

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：34311

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390012

研究課題名(和文) 亜鉛フィンガー蛋白質の揺らぎによる特異的DNA認識とスマート転写因子への展開

研究課題名(英文) Specific DNA Recognition by Fluctuation of Zinc Finger Protein and Development for Smart Transcription Factor

研究代表者

杉浦 幸雄 (SUGIURA, Yukio)

同志社女子大学・薬学部・教授

研究者番号：40025698

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)： 亜鉛フィンガー蛋白質によるDNA結合・認識は、鍵と鍵穴のような絶対的な様式ではなく、周囲の環境に応じて変化しやすい分子同士の柔軟な相互作用に基づいていると考えられた。マルチ亜鉛フィンガードメインは3塩基認識/1フィンガーのモジュール構造ではなく、各亜鉛フィンガーは必ずしもDNA認識において等価ではなく個性があることが明らかになった。天然亜鉛フィンガーと変異導入亜鉛フィンガーとの比較から、DNA認識の寛容さや非最適配列への結合を指標にして、亜鉛フィンガーの個性・位置とDNA複合体の揺らぎに関する興味ある情報を得た。さらに、亜鉛イオン濃度に依存したスイッチ機能を持った人工転写因子などを創製した。

研究成果の概要(英文)： DNA-binding and -recognition by zinc finger proteins are regulated with flexible interaction between molecule and molecule that change by surrounding environment, but not rigid key and key hole mode. Multi-zinc finger domain is not necessarily module structure of 3 base recognition per 1 finger, each zinc finger is individual and is not equivalent. On the basis of natural zinc finger and mutant zinc finger, relation between characteristic of zinc finger and variation of DNA complex is suggested interestingly. Further, metal-responsible artificial transcription factor was created.

研究分野：医歯薬学

キーワード：生命錯体化学 亜鉛フィンガー蛋白質 分子認識 遺伝子 バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

代表的な DNA 結合蛋白質ドメインである亜鉛フィンガーによる DNA 結合・認識は、従来、特異性の高い“鍵と鍵穴”モデルで解釈されてきた。通常、一つの亜鉛フィンガー当たり DNA の 3 塩基を認識し、連続する複数の亜鉛フィンガーが連結した構造をとって DNA に結合していると考えられてきた。しかし、人工的に改変した亜鉛フィンガー蛋白質を用いた DNA 結合実験から、“亜鉛フィンガードメインと DNA との結合は、一対一の絶対的なものではなく、周囲の環境に応じて変化しやすい分子同士の柔軟な相互作用である”という考えに至った。そこで、これまで着目されてこなかった“DNA 結合における亜鉛フィンガードメインの揺らぎ”に焦点を当て、配列特異的な DNA 結合への影響を明らかにすることを目指した。In vitro での物性評価に加え、細胞内における挙動の評価についても検討することを計画した。これらの実験結果は、転写因子による遺伝子配列選択的な転写制御の理解や新しいスマート人工転写因子の創出に有用な知見を与えると期待される。本研究では、亜鉛フィンガー蛋白質の静的並びに動的挙動の評価系として、精製蛋白質を用いた in vitro での DNA 相互作用やダイナミクスを追求するとともに細胞内でのダイナミクスと機能の評価を目指し、物性と機能をつなぐ系統的な成果が期待できると考えられる。

近年、生物・医学領域で亜鉛フィンガーモチーフをモジュール化して、例えば DNA 切断ドメインと融合することによって、遺伝子組み換えを行うという試みが注目されている。しかし、“遺伝子組み換えがおきたかどうか”にのみ興味もたれ、亜鉛フィンガーをモジュール化することの妥当性や結合配列の曖昧さの評価は、機能発現や細胞毒性に直結しているにもかかわらず、ほとんど研究されていない。また、亜鉛フィンガー蛋白質

をはじめとする天然転写因子の DNA 結合ドメインは、標的 DNA 配列への結合を“鍵と鍵穴”モデルとしか捉えておらず、標的配列への結合に至る過程や結合・解離のターンオーバーという動的な挙動に関しては、ほとんど未知である。亜鉛フィンガーの構造と揺らぎの観点から、これらを明らかにすることは、転写因子の機能発現の根幹に対して新しい価値ある情報を与えるとともに、遺伝子に作用する人工 DNA 結合蛋白質のデザインにとっても必須であると考えられる。

## 2. 研究の目的

特定の遺伝子プロモーター領域に作用する DNA 結合蛋白質による DNA 結合・認識様式は、いわゆる“鍵と鍵穴”モデルで解釈されている。しかし、人工的に改変した亜鉛フィンガー蛋白質を用いた DNA 結合実験から、“亜鉛フィンガードメインと DNA との結合は、一対一の絶対的なものではなく、周囲の環境に応じて変化しやすい分子同士の柔軟な相互作用である”という考えに至った。そこで本研究では、相互作用のダイナミクスを理解するため、これまで着目されなかった“亜鉛フィンガードメインと DNA との結合における相互作用の揺らぎ”を解析し、配列特異的な DNA 結合への影響を明らかにする。In vitro での評価に加え、細胞内における動的挙動の評価についても行う。最終的には、亜鉛フィンガー型転写因子による遺伝子配列選択的な転写制御の分子理解や新規スマート人工転写因子の設計・創出を目指す。

## 3. 研究の方法

亜鉛フィンガードメインと DNA との結合における相互の揺らぎを解明するためには、亜鉛フィンガーの個性と複合体の揺らぎとの関係、および細胞内環境における動的挙動などを調べる必要がある。本研究で

は、(1) DNA 結合配列選択性を決定する要因 (配列選択的結合の駆動力) (2) 亜鉛フィンガー・DNA 複合体のダイナミクス、(3) 標的 DNA との複合体形成準備期から特異的結合に至る細胞内での揺らぎ、に関する知見を得る計画を立てた。そのため、天然亜鉛フィンガードメイン、および系統的に改変した人工亜鉛フィンガー蛋白質を作製する。亜鉛フィンガーの個性・位置と揺らぎとの関係を認識配列の寛容さを指標にセレクション法を用いて評価し、亜鉛フィンガー連結体と DNA との結合・解離の速度論的・熱力学的因子を算出し、蛍光蛋白質との融合亜鉛フィンガー蛋白質を細胞内で発現させ、FRAP 観察によって細胞内での運動性を追求する。また、これらの治験を基にして、機能的にスマートな人工転写因子の設計・創製を展開する。

先ず、天然亜鉛フィンガードメインと変異を導入した亜鉛フィンガートを用いて、セレックス法で収束に至らない段階での選択途上配列を解析して、そのバラツキを比較する。特に、認識の揺らぎが、亜鉛フィンガー連結体におけるフィンガーの位置に依存するのか、あるいは個々のフィンガーの性質に大きく依存するのかを種々の変異体を用いて検討する。次に、亜鉛フィンガー・DNA 複合体のダイナミクスの解明のため、一連の亜鉛フィンガー蛋白質およびフィンガー数の異なる人工マルチ亜鉛フィンガー蛋白質の DNA 結合親和性と結合・解離の速度論パラメーターを測定、比較する。さらに、細胞内での揺らぎを議論するため、フィンガー連結数を段階的に増加させた数種の人工マルチ亜鉛フィンガー蛋白質と蛍光蛋白質との融合蛋白質を作製して、細胞内での見かけの拡散速度あるいは速度論的パラメーターを追求する。亜鉛フィンガーの速度論的パラメーターを核内とサイトゾルにおいて比較することによって、環

境の違いに依存した揺らぎについても議論したい。最後に、DNA 結合の精密化および DNA 結合能のスイッチ導入などを示すスマート人工亜鉛フィンガー蛋白質を設計・創製して、ゲノムを標的とする新しい人工転写因子としての可能性を探る。

#### 4. 研究成果

- (1) 先ず、マルチ亜鉛フィンガードメインは“3塩基認識/1亜鉛フィンガー”のモジュール構造と考えられていたが、各フィンガーは必ずしも DNA 結合・認識において等価でないことが、改変型マルチ亜鉛フィンガー蛋白質を用いた精密な選択的 DNA 認識実験および各亜鉛フィンガードメインのシステイン酸化実験の結果から強く示唆された。DNA 認識配列の寛容さや非最適塩基配列への結合実験からも各亜鉛フィンガードメインの個性や位置が重要な因子になっていることから亜鉛フィンガー蛋白質の揺らぎによる DNA 認識が推測された。
- (2) 細胞内における揺らぎによる蛋白質 DNA 相互作用の重要性を検証するため、亜鉛フィンガードメインの連結数を段階的に変化させた人工亜鉛フィンガー蛋白質を遺伝子工学的に作製し、細胞内での見かけの拡散速度や速度論的因子を検討したところ、亜鉛フィンガードメイン周辺の環境の違いに依存した“揺らぎ”が蛋白質 DNA 相互作用に強くかかわっていることが示された。また、細胞核内とサイトゾルとにおいて、タイプの異なる亜鉛フィンガー蛋白質による DNA 結合・認識に明確な差異が観察された。
- (3) 転写活性化の経時的観察において、一定濃度以上のリガンドを添加した場合には、9 - 亜鉛フィンガー型人工転写因子はリガンド添加直後から 3 - 亜鉛フ

インナー型転写因子と同様にレポーター遺伝子の発現を速やかに促進した。しかし、3 - 亜鉛フィンガー型はリガンド濃度非依存的に速やかな転写活性化パターンを示したのに対し、9 - 亜鉛フィンガー型はリガンド濃度を低下させるに従って、その転写活性化が遅延することが明らかになった。マルチ亜鉛フィンガー蛋白質の細胞内挙動は結合平衡到達時間が増大するという in vitro での実験結果が細胞内においても反映されることを暗示している。

- (4) マルチ亜鉛フィンガー蛋白質の細胞内における核酸速度に焦点を当て、FRAP 解析を行った。3 - 亜鉛フィンガーから 6 - 亜鉛フィンガーまで 1 フィンガーずつ増加させるに従って、細胞質での核酸速度に大きな変化は見えなかったが、核内での核酸速度は顕著に低下することが明らかになった。3 - 亜鉛フィンガー型、6 - 亜鉛フィンガー型、および 9 - 亜鉛フィンガー型の 50% の蛍光回復にはそれぞれ約 0.2、60、および 300 秒を要した。DNA 認識に関与するアミノ酸残基を置換した DNA 非依存型亜鉛フィンガー蛋白質を FRAP 解析に用いた場合には、いずれも速やかな蛍光回復曲線を描いたことから、マルチ化に伴う核内拡散速度の顕著な低下は、核内 DNA との相互作用によるものと考えられた。
- (5) 亜鉛フィンガードメイン中の一つのシステイン残基をアスパラギン酸に置換した新規亜鉛フィンガーを作製した。亜鉛イオンの高濃度条件下での DNA 結合能に関して、この新規亜鉛フィンガーは天然亜鉛フィンガーと同等であった。一方、亜鉛イオンの低濃度条件下では、新規亜鉛フィンガーは極めて低い DNA 結合能を与えた。人工転写因子を作製したところ、亜鉛イオンによる転写スイッチ

の ON と OFF が可能になることがわかった。

#### 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4件)

H.Kitagishi, F.Chai, S.Negi, Y.Sugiura, K.Kano, Supramolecular intracellular delivery of an anionic porphyrin by octaarginine-conjugated per-O-methyl- $\beta$ -cyclodextrin, Chem.Comm., 査読有、51, 2421-2424((2015).

M.Imanishi, Y.Sugiura, New functions of zinc fingers revealed by substitution of conserved residues, Zinc Fingers: Structures, Properties and Functions(Ed. by S.Gonzalez, Nova Science Publishers, 査読有、141-154(2012).

H.Kono, M.Imanishi, S.Negi, T.Sakaeda, A.Hashimoto, C.Nakaya, S.Futaki, Y.Sugiura, Rational design of DNA sequence-specific zinc fingers, FEBS Lett., 査読有、586(6), 918-923(2012).

M.Imanishi, K.Matsumura, S.Tsuji, T.Nakaya, S.Negi, S.Futaki, Y.Sugiura, Zn(II) binding and DNA binding properties of ligand-substituted CXHH-type zinc finger proteins, Biochemistry, 査読有、51(16), 3342-3348(2012).

[学会発表](計5件)

S.Negi, K.Kano, Y.Sugiura, Control of DNA-binding of GAL4 zinc finger by porphyrin-cyclodextrin supramolecular system, Eighth

International Conference on  
Porphyrin and Phtaalocyanines,  
June 24, 2014, Istanbul, Turkey

根木滋、福田あずさ、鎌手裕実香、杉浦幸雄、Spl 亜鉛フィンガードメイン  
におけるレドックス応答の非対称性、  
第 41 回生体分子科学討論会、2014 年  
6 月 7 日、福岡市

根木滋、福田あずさ、杉浦幸雄、C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>  
型亜鉛フィンガータンパク質のレドッ  
クス挙動、錯体化学会第 63 回討論会、  
2013 年 11 月 3 日、沖縄市

根木滋、家出悠加、中山千絵、北岸宏  
亮、可能航治、杉浦幸雄、シクロデキ  
ストリン ポルフィリン超分子錯体に  
よる転写因子 GAL4 の DNA 結合の可  
逆的制御、第 30 回シクロデキストリ  
ンシンポジウム、2013 年 9 月 12 日、  
熊本市

S.Negi, Y.Sugiura, GAGA  
Metallofifer: Its Metal-binding, and  
Redox Properties, XVI International  
Conference on Biological Inorganic  
Chemistry, July 23, 2013, Grenoble,  
France

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉浦 幸雄 (SUGIURA YUKIO)  
同志社女子大学・薬学部・特任教授  
研究者番号：40025698

### (2) 研究分担者

根木 滋 (NEGI SHIGERU)  
同志社女子大学・薬学部・特任助教  
研究者番号：50378866