

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510295

研究課題名(和文) リピート配列を持つDNA結合ドメインのDNA結合様式解明と人工蛋白質創製への展開

研究課題名(英文) Elucidation of DNA binding modes of TALEs and creation of artificial DNA binding proteins

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

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)：任意のDNA配列に結合できる人工DNA結合蛋白質は、転写制御やゲノム編集ツールとして有用である。TALE蛋白質はDNA 1塩基を認識するユニットの繰り返し配列を持ち、様々なDNA配列に結合できる。一方、TALEが結合する配列には、5'末端にTが必須という制限があるが、その認識様式に関しては明らかでなかった。本研究では、TALEのDNA結合特性を明らかにし、5'末端塩基の制限がないTALE骨格の探索を目的とした。repeat-1のヘアピンループ領域をランダム化し分子進化法によるセレクションを行った結果、5'末端塩基の種類に依存せずDNAに結合できるTALE骨格を獲得することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Transcription activator-like effectors (TALEs) are useful templates for genome editing at specific sites. However, most TALE binding sites are preceded by a highly conserved 5'-terminal T nucleotide (5'-T), resulting in restriction of target sites. To remove this constraint, tryptophan 232 in the repeat-1 loop region of the dHax3 N-terminal domain was substituted for other 19 amino acids. Furthermore, whole hairpin loop region of repeat-1 was randomized. Although point mutation was insufficient to remove the constraint, directed evolution from the randomized library yielded repeat-1 mutants with unbiased targeting sites for 5'-terminal bases. It was indicated that the repeat-1 loop region of dHax3 is important for 5'-terminal base accommodation, and that molecular evolution of repeat-1 of TALEs is an efficient strategy to remove the constraint and thus allow targeting of any DNA sequences.

研究分野：生体関連化学

キーワード：DNA binding protein Directed evolution

1. 研究開始当初の背景

任意の DNA 配列に結合できる人工 DNA 結合蛋白質は、転写制御やゲノム編集ツールとして有用である。研究開始当初は、応募者を含む世界の研究グループが C2H2 型ジンクフィンガーモチーフを用い、ゲノムを標的とした様々な DNA 結合蛋白質を創製してきた。一方、ジンクフィンガーの DNA 結合能はフィンガーの組合せに依存しやすいことや、ジンクフィンガーはグアニン塩基の少ない DNA 配列には結合しにくいという欠点も存在する。また、遺伝子治療などへの応用へ向けては、より高い DNA 配列選択性も要求される。そのような状況において、これらの問題を軽減する特徴を有する DNA 結合タンパク質テンプレートとして、植物病原菌 *Xanthomonas* 由来の転写因子様蛋白質「Transcription activator-like effector; TALE」が注目を集め始めていた。TALE は DNA 1 塩基を認識するユニットの繰り返し配列を持ち、ユニットのシャッフルにより、様々な DNA 配列に結合できる。一方、その構造や DNA 結合の詳細は不明であった。特に、TALE が結合する配列には、5'末端に T がなければならないという制限があったが、その認識様式に関しては明らかでなかった。また、修飾塩基に対する認識についても報告がほとんど無い状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、TALE 蛋白質の DNA 結合特性の詳細を明らかにし、DNA 結合配列選択性が高く、また標的を選択する際の自由度が高い人工 DNA 結合蛋白質を創製することを目的として研究を行った。

具体的には、TALE が結合する配列には、5'末端に T がなければならないという制限に着目し、この認識に関わる領域の同定と、5'末端塩基の制限がない TALE 骨格の探索を目的とした。

TALE は 34 アミノ酸からなるユニットの繰り返し領域を含んでおり、繰り返しユニットのひとつが標的 DNA の 1 塩基を認識する。各繰り返しユニットは repeat-variable diresidues (RVDs) と呼ばれる 12、13 番目のアミノ酸以外はほぼ完全に保存されており、各ユニットが認識する塩基は、この RVD によって決定される。このため、RVD を変化させるだけで任意の DNA 配列に結合する TALE を容易に作製することができる。しかし、TALE が結合する配列には、繰り返し領域によって認識される配列に加えて 5'末端に T がなければならないという制限がある。この 5'-T の認識には、繰り返し領域直前の繰り返しユニット類似配列 (repeat-1) の関与が予想されており、実際、TALE のひとつである PthXo1 タンパク質の構造解析では、repeat-1 のヘアピンループ中のトリプトフ

アン残基 W232 が 5'-T と近い距離にあることが示唆されている (Mak, A.N., et al., Science, 335, 716-719, 2012)。しかし、その詳細に関しては不明な点が多い。本研究では、このループ領域に着目し、制約のないゲノム改変ツールとしての TALE 骨格の作製を目指し、この 5'末端塩基の制限の解除を行った。

3. 研究の方法

5'末端塩基の認識制限を解除するために、まず、野生型 dHax3 タンパク質に関して、その 5'-T 要求性を確認した。具体的方法として、dHax3 結合配列の 5'末端が A, C, G, T である配列をプロモーター中に挿入したルシフェラーゼレポーターベクターと dHax3 発現ベクターを作製した。これらを HeLa 細胞へトランスフェクションし、24 時間後に細胞を回収、Dual luciferase reporter assay system (Promega) を用いてルシフェラーゼ発現量の解析を行った。

また、ゲルシフトアッセイによっても TALE タンパク質の DNA 結合を評価した。すなわち、dHax3 の大腸菌発現ベクターを構築し、大腸菌 BL21(DE3) 内で IPTG 誘導によってタンパク質を発現させ、His-tag を利用したアフィニティー精製および、ゲル濾過を行った。精製したタンパク質と蛍光ラベルを導入した dsDNA フラグメント (5'末端が A, C, G, T から始まる dHax3 の標的 DNA 配列を含む) とを反応させ、反応液をアガロースゲルで電気泳動した。シフトバンドの割合から、タンパク質の DNA 結合解離定数を算出した。

続いて、結晶構造解析からその関与が示唆されている、repeat-1 のヘアピンループ中のトリプトファン残基 W232 に着目し、この残基の点変異体の作製を全てのアミノ酸 (19 種類) に関して行った。5'末端が A, C, G, T である配列への結合性は、上述のルシフェラーゼレポーターアッセイおよびゲルシフトアッセイによって評価した。

さらに、repeat-1 のヘアピンループを構成する 4 アミノ酸をランダム化したライブラリーを作製し、Bacterial 1-hybrid アッセイを用いて 5'末端が A, C から始まる配列へ結合する TALE タンパク質変異体のスクリーニングを行った。得られた大腸菌コロニーからプラスミドを抽出し、TALE 変異体のシークエンスを解析した。代表的なアミノ酸パターンを示したものに関しては、哺乳細胞での発現ベクターを構築し、ルシフェラーゼレポーターアッセイによって、5'末端が A, C, G, T それぞれから始まる配列への結合性を評価した。

また、修飾塩基を選択的に認識するユニットの構築を目指して、RVD を含む周辺領域をランダム化したライブラリーを作製した。このライブラリーから、メチル化シトシン含有レポーターベクターを用いて、Bacterial

one-hybrid screening system によるセクションを行った。

4. 研究成果

野生型 dHax3 タンパク質に関して、5'末端が A, C, G, T である配列を標的としてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った結果、dHax3 は 5'末端が T の場合のみに強い結合活性を示した。この結果は、TALE タンパク質 dHax3 の DNA への結合にとって、5'末端の T が必須であることを示唆している。

そこで、TALE のひとつである PthXo1 タンパク質の DNA との複合体の結晶構造解析から、5'-T の認識への関与が示唆されている repeat-1 のヘアピンループ中のトリプトファン残基 W232 に着目し、この残基の点変異体を作製した。5'末端塩基の選択性に変化が生じるのかどうかをルシフェラーゼレポーターアッセイで調べた結果、ほとんど全ての変異体において、5'-T からはじまる標的 DNA への結合の有意な低下がみとめられた。例外として W232Y は、ルシフェラーゼアッセイおよびゲルシフトアッセイの結果、野生型と同程度の DNA 結合活性がみられ、また W232F もその親和性の低下が少なかった。これらのことより、5'-T の認識には、repeat-1 のヘアピンループ中の W232 が関与しており、またその芳香環が結合に寄与していることが示唆された。一方で、一方、5'末端塩基が T 以外のものへ強く結合する変異体は得られなかった。このことから、W232 の点変異のみでは、5'末端が T 以外のものへ認識変換するには不十分であることが示唆された。

そこで、repeat-1 のヘアピンループを構成する 4 アミノ酸をランダム化した TALE ライブラリーを作製した。Bacterial 1-hybrid アッセイを用いて 5'末端が A, C から始まる配列へ結合する TALE タンパク質変異体のスクリーニングを行った。この方法では、発現ベクターとして、大腸菌 RNA ポリメラーゼ omega 因子と TALE タンパク質との融合体を発現するプラスミドを用いる。またレポーター遺伝子として、ヒスチジンの合成に必須とされる HIS1 遺伝子を用い、そのプロモーター中に TALE の標的 DNA 配列を挿入する。そうすることにより、大腸菌内で発現した TALE がプロモーター中の標的配列に結合し HIS1 が産生されたときにのみ、ヒスチジン欠損培地上に大腸菌コロニーが生育することができる。すなわち、生育コロニーが有するプラスミド配列を解析することによって、標的 DNA に結合することのできる repeat-1 のヘアピンループ配列が明らかになる。Bacterial 1-hybrid アッセイの結果、5'末端が A, C どちらの場合も大腸菌コロニーを得ることができた。配列を解析した結果、5'末端が A, C どちらの場合であっても、repeat-1 のヘアピンループのアミノ酸配列のパターンはほとんど同じであることが明

らかになった。特に 231 番目のグルタミン残基は、得られたコロニー全てにおいてアルギニンに変換されていた (図 1)。

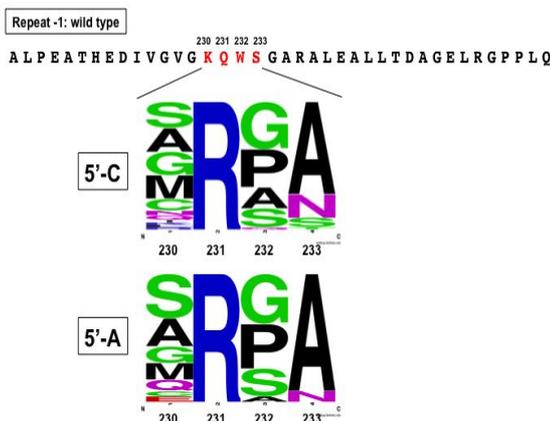


図 1. 5'-C, 5'-A を有するレポーターを用いたスクリーニングの結果

そこでまず、この保存された置換の影響を調べるために Q232R 置換体を作製してルシフェラーゼアッセイを行った。しかし、活性はほとんどなかった。続いて、得られたループ領域変異体の DNA 結合特性をルシフェラーゼレポーターアッセイにより調べた。その結果、5'-T から始まる標的配列への親和性は若干低下したものの、5'-A, C, G から始まる標的配列への結合活性が 5'-T から始まる標的配列への結合活性と同程度まで上昇することが明らかになった。すなわち、ループ全体の構造が 5'末端塩基への結合に重要であることが示唆された。また、得られたループ変異体は 5'末端塩基の種類に依存せず DNA に結合できることから、この骨格を用いることで、標的を自在に選ぶことが可能になると期待される。

また、メチル化シトシン含有レポーターベクターを用いたスクリーニングからは、比較的小さいアミノ酸を含むユニットが選択されることが明らかになった。

以上、本研究では TALE の 5'末端塩基認識に着目し、その結合様式の解析を行った。さらに、分子進化法を利用することにより、TALE の 5'末端塩基認識制限を解除することに成功した。本結果は、repeat-1 のヘアピンループ領域が標的配列の 5'末端塩基への結合に重要であること示唆すると同時に、ゲノム改変ツール、物質の効率的生産のための分子ツールとしての TALE タンパク質の汎用性の向上に大きく貢献できるものと考えられる。

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1件)

1. Tsuji, S., Futaki, S., Imanishi, M.
“Creating a TALE protein with unbiased
5' -T binding”, Biochem. Biophys. Res.
Commun., 441, 262-265 (2013)
DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.10.060

[学会発表](計10件)

1. Imanishi, M. “Design of artificial DNA
binding proteins towards manipulation of
biological rhythms”, RNA & CLOCK 2015,
(淡路市) 2015年3月26日(招待講演)

2. 辻将吾、今西未来、二木史朗「分子進化
法を用いた TALE タンパク質の機能拡張」,
「細胞を創る」研究会 7.0、(東京都) 2014年
11月14日

3. Tsuji, S., Imanishi, M., Futaki, S.
“Creating a TALE binding non-5' -T
sequence”, FASEB SRC “Genome
engineering:Cutting-edge research and
application”

4. 辻将吾、今西未来、二木史朗「分子進化
法を用いた5'末端塩基非選択性 TALE タン
パク質の創製」, 日本薬学会第134年会、(熊
本市) 2014年3月28日

5. 今西未来、辻将吾、二木史朗「分子進化
法を用いた TALE 蛋白質の標的 DNA 条件の解
除」,
「細胞を創る」研究会 6.0、(鶴岡市) 2013
年11月14日

6. 今西未来、辻将吾、二木史朗 “Molecular
evolution of a TALE protein to change DNA
binding manner”, CBI 学会 2013 年大会-生
命医薬情報学連合大会-、(東京都) 2013 年
10月29日(招待講演)

7. Tsuji, S., Imanishi, M., Futaki, S.
“Analysis of 5' -thymine recognition by
TAL effectors”, 日本ケミカルバイオロジ
ー学会 (ICBS) 第2回年会 (ICBS2013) (京
都市) 2013年10月8日

8. 辻将吾、今西未来、二木史朗「TAL Effector
による5'末端チミン認識における repeat-1
の役割」, 第7回バイオ関連化学シンポジ
ウム、(名古屋市) 2013年9月27日

9. 辻将吾、今西未来、二木史朗「TAL Effector
による5'末端チミン認識機構の解明」, 日本
薬学会第133年会、(横浜市) 2013年3月28
日

10. Tsuji, S., Imanishi, M., Futaki, S.
“5' -thymine recognition by TAL
effectors”, The 39th International
Symposium on Nucleic Acids Chemistry, (名
古屋市) 2012年11月16日

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)
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