacers. *ChemMedChem* 8; 118-124, 2013.
DOI: 10.1002/cmdc.201200390
- (3) Narumi T, Tanaka T, Hashimoto C, Nomura W, Aikawa H, Sohma A, Itotani K, Kawamata M, Murakami T, Yamamoto N, Tamamura H. Pharmacophore-based small molecule CXCR4 ligands. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 22; 4169-4172, 2012.
DOI: 10.1016/j.bmcl.2012.04.032
- (4) Hashimoto C, Nomura W, Ohya A, Urano E, Miyauchi K, Narumi T, Aikawa H, Komano JA, Yamamoto N, Tamamura H. Evaluation of a synthetic C34 trimer of HIV-1 gp41 as AIDS vaccines. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 2012, 3287-3291.
DOI: 10.1016/j.bmc.2012.03.050
- (5) Nomura W, Masuda A, Ohba K, Urabe A, Ito N, Ryo A, Yamamoto N, and Tamamura H. Effects of DNA Binding of Zinc Finger and Linkers for Domain Fusion. on Catalytic Activity of Sequence-Specific Chimeric Recombinases Determined by a Facile Fluorescent System. *Biochemistry* 51; 1510-1517, 2012.
DOI: 10.1021/bi201878x
- (6) Nomura W, Hashimoto C, Ohya A, Miyauchi K, Urano E, Tanaka T, Narumi T, Nakahara T, Komano JA, Yamamoto N, and Tamamura H. Synthetic C34 Trimer of HIV-1 gp41 Shows Significant Increase of Inhibition Potency. *ChemMedChem* 7; 205-208.
DOI: 10.1002/cmdc.201100542
- (7) Narumi T, Komoriya M, Hashimoto C, Wu H, Nomura W, Suzuki S, Tanaka T, Chiba J, Yamamoto N, Murakami T, and Tamamura H. Conjugation of Cell-penetrating Peptides Leads to Identification of Anti-HIV Peptides from Matrix Proteins. *Bioorg. Med. Chem.* 20; 1468-1474, 2012.
DOI: 10.1016/j.bmc.2011.12.055
- (8) Narumi T, Arai H, Yoshimura K, Harada S, Nomura W, Matsushita S, and Tamamura H. Small Molecular CD4 Mimics as HIV Entry Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem.* 19; 6735-6742, 2011.
DOI: 10.1016/j.bmc.2011.09.045
- (9) Hashimoto C, Tanaka T, Narumi T, Nomura W, and Tamamura H. The successes and failures of HIV drug discovery. *Expert Opin. Drug Discovery* 6; 1067-1090, 2011.
DOI: 10.1517/17460441.2011.611129
- (10) Tanaka T, Narumi T, Ozaki T, Sohma A, Ohashi N, Hashimoto C, Itotani K, Nomura W, Murakami T, Yamamoto N, and Tamamura H. Azamacrocyclic Metal Complexes as CXCR4 Antagonists. *ChemMedChem* 6; 834-839, 2011.
DOI: 10.1002/cmdc.201000548
- (11) Nomura W, Ohashi N, Okuda Y, Narumi T, Ikura T, Ito N, and Tamamura H. Fluorescence-Quenching Screening of Protein Kinase C Ligands with an Environmentally Sensitive Fluorophore. *Bioconjugate Chem.* 22; 82-87, 2011.
DOI: 10.1021/bc100567k

[学会発表] (計 17 件、うち招待講演 2 件)

- (1) Masuda A, Nomura, W, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Studies for Optimum

- Design of Artificial Zinc Finger Recombinases by Evaluation of Effects of DNA Binding Affinity and Linker Components on Recombination Efficiency. 22nd American Peptide Symposium 2011 年 6 月 25-30 日 アメリカ・サンディエゴ
- (2) Yamamoto J, Tanaka T, Denda M, Shigenaga A, Nomura W, Tamamura H, Otaka A. Design and Synthesis of Traceable Linker for Efficient Enrichment and Specific Labeling of Target Proteins. 22nd American Peptide Symposium 2011 年 6 月 25-30 日 アメリカ・サンディエゴ
- (3) Nomura W, Nakahara T, Hashimoto C, Ohba K, Narumi T, Yamamoto N, Tamamura H. Synthesis of HIV Gp41 Trimer Mimics Inducing Neutralizing Antibodies Based on Remodeling of Dynamic Structures of HIV-1 Envelope Proteins. 22nd American Peptide Symposium 2011 年 6 月 25-30 日 アメリカ・サンディエゴ
- (4) Urabe A, Nomura W, Masuda A, Tamamura H. Sequence-Specific Recombination Enabled by a Pair of Zinc Finger Recombinases. The 9th Australian Peptide Conference 2011 年 10 月 16-20 日 オーストラリア・クイーンズランド
- (5) Nomura W, Ohashi N, Narumi T, Lewin NE, Blumberg PM, and Tamamura H. Synthesis of C1b Domains of Protein Kinase C Having Solvatochromism and their Application to Bio-sensing. The 9th Australian Peptide Conference 2011 年 10 月 16-20 日 オーストラリア・クイーンズランド
- (6) Masuda A, Nomura W, Ohba K, Yamamoto N, Tamamura H. Development of Artificial Recombinases for Genome Editing. 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium 2011 年 11 月 29 日-12 月 2 日 東京
- (7) 野村 渉、玉村啓和 配列特異的 DNA 切断の化合物による制御法の開発 日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会 2011 年 5 月 23-25 日 東京
- (8) 増田朱美、野村 渉、卜部亜里沙、玉村啓和 高い反応効率をもつ亜鉛フィンガー融合型 DNA 組換え酵素の構築 日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会 2011 年 5 月 23-25 日 東京
- (9) 野村 渉、近藤麻美、卜部亜里沙、増田朱美、梁明秀、玉村啓和 亜鉛フィンガーヌクレアーゼを用いた EB ウイルス弱毒化に関する研究 日本ケミカルバイオロジー学会第 6 回年会 2011 年 5 月 23-25 日 東京
- (10) 野村 渉、増田朱美、卜部亜里沙、玉村啓和 細胞内における配列特異的 DNA 組換え反応の定量的測定法開発 第 11 回日本蛋白質科学会年会 2011 年 6 月 7-9 日 大阪
- (11) 野村 渉 人工酵素のデザインに基づくゲノム修飾・編集法の開発 「細胞を創る」研究会 5.0 (招待講演) 2012 年 11 月 21-22 日 横浜市
- (12) 野村 渉、増田朱美、卜部亜里沙、玉村啓和 ジンクフィンガー融合型酵素によるゲノム編集法の開発 日本ケミカルバイオロジー学会第 7 回年会 2012 年 6 月 7-9 日 京都市
- (13) 増田朱美、野村 渉、玉村啓和 設計型 DNA 組換え酵素の配列特異的反応に関する定量的解析 第 49 回ペプチド討論会 2012 年 11 月 7-9 日 鹿児島市
- (14) Nomura W, Masuda A, Kondo A, Ohba K, Yamamoto N, and Tamamura H. Studies of Designer Zinc Finger Enzymes and Applications for Genome Editing and Modification. The 26th Annual Symposium of the Protein Society 2012 年 8 月 5~8 日 San Diego, USA
- (15) Nomura W, Kondo A, Masuda A, Ryo A, and Tamamura H. Development of zinc finger nucleases targeting Epstein-Barr virus genome for suppression of viral production in B cells. FASEB SRC, Genome Engineering: Research & Applications 2012 年 9 月 2 日~10 日 Lucca, Italy
- (16) Nomura W, Masuda A, and Tamamura H. Development of Zinc Finger Enzymes for Genome Engineering. The First International Symposium on Biofunctional Chemistry 2012 年 11 月 28~30 日 Tokyo, Japan
- (17) 野村 渉 ジンクフィンガー融合型酵素による遺伝子発現制御法の開発 日本薬学会第 133 年会 (招待講演) 2013 年 03 月 27-30 日、横浜市

〔図書〕 (計 2 件)

- (1) 野村 渉、田中智博、玉村啓和 「HIV 阻害剤・腫瘍認識プローブとしてのケモカイン受容体リガンド」ペプチド医薬の最前線、(株)シーエムシー出版 2012
- (2) 野村 渉、田中智博、相川春夫、玉村啓和 「多価結合型 GPCR リガンドの合成とがん細胞イメージングへの応用」最新ペプチド合成技術とその創薬研究への応用 株式会社メディカルドゥ 2012

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

東京医科歯科大学生体材料工学研究所メ
ディシナルケミストリー分野ウェブページ
[http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/molb/member/
nomura.html](http://www.tmd.ac.jp/i-mde/www/molb/member/nomura.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村 渉 (NOMURA WATRU)

東京医科歯科大学・生体材料工学研究所
准教授

研究者番号：80463909

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし