

機関番号： 34311  
 研究種目： 基盤研究(B)  
 研究期間： 2008～2010  
 課題番号： 20390037  
 研究課題名(和文) ゲノム化学に基づくインテリジェント亜鉛フィンガーの創製と薬学的展開  
 研究課題名(英文) Creation and Pharmaceutical Development of Intelligent Zinc Fingers Based on Genomic Chemistry  
 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

研究成果の概要(和文)：天然亜鉛フィンガータンパク質をリデザインすることによって、DNA加水分解機能をもつ制限酵素様分子、長いDNA塩基配列に結合する遺伝子制御分子、あるいは細胞内亜鉛濃度に応答したスイッチ機能をもつ人工転写分子など新しい機能を有する人工タンパク質の創製に成功し、これら人工タンパク質の薬学的応用を検討した。

研究成果の概要(英文)：By re-design of native zinc finger proteins, the following artificial proteins were created: (1) restriction enzyme-like molecule possessing DNA hydrolytic ability, (2) genome-regulating molecule with long DNA base recognition, and (3) metal-responsive artificial transcriptional switcher. The pharmaceutical application of these new proteins were investigated in this work.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2009年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2010年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：生体機能化学

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：亜鉛フィンガー、転写因子、DNA結合、タンパク質デザイン、マルチフィンガー、人工転写因子、遺伝子制御、Zif268

## 1. 研究開始当初の背景

近年、ゲノムや遺伝子に関わるプロテオミクスなどバイオ全般に関して、化学を基礎にして行う研究は、遺伝子診断、バイオチップ、ゲノム創薬、バイオセンサー、バイオナノ材料など極めて広い応用分野が広がっている。将来の巨大なゲノム関連産業創出のために

は、“物をつくり出せる”ゲノム化学の研究が重要と考えられる。ヒトゲノム配列の解析がほぼ完了し、各種遺伝子・遺伝子産物の機能解析が進む中で、今後、各種遺伝子の機能や遺伝子産物の発現量を調節・制御する戦略や手法の開発が重要な課題となる。

実際、遺伝子の転写・発現を制御し、タンパ

ク質量を調節することは疾病の予防・治療に有効な手段となり得るだろう。それ故、生体内タンパク質、特に天然転写因子を基に新たに分子設計した転写制御物質の開発は、高い生物活性が期待でき有望と考えられる。そこで、ゲノム化学に基づいてコンビナトリアルバイオエンジニアリングおよび天然タンパク質のリデザインなどの手法を適用することによって、転写因子に見られる亜鉛フィンガーモチーフを基礎に人工的な転写制御を指向した新しい機能性金属フィンガーの創製をデノボ・デザインなどタンパク質工学や遺伝子工学的手法を駆使して達成することを目指した。

## 2. 研究の目的

天然亜鉛フィンガーモチーフを基礎にして、人工的な転写制御を指向した新しい機能性金属フィンガーの創製を蛋白質工学・遺伝子工学的手法を駆使して達成することを目指している。亜鉛フィンガーは、(1) 亜鉛が蛋白質の高次構造形成に関わっている、(2) 約 30 アミノ酸残基からなるコンパクトな構造は、ランダム変異によるライブラリー作製に適している、(3) 直列に複数個繋がった構造は、モジュールの連結体と見ることができる、など機能改変による新規蛋白質のデザインに極めて有効な特徴を有している。本研究では、亜鉛をはじめコバルト、ニッケル、鉄、銅などの他の金属が結合するような新規金属フィンガーを選択し、結合金属の化学的性質を生かすことによって、酸化還元型転写因子や光駆動型転写因子などの金属フィンガー型遺伝子制御分子の開発に努める。また、亜鉛フィンガー蛋白質の DNA 塩基配列認識能を改変し、種々の DNA 配列に対応した亜鉛フィンガー蛋白質のテーラーメイド作製を遂行する。他方、このような点変異に対し

て、蛋白質の 2 次元構造ユニットを交換して新しい人工亜鉛フィンガー蛋白質のデザインに適用する所謂、“ドメイン“交換の手法についても進展させる。さらに、予備的検索で見つけた“His<sub>4</sub>型亜鉛フィンガー”の DNA リン酸エステルの加水分解作用を明らかにするとともに、ヒト・テロメア配列の認識と切断など医学・薬学的応用を目指した検討を行う。

## 3. 研究の方法

先ず、モジュール型新規金属含有核酸結合モチーフの創製と機能に焦点を当てるため、天然に存在する亜鉛フィンガー蛋白質の構造を基にリデザインした蛋白質による DNA 結合性、金属結合性、及び転写活性化能などについて検討を行った。新規蛋白質はペプチド合成法および遺伝子工学的手法を用いて得た。DNA 結合活性は転写因子 Sp1 の結合配列である GC ボックス DNA および数種の変異 GC ボックス DNA への結合を電気泳動法により定量的に評価した。得られた蛋白質の構造については、円偏光二色性スペクトルや NMR スペクトルなどの各種分光学的手法により確認した。転写活性化能の実験は、HeLa 細胞中、レポーター遺伝子を用いて転写活性化量を測定した。

選択された新規モチーフを直列に連結させたマルチ亜鉛フィンガー蛋白質の調製を行い、新規モチーフのモジュール化構築の可能性について検討した。また、金属フィンガーの順序の入れ替え、認識ヘリックス中のアミノ酸への変異導入、金属配位基システインのヒスチジンへの変換などのアプローチによる DNA 認識の改変についても追究する。さらに、アルギニン型輸送ペプチドを用いてこれら蛋白質を細胞内に導入し、転写機能・細胞機能の制御についての可能性を検討し

た。

他方、異なる DNA 塩基配列を認識する二つの亜鉛フィンガードメインを DNA 切断能を有するセリウム結合ペプチドや His<sub>4</sub> 型亜鉛フィンガーペプチドによって連結したキメラ亜鉛フィンガー蛋白質を作製し、エンドヌクレアーゼ型の人工ヌクレアーゼの構築を達成した。このような機能性リンカーの導入は、新しい機能を有する人工亜鉛フィンガー蛋白質の創生に対する有効な一つの方法と考えられる。

#### 4. 研究成果

先ず、選択された亜鉛フィンガーモチーフを直列に 3 個、6 個及び 9 個を連結させた蛋白質を創製し、そのマルチ亜鉛フィンガー蛋白質の転写活性化能をヒラー細胞を用いて、ルシフェラーゼ遺伝子を組み込むことによって測定したところ、3-、6-、9-マルチ亜鉛フィンガー蛋白質の順に転写活性化能は増加した。特に、9-亜鉛フィンガー蛋白質の活性は高く、亜鉛フィンガーのマルチ化の意義を機能面から明らかにした点は価値がある。また、ゲルシフト法による DNA 結合能は、9-、6-、3-マルチ亜鉛フィンガー蛋白質の順に減少した。一般に、亜鉛フィンガーの個数が増すほど、DNA への結合親和性が増加すると考えられる。ゲノム中単一塩基配列の標的には亜鉛フィンガーのマルチ化が有効であり、27 塩基対の DNA 配列を標的とする 9-亜鉛フィンガー型転写因子が標的配列存在下でのみレポーター遺伝子を活性化することを明らかにした。しかし、セミスペシフィック標的配列との強い相互作用を生じることもあり、結果として細胞内での機能発現の遅延などの影響を及ぼす可能性が推定された。これらの知見は、人工マルチ亜鉛フィンガー蛋白質の機能を最適化

する上で極めて重要である。

His<sub>4</sub> 型亜鉛フィンガードメインがアミノ酸エステルやリン酸エステルの加水分解能を有し、このドメインが触媒部位として活用できることを見出したので、His<sub>4</sub> 型亜鉛フィンガードメインを Sp1 のような DNA 塩基配列特異的結合能をもつ 3 つの亜鉛フィンガーが連結したドメインに結合させた新しい亜鉛フィンガー蛋白質を設計・作製した。この混合型亜鉛フィンガー蛋白質は、DNA 切断部位と DNA 結合部位とを併せ持った制限酵素類似の触媒作用を示した。

異なる DNA 塩基配列を認識する二つの亜鉛フィンガードメインを機能性リンカーである 12 アミノ酸残基から成るセリウム結合ペプチド配列によって連結した新しいキメラ亜鉛フィンガー蛋白質を設計し、エンドヌクレアーゼ型の人工ヌクレアーゼを構築した。本研究では、ゲノム化学を基礎にして種々の機能を有する亜鉛フィンガー蛋白質のデザインを行い、標的 DNA に対する認識・結合・切断などを検討し、転写制御機能や遺伝子発現制御機構などの展開を行い、いくつかの価値ある成果を得た。

#### 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 7 件)

- ① M.Imanishi, C.Imamura, C.Higashi, W.Yan, S.Negi, S.Futaki, Y.Sugiura, Zinc finger-zinc finger interaction between the transcription factors, GATA-1 and Spl, Biochem.Biophys. Res.Comm., 査読有、400(4), 625-630(2010).
- ② M.Imanishi, T.Nakaya, T.Morisaki, D.Noshiro, S.Futaki, Y.Sugiura,

Metal-stimulated transcriptional regulation by an artificial zinc finger protein, *ChemBioChem*, 査読有、11(12), 1653-1655(2010).

- ③ 森崎達也、今西未来、二木史朗、杉浦幸雄、マルチ亜鉛フィンガー型人工転写因子の創製と機能、*薬学雑誌*, 査読有、130(1), 45-48(2010).
- ④ S.Negi, Y.Umeda, S.Masuyama, Y.Sugiura, Novel zinc finger nuclease created by combining the Cys<sub>2</sub>His<sub>2</sub> and His<sub>4</sub> type zinc finger domain, *Bioorg.Med.Chem.Lett.*, 査読有、19(10), 2789-2791(2009).
- ⑤ M.Dhanasekaran, S.Negi, M.Imanishi, M.Suzuki, Y.Sugiura, Effects of bulkiness and hydrophobicity of aliphatic amino acid at recognition helix of GAGA zinc finger on the stability of hydrophobic core and DNA-binding affinity, *Biochemistry*, 査読有, 47(45), 11717-11724(2008).
- ⑥ T.Morisaki, M.Imanishi, S.Futaki, Y.Sugiura, Rapid transcriptional activity in vivo and slow DNA binding in vitro by artificial multi-zinc finger protein, *Biochemistry*, 査読有、47(38), 10171-10177(2008).
- ⑦ S.Negi, M.Imanishi, M.Matsumoto, Y.Sugiura, Novel redesigned zinc finger proteins: Design strategy and its application, *Chem.Eur.J.* 査読有、14(11), 3236-3249(2008).

[学会発表] (計 7 件)

- ① 杉浦幸雄、インテリジェント人工亜鉛フィンガー蛋白質の創製と医学・薬学領域

への展開、日本薬学会東海支部特別講演会、2010年11月4日、名古屋市

- ② 中屋智博、今西未来、森崎達也、能代大輔、二木史朗、杉浦幸雄、亜鉛濃度に応答した亜鉛フィンガー転写因子の創製、第20回金属が関与する生体関連反応シンポジウム、2010年6月25日、徳島市
- ③ 根木滋、三間紘子、杉浦幸雄、リデザインによる野生型亜鉛フィンガータンパク質の機能改変：人工亜鉛フィンガー型ヌクレアーゼの創生、第10回日本蛋白質科学会年会、2010年6月18日、札幌市
- ④ 杉浦幸雄、生体と金属：生体に不可欠な元素、第14回国際生物無機化学会議(公開市民講座)、2009年7月25日、名古屋市
- ⑤ 森崎達也、今西未来、二木史朗、杉浦幸雄、マルチ亜鉛フィンガー型人工転写因子の創製と機能、第129回日本薬学会、2009年3月10日、京都市
- ⑥ 森崎達也、今西未来、二木史朗、杉浦幸雄、マルチ亜鉛フィンガーの in vitro 及び in cellulo での挙動相関、第31回日本分子生物学会年会、2008年12月9日、神戸市
- ⑦ 杉浦幸雄、新機能性人工亜鉛フィンガータンパク質の設計、第8回日本蛋白質科学会、2008年6月18日、東京都。

[図書] (計 1 件)

- ① M.Imanishi, S.Negi, Y.Sugiura, “Non-FoldI-based zinc finger nucleases” in “Engineered Zinc Finger Proteins”(Eds. by J.P.Mackey, D.J.Segal), Springer, pp.337-349(2010)

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・助教

研究者番号：50378866