

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20710165

研究課題名(和文) 亜鉛フィンガーを利用した人工転写因子の創製と人工遺伝子回路形成への展開

研究課題名(英文) Creation of artificial transcription factors for artificial gene circuits

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)：人工的な遺伝子回路形成は様々なフィードバック制御を理解する上での新しい方法になると期待されている。そのような遺伝子回路において機能する転写因子などの調節タンパク質は、様々な DNA 結合特性を有しており、系統的に特性の異なる人工タンパク質や、その機能を人為的にスイッチできるタンパク質は、モデル系の構築に有用であると考えられる。そこで本研究では、標的 DNA 結合配列、親和性、選択性、速度論的特性、などの DNA 結合特性が異なる人工亜鉛フィンガー型 DNA 結合タンパク質および人工転写因子の創製を行った。また、金属イオン応答性の DNA 結合能および転写活性化能を示す人工 DNA 結合タンパク質および人工転写因子の創製に成功した。

研究成果の概要(英文)：Artificial gene circuits is expected to provide a new way to understand various biological events controlled by feedback regulations. Towards the usage of such artificial gene circuits, artificial DNA binding proteins with various DNA binding properties, such as DNA binding affinity, selectivity, kinetics et al., would be important tools. So artificial zinc finger-type DNA binding proteins and transcription factors with various properties for DNA binding were created and examined the functions. Metal-responsive artificial DNA binding proteins and transcription factors were also successfully created.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

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：亜鉛フィンガー、人工転写因子、遺伝子制御

1. 研究開始当初の背景

サーカディアンリズムや代謝調節においては、フィードバック機構を介して遺伝子の発現量が調節されている。このような遺伝子の周期的発現のメカニズムの理解に向けて、分子生物学的アプローチによる、天然タンパク質の解析は精力的に行われている。しかし、システムが複雑なため、まだ不明な点が多い。また、理論的に周期性を生み出す要因に関する数理モデルなども報告されている。しかしながら、理論を実証するためのシステムは確立されていない。人工的に転写のフィードバックループを真核細胞内で構築することができれば、分子生物学的なアプローチとは異なった観点から、遺伝子のフィードバック制御や周期性を生み出す要因にせまることができるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

遺伝子の周期的発現に関わる要因を系統的に理解するためには、まず、系統的に物性を評価することのできる人工転写因子が分子ツールとして必要であると考えた。そこで、亜鉛フィンガーをはじめとする天然のDNA結合モチーフをベースに、様々なDNA結合特性を示す人工タンパク質および、人工転写因子を創製することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 様々なDNA結合モチーフの中で、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。そこで、DNA結合ドメインの性質を系統的に変化させるために、このC2H2型亜鉛フィンガーは魅力的なテンプレートになると考え、これをベースに人工DNA結合タンパク質を作製した。まず、亜鉛フィンガーのDNA結合親和性、選択性、速度論的特徴がどのように細胞内で反映されるのかを評価しておくことが、人工転写因子を遺伝子回路のためのツールとして応用する上で重要である。そこで、様々な改変型亜鉛フィンガーを作製し、精製タンパク質を用いた試験管内でのin vitro DNA結合実験における性質を明らかにした。その上で、転写活性化ドメインと融合させた人工転写因子を細胞内で発現させ、細胞内でのDNA結合性および転写因子としての活性を比較検討した。

(2) 培養細胞を用いて遺伝子回路を用いた実験および解析を行う上で、複数の細胞間で人工タンパク質の機能発現のタイミングを同期させる必要が生じると予測される。そのため、DNA結合もしくは転写機能の発現において、リガンド刺激に応答する人工タンパク質の創製に取り組んだ。特にコバルトイオン、

亜鉛イオンに応答する人工DNA結合タンパク質を作製し、その機能評価を行った。

4. 研究成果

(1) 様々なDNA配列を標的とした人工亜鉛フィンガータンパク質は、各フィンガーが3塩基を認識するという性質を利用すると、様々な3塩基に対応するフィンガーを連結することによって得ることができると考えられる。しかしながら、このような単純なフィンガーの連結によって、いつでも期待するDNA結合親和性、選択性が得られるのか、またDNA結合におけるフィンガー間の協同性といったことは、これまでにほとんど検討されていなかった。そこで、モジュール法により、種々の人工亜鉛フィンガータンパク質を作製し、それらのDNA結合特性をin vitroおよび、細胞内環境で調べた。その結果、十分なDNA結合親和性を示すものは、配列選択性も高く、また、細胞内においてもこの性質は反映されることが明らかとなった。一方、これまでの予想に反し、フィンガーを連結することによって、DNA結合能が得られない、もしくは、DNA結合親和性が低下する例も見出した。フィンガーの組合せが、フィンガー連結体全体のDNA結合能に影響を与え、組合せによっては、正の協同性のみならず、負の協同性も生じ、連結体中では機能しないフィンガーを生み出す可能性をはじめで示唆した。本結果は、亜鉛フィンガーを用いた今後の人工DNA結合タンパク質の創製に有益な情報を与えるものである。

(2) 亜鉛フィンガーモチーフの数が3つのDNA結合タンパク質および、それらを3連結した9-フィンガータンパク質を用いたDNA結合実験を行った。これらのタンパク質は、それぞれ、9および27塩基対のDNA配列に結合することを確認した。一方、インキュベーション時間を変えたDNA結合実験の結果から、3フィンガータンパク質と比較し、9-フィンガータンパク質ではDNA結合平衡到達に時間を要することが示唆された。この性質が細胞内でどのように反映されるのかを明らかにするため、これらに、転写活性化ドメイン、およびエストロゲンレセプターリガンド結合ドメインを融合した、スイッチ型人工転写因子を作製した。リガンド濃度を変化させて、細胞内での機能発現の経時変化を検討したところ、リガンド高濃度では、フィンガー数によらず速やかな転写活性化を示した。一方、リガンド低濃度条件下で、作製したマルチフィンガー型人工転写因子は転写の活性化に遅延を示した。このような性質を有するものは、人工遺伝子回路においても興味深い分子ツールとなりうることを期待される。

(3) 「DNA結合モチーフを利用したDNA結合スイッチの高機能化」を目指して、亜鉛フィ

ンガーとならび代表的な DNA 結合モチーフであるロイシンジッパーのヘリックス部分に化学的な修飾を施した。その結果、コバルト存在下では、ヘリックス含量が低下するとともに、DNA 結合親和性が顕著に低下することが明らかになった。一方、金属イオンキレターの添加によって、DNA 結合能を回復させることができた。これらの結果から、コバルトイオン応答性の人工 DNA 結合タンパク質の創製に成功したといえる。また、C2H2 型亜鉛フィンガーモチーフの配位子を他のアミノ酸に置換した、配位子置換型フィンガーを作製した。天然型では亜鉛イオンとの結合親和性が高すぎるため、亜鉛イオン濃度依存的に DNA 結合能をコントロールすることは困難であった。一方、配位子置換型フィンガーでは、亜鉛イオン濃度が高いときには天然型と同様の DNA 結合能を示し、また金属キレター存在下では、顕著な DNA 結合力の低下が見られた。このように、亜鉛イオン濃度によって人工的に DNA 結合を制御した例ははじめてである。さらに、「細胞内での刺激応答性の遺伝子制御」に向けて、この配位子置換体を含むジンクフィンガー型 DNA 結合ドメインに転写活性化ドメインを融合させた人工転写因子を作製し、細胞内で発現させた。標的結合 DNA 配列を含むレポーターベクターを用いて、転写活性化の亜鉛濃度依存性を検討したところ、作製した人工転写因子は亜鉛イオン濃度に依存した転写活性化能を示すことが明らかとなった。亜鉛フィンガーの種類を変化させることによって、様々なプロモーターに作用できる、亜鉛イオン応答性人工転写因子を創製できる可能性を示す結果である。

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)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Imanishi M, Nakamura A, Morisaki T, Futaki S, Positive and Negative Cooperativity of Modularly Assembled Zinc Fingers., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 387, 440-443 (2009) 査読有り

② Azuma Y, Imanishi M, Yoshimura T, Kawabata T, Futaki S, Cobalt(II)-Responsive DNA Binding of a GCN4-bZIP Protein Containing Cysteine Residues Functionalized with Iminodiacetic Acid., *Angew. Chem. Int. Ed.* 48, 6853-6856 (2009) 査読有り

③ Morisaki T, Imanishi M, Futaki S, Sugiura Y, Rapid Transcriptional Activity in Vivo and Slow DNA Binding in Vitro by

and Artificial Multi-Zinc Finger Protein., *Biochemistry*, 47, 10171-10177 (2008) 査読有り

[学会発表] (計 11 件)

① 今西 未来, 「生命現象の制御を目指した人工転写因子の創製」日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 29 日、岡山市

② 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可能にする亜鉛フィンガー型人工転写因子の創製」日本薬学会第 130 年会、2010 年 3 月 28 日、岡山市

③ 今西 未来, 「生命現象解明ツールとしてのジンクフィンガー型人工転写因子の創製」第 12 回生命化学研究会、2010 年 1 月 9 日、あわら市

④ 中村 篤史, 今西 未来, 土居 雅夫, 岡村 均, 二木 史朗, 「時計遺伝子プロモーター解析へ向けた亜鉛フィンガー型人工転写因子の創製」第 6 回アジア睡眠学会 日本睡眠学会第 34 回定期学術集会 第 16 回日本時間生物学会学術大会 2009 合同大会、2009 年 10 月 27 日、大阪市

⑤ Azuma Y, Imanishi M, Yoshimura T, Kawabata T, Futaki S, “Metal-Induced DNA-Binding Switch of bZIP Proteins Modified with Iminodiacetic Acid (Ida)”, The Fifth iCeMS International Symposium, Biomaterials at the Interface of Chemistry, Physics, and Biology, 2009 年 7 月 27 日、京都市

⑥ 今西 未来, 中村 篤史, 二木 史朗, 「Creation of artificial zinc finger-type transcription factors and effects on the rhythmic expression of clock genes」第 19 回金属の関与する生体関連シンポジウム (SRM 2009)、2009 年 6 月 12 日、吹田市

⑦ 今西 未来, 中村 篤史, 二木 史朗, 「シスエレメントを標的とした人工ジンクフィンガー連結体の DNA 結合性の解析」第 9 回日本蛋白質科学会年会、2009 年 5 月 22 日、熊本市

⑧ 森崎 達也, 今西 未来, 二木 史朗, 杉浦 幸雄, 「細胞内におけるマルチ亜鉛フィンガータンパク質の DNA 結合特性」第 9 回日本蛋白質科学会年会、2009 年 5 月 22 日、熊本市

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

① 名称：遺伝子発現調節タンパク質
発明者：二木史朗、今西未来、能代大輔、中
屋智博、森崎達也
権利者：同上
種類：特願
番号：2010-44245
出願年月日：2010 年 3 月 1 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 0 件）

〔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