

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570144

研究課題名(和文) 転写因子SATB1に対する複合標的核酸創薬基盤の開発

研究課題名(英文) Development of nucleic acids therapeutics against multiple domains of transcription factor SATB1

研究代表者

山崎 和彦 (Yamasaki, Kazuhiko)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：00358243

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子SATB1の複数の機能ドメインに結合して阻害を行う核酸分子の取得を目的とし、特に3つのDNA結合ドメインの結合特性について等温滴定熱量計による精査を行って、配列特異的認識を担うもの(CUTr1ドメイン)を特定すると同時に、チオリン酸基などの修飾の導入により、特に生体内に近い塩濃度下で非修飾核酸よりも高結合活性をもつ核酸分子種の取得に成功した。この分子種とCUTr1ドメインの複合体立体構造を結晶解析法によって解明し、導入したチオリン酸基とタンパク質のアミノ酸側鎖の間に、疎水性相互作用が生じることが、高活性化の要因となることを発見した。

研究成果の概要(英文)：The scope of this project is to obtain nucleic acids that have inhibitory activities against transcription factor SATB1 through binding to its functional domains. We investigated properties of three DNA-binding domains by isothermal titration calorimetry and found that only one of them (CUTr1) is responsible for the sequence-specific DNA binding. By introducing phosphorothioate modification, we obtained a high-affinity nucleic acid especially under salt concentration close to biological condition. Crystal structure of complex of this nucleic acid and CUTr1 revealed that hydrophobic interactions between phosphorothioate and amino acid side chain are responsible for the high affinity.

研究分野：構造生物学、生化学

キーワード：転写因子 核酸創薬 がん タンパク質核酸相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

SATB1 (Special AT-rich Sequence Binding Protein 1) は、乳がんの悪性化 (Han *et al. Nature* 452, 187-195, 2008.)、免疫 T 細胞の分化 (Arvarez *et al. Genes Dev.* 14, 521-535, 2000.)、ES 細胞の分化 (Savarese *et al. Genes Dev.* 23, 2625-2638, 2009.)、胎児性グロブリンのスイッチ (Wen *et al. Blood* 105, 3330-3339, 2005.)、HIV-1 ウイルスの感染 (Kumar *et al. Mol. Cell. Biol.* 25, 1620-1633, 2005.) など、様々な医学的に重要なプロセスでの転写制御を担う転写因子として、知見の蓄積が加速しているタンパク質である。標的遺伝子領域に配列特異的に結合するための複数の DNA 結合ドメイン (CUTr1 ドメイン、ホメオドメイン) と、他のタンパク質と結合するための PDZ ドメインをもつ。これにより、ヒストン修飾酵素を特定の DNA 領域にリクルートし、ゲノムのループ構造を変換させることによって、腫瘍発生や転移促進に関わる広範な遺伝子群などをまとめてコントロールすることから、「ゲノムオーガナイザー」と呼ばれる (Han *et al. Nature* 452, 187-195, 2008.; Yasui *et al. Nature* 419, 641-645, 2002.)。SATB1 は、リン酸化修飾の有無に依存して、相互作用するヒストン修飾酵素の種類 (アセチル化酵素と脱アセチル化酵素) が変化し、転写制御の方向性が 180 度変わることが知られている (Kumar *et al. Mol. Cell.* 22, 231-243, 2006.)。したがって、SATB1 に対する創薬においては、様々な作用点を標的とすることが有効となる。

DNA や RNA を素材とする核酸医薬は、抗体に替わる次世代の創薬として注目されている。標的となるタンパク質の発現を二重鎖 RNA によって抑制する RNAi や、標的に結合して活性を抑制するアプタマー、プロモータ部位へ転写因子の結合を競合的に阻害するデコイ (おとり) などが、様々な対象について開発されつつある。本研究では、SATB1 分子の各機能ドメインや認識配列を持つ MAR-DNA を標的とした新規アプタマー/デコイの開発を目的とする。国内でも SATB1 の認識 DNA を用いたデコイの開発が行われ、乳がん細胞の悪性度の軽減が認められている (Yamayoshi *et al. Oligonucleotides* 21, 115-121, 2011.)。

研究代表者の山崎は、のべ 5 年間にわたる科研費研究として、ヒト SATB1 の機能発現機構に関する構造生物学的研究を行ってきた (Yamaguchi *et al. J. Biol. Chem.* 281, 5319-5327, 2006.; Yamasaki *et al. Nucl. Acids Res.* 35,

5073-5084, 2007.)。特に、複数の DNA 結合ドメインによる MAR-DNA の認識機構に着目し、DNA 結合ドメインやその DNA との複合体についての立体構造決定を行っている。

## 2. 研究の目的

SATB1 の複数の機能ドメイン (タンパク質や DNA との相互作用を担う) を標的とし、それに強く結合して本来の相互作用を阻害する核酸分子の創出を目指す。この分子を核内で作用させることができれば、乳がんの悪性化の軽減などの効果が期待出来る。この時、物理化学的手法によって、核酸と標的ドメインの相互作用に関するパラメータの精査を行うと同時に、構造生物学的手法によって、ドメインと当該核酸の複合体の立体構造解析を行う。これにより、結合メカニズムについての知見を得る。

## 3. 研究の方法

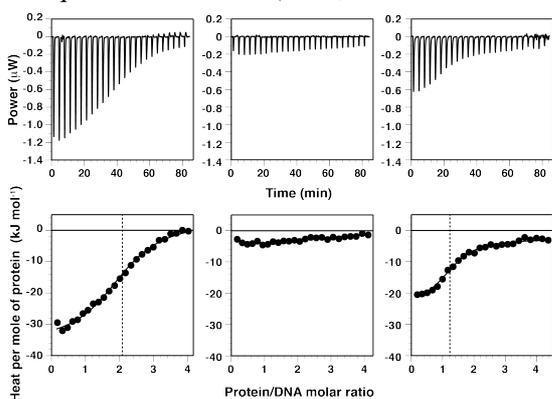
- (1) 機能ドメインの発現、精製を行う。機能ドメインとしては、複数の DNA 結合ドメインとタンパク質 (ヒストン修飾酵素) 結合ドメインを対象とし、特に後者においては、リン酸化やアセチル化などの翻訳後修飾を考慮する。
- (2) 精製した機能ドメインを磁気ビーズに固定することにより、核酸選別システムを作成する。次世代シーケンサーを利用した高効率の結合核酸選別法を用いて、配列の一部をランダム化した一本鎖あるいは二重鎖の核酸から、機能ドメインに結合するものを選別する。この時、天然の核酸だけではなく、化学修飾を施したものも考慮する。特に次世代シーケンサーを用いた方法では、少量の核酸試料から多数の配列データを取得することが可能であるため、SELEX サイクルの途中で、必ずしも増幅をする必要がない。したがって、修飾塩基を用いる点での優位性が高い。
- (3) 選別された核酸分子と SATB1 機能ドメインの結合パラメータについて、等温滴定カロリーメトリー法などの物理化学的手法によって、精査を行う。
- (4) 乳がん由来培養細胞を用いて、核酸分子の増殖阻害等への影響を精査し、阻害剤としての機能を細胞レベルで解析する。
- (5) さらに親和性向上を目指し、選別核酸と機能ドメインの複合体の立体構造解析を行い、結合の様式や結合力の性質を解明する。

## 4. 研究成果

- (1) 複数の DNA 結合ドメインとタンパク質

結合ドメインの発現、精製を行った。発現系としては、大腸菌および昆虫細胞の発現システムを用いて行った。DNA 結合ドメインについては、CUT repeat 1(CUTr1)、Cut repeat 2(CUTr2)、homeodomain の3つのモチーフが確認されている。これらの DNA 結合特性を等温滴定カロリーメトリー法によって解析したところ、CUTr1 および homeodomain には DNA 結合活性が見られたが、CUTr2 はほとんど活性を示さなかった(図1)。また、他の研究グループにより、homeodomain が SATB1 の認識配列である TAATA 配列に結合し、CUTr1 は補助的な役割をするという報告がなされていた(Purbey *et al.*, 2008, *Nucleic Acids Res.*, 272, 2107-2122.)が、私たちの X 線結晶解析の結果では、逆に、CUTr1 が TAATA 配列を認識して結合している(Yamasaki *et al.* *Nucl. Acids Res.* 35, 5073-5084, 2007.)。この相違について確認する目的で、様々に変化した配列を持つ DNA との相互作用を解析したところ、CUTr1 が TAATA 配列を識別し、homeodomain は識別しないことが明らかになった。他のタンパク質の homeodomain が配列特異的結合をする際に必要な Asn 残基に変異を入れて検討したが、やはり、結合性への影響が見られなかった。これらの結果から、結合核酸選別実験においては、CUTr1、homeodomain、CUTr1-homeodomain 融合体を対象とすることとした。

タンパク質結合ドメインとしては、ubiquitin-like domain (ULD; 当初 PDZ-like ド



メインとされていたが、結晶構造解析の結果

図1: 等温滴定カロリーメトリー(ITC)による SATB1 の複数の DNA 結合ドメインの DNA 結合性の解析。左から、CUTr1、CUTr2、homeodomain。TAATA 配列ユニットを2つ有する DNA に対して、CUTr1 は2つ結合するが、homeodomain は1つ程度しか結合しないことを示している。また、CUTr2 はほとんど結合活性を示さない。

として、ULD となった; Wang *et al.*, 2012 *Nucl. Acids Res.* 40, 4193-4202.)を用いた。このドメインはヒストンアセチル化酵素 PCAF によってアセチル化修飾を受けるリジン残基を持つ。また、ULD と近接する CUTL ドメインは protein kinase C(PKC)によるリン酸化修飾を受けるセリン残基を持つ。したがって、PCAF の酵素活性ドメインと ULD の共発現や PKC と ULD-CUTL ドメインの共発現を行うことにより、細胞中での修飾導入を試みたが、有効な結果を得られなかった。そのため、修飾導入のないものについて先行して進めた。

(2) 上述の機能ドメインについて、Hisタグをもつものと、持たないものを調製した。前者を磁気ビーズに固定することにより、核酸選別システムを構成した。配列の一部をランダム化した一本鎖をカスタム合成によって入手し、Klenow酵素によって二重鎖の核酸を作成した。機能ドメインを固定した磁気ビーズと結合させた後、Hisタグを持たないドメインを作用させ、ビーズから遊離させることで、結合力をもつ核酸の回収を行った。これを、PCRによる増幅後、さらに磁気ビーズに作用させ、選別するサイクルを反復して行った。

得られた核酸の配列を次世代シーケンサーによって決定を行った。数万分子以上の配列決定を行って、コンセンサスの取得を試みたが、残念ながら、有意といえる顕著なものは得られなかった。塩濃度やpHなどの条件を変えて実験を繰り返したが、やはりコンセンサス取得には至らなかった。

さらに、生体中での抗分解性に効力をもつ phosphorothioate の修飾を行った核酸を用いて、核酸選別実験を行った(上記のサイクルで、PCR増幅は行わない)が、有意な結果が得られなかったため、ここで、方向を切り替え、CUTr1による特異的認識が確定したTAATA配列をもつDNAに対してphosphorothioateの修飾を行い、結合特性を精査することとした。

(3) TAATA配列を持ち、phosphorothioateの修飾を行ったDNAに対して、等温滴定カロリーメトリー法による精査を行った。50 mM程度の低い塩濃度下では、この修飾DNAは非修飾DNAと顕著な結合力の違いを示さなかったが、生体内に近い200 mMの高塩濃度下では、非修飾DNAでは全く結合が見られないのに対し、修飾DNAでは結合力が残存することが確認された(図2)。

(4) SATB1 を高発現している乳がん由来培養細胞 MDA-MB231 を用いて、核酸分子の増殖阻害等への影響を精査した。Transfection 試薬を用いて核酸分子を細胞内に取り込ませた。

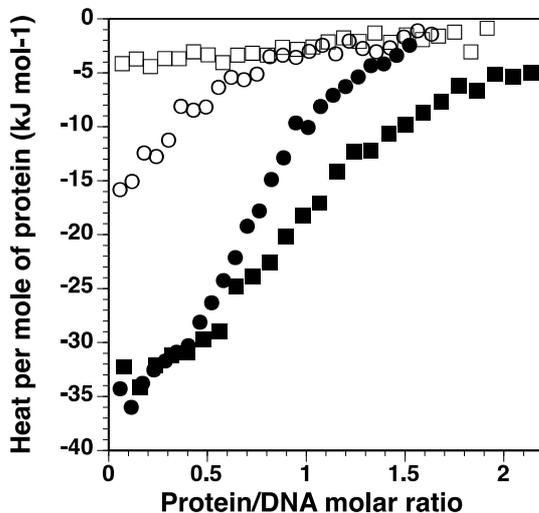


図2: ITCによるSATB1-CUTr1ドメインとphosphorothioate修飾を行ったDNAの結合の解析。○が修飾DNA、□は非修飾のDNA。黒シンボルは50 mM塩濃度下、白抜きシンボルは200 mM塩濃度下。特に高塩濃度下で修飾の顕著な効力が認められる。

この時、核内に核酸が取り込まれていることを、蛍光標識を施した核酸を用いて蛍光顕微鏡により確認した。しかしながら、今のところ、細胞増殖への影響は軽微に留まっているため、実験条件の検討を引き続き行っている。(5) phosphorothioate修飾DNAとSATB1のCUTr1ドメインの複合体を調製し、結晶解析を行った。非修飾のDNAとの複合体の結晶構造解析(Yamasaki *et al. Nucl. Acids Res.* 35, 5073-5084, 2007)に近い条件で結晶化が見られ、構造解析可能な回折データを得た。結晶系は非修飾の場合と異なるものであったが、同様の結合様式が得られた(図3)。導入したS原子とタンパク質のアミノ酸残基の側鎖との間に顕著な疎水性相互作用が見られる箇所がある(図4)。タンパク質と核酸の結合力には、静電的相互作用が大きな寄与をするが、高い塩濃度下では、顕著に弱くなる。疎水性相互作用については、そのようにならないため、ITCで見られた高塩濃度下での結合力の違いを無理なく説明出来る。

(6)まとめ:本研究では、転写因子SATB1の複数の機能ドメインに対する核酸医薬の創出を目的とした研究を行った。次世代シーケンサーを用いたランダム化核酸からの選別実験においては、特別に作用する核酸配列を同定することが出来なかったが、phosphorothioate修飾によって、特に生理的塩濃度に近い条件で、非修飾のものよりも顕著に強い結合活性を示すものを見いだすこと

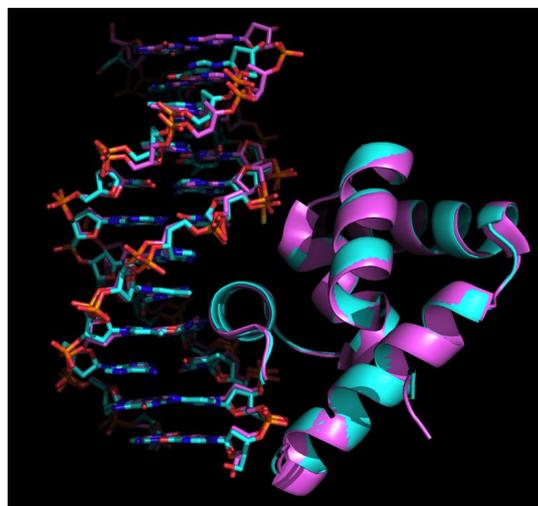


図3: phosphorothioate修飾をもつDNAとSATB1-CUTr1ドメインの複合体立体構造(cyan)。非修飾のDNAによるもの(Yamasaki *et al. Nucl. Acids Res.* 35, 5073-5084, 2007.; magenta)を重ねて表示。結合様式は基本的に保存されているが、DNAの構造に若干変化が見られる。

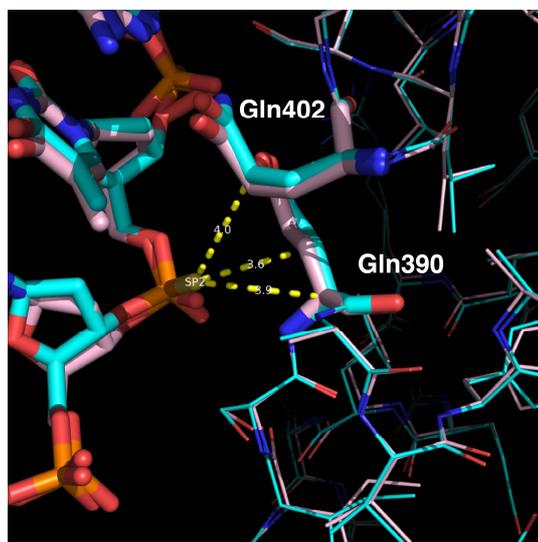


図4: phosphorothioate修飾DNAとSATB1-CUTr1の複合体立体構造に見られる疎水性相互作用(黄色の点線で表示)。S原子と2つのグルタミン残基の炭素原子の間に形成されている。

に成功した。さらに、CUTr1ドメインとの複合体結晶構造解析に成功し、疎水性相互作用がこの強い結合活性の要因となっていることを見いだした。Phosphorothioate修飾は、核酸医薬においては比較的多用されている修飾ではあるが、タンパク質との疎水性相互作用を見た例としては、おそらく初めてのものとなる。また、SATB1の複数のDNA結合ド

メインの間で、CUTr1 のみが配列特異性をもつことを特定したことも、他の研究グループとのこれまでの議論 (Purbey *et al.*, 2008, *Nucleic Acids Res.*, 272, 2107-2122.) に終止符を打つ上で顕著な成果であった。なお、本内容については、2 編の論文としてまとめ、うち 1 編が投稿中、もう 1 編は投稿準備中である。

## 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)

[学会発表](計 2 件)

山崎和彦、山崎智子、転写因子 SATB1 の DNA 認識における弱い配列特異的結合と強い非特異的結合の組み合わせ、第 87 回日本生化学会大会、2014 年 10 月 16,17 日、京都府・京都市

山崎和彦、山崎智子、等温滴定型カロリメトリーと NMR 分光によるタンパク質・核酸相互作用解析、GE Life Sciences Day 2014、2014 年 8 月 1 日、神奈川県・横浜市

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

山崎 和彦 (YAMASAKI KAZUHIKO)  
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員  
研究者番号：00358243

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者

宮岸 真 (MIYAGISHI MAKOTO)  
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・研究グループ長  
研究者番号：30323538

岡田 知子 (OKADA TOMOKO)  
独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・上級主任研究員  
研究者番号：30344146