

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月15日現在

機関番号： 34311
 研究種目： 挑戦的萌芽研究
 研究期間： 2010～2012
 課題番号： 22651085
 研究課題名（和文） 世界最初の触媒機能を有する酵素型亜鉛フィンガー蛋白質の創出
 研究課題名（英文） Creation of First Enzyme-Type Zinc Finger Protein Possessing Catalytic Function
 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

研究成果の概要（和文）：天然亜鉛フィンガー蛋白質を鋳型にして、触媒機能を示す酵素型亜鉛フィンガー蛋白質の設計を行った。人工設計した His4 型亜鉛フィンガー蛋白質を遺伝子工学的手法で創製した結果、本蛋白質は DNA を加水分解する能力を持ち、世界で初めて触媒機能を持つ酵素型亜鉛フィンガー蛋白質の創出に成功した。

研究成果の概要（英文）：On the basis of native zinc finger protein, design and creation of new zinc finger protein possessing catalytic function were performed. Artificial His4-type zinc finger protein was demonstrated to have DNA hydrolytic function. We firstly succeeded in creation of new enzyme-type zinc finger protein.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	0	1,300,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	540,000	3,640,000

研究分野：ケミカルバイオロジー

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、DNA 認識、DNA 切断、触媒機能、酵素類似、分子設計、加水分解、機能変換、人工設計

1. 研究開始当初の背景

生物のゲノム解析の結果、亜鉛フィンガーモチーフは極めて普遍的なモチーフであることが明らかになり、全蛋白質の約 3% が亜鉛フィンガーモチーフを持つことが示された。亜鉛フィンガー蛋白質の重要な機能としては、DNA や RNA の塩基認識と結合、そし

て蛋白質-蛋白質相互作用認識などである。亜鉛フィンガーモチーフの役割は蛋白質の構造維持と特異的結合であり、触媒機能を示す亜鉛フィンガー蛋白質は見出されていない。それ故、触媒機能を有する酵素型亜鉛フィンガー蛋白質の創出は、世界的に極めて挑戦的な課題であると考えられた。このような

背景から、世界最初の触媒機能を持つ亜鉛フィンガー蛋白質の創出に挑戦することにした。

2. 研究の目的

本来、構造的な因子である亜鉛フィンガーモチーフから亜鉛フィンガー触媒酵素へ独創的の化学変換は、国際的にも大きな注目を浴び、かつ激しい研究競争となっているが、現在のところ誰も成功していない。そこで本研究では、ヌクレアーゼやプロテアーゼ活性を持つ世界最初の酵素型亜鉛フィンガー蛋白質を設計・創製し、その生物・医学的応用を目指した。また、本研究での“蛋白質をデザインする”という化学を基本とした方法論は、医学・薬学や生物学・農学領域に有用な人工機能性蛋白質の設計に貴重な知見を提供することが期待される。

3. 研究の方法

本研究のキーポイントは、触媒機能を有する酵素型亜鉛フィンガー蛋白質を如何に設計・創出するかにある。これまでの実験結果を基礎に、触媒機能が期待される His4 型亜鉛フィンガードメインを中心に設計し、天然型の Cys2His2 型亜鉛フィンガードメインに結合させることで選択的塩基配列認識に加えて、DNA 鎖を加水分解する機能を持ち合わせた新しい亜鉛フィンガー蛋白質が創出できると考えた。そこで、本蛋白質を遺伝子工学的手法を駆使して創製し、その期待されるヌクレアーゼおよびプロテアーゼ機能をゲノム化学・蛋白質化学的手法により評価を行い、世界最初の酵素型亜鉛フィンガー蛋白質の創出を明らかにすることを目指した。

4. 研究成果

まず、新規 His4 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を効果的に加水分解できることを見出したので、このドメインを触媒作用部位として活用することを計画した。DNA 塩基配列特異的結合能を持つ天然 Cys2His2 型亜鉛フィンガー蛋白質に His4 型亜鉛フィンガードメインを連結させた新しい混合亜鉛フィンガー蛋白質を遺伝子工学法により作製した。この新規亜鉛フィンガー蛋白質は、DNA 結合部位と DNA 切断部位を併せ持ち、期待通り制限酵素類似の触媒作用を示した。亜鉛フィンガーは、モジュール構造と非対称な DNA 認識コードという特徴を持っており、任意の長さで任意の塩基配列を認識できる人工制限酵素分子の設計には最適のターゲット蛋白質と考えられる。20 塩基対を特異的に認識し、かつ配列選択的に DNA を切断する 7 亜鉛フィンガー蛋白質の創製にも成功した。また、2 つの天然 3 フィンガードメイン間に His4 型亜鉛フィンガードメインを挿入した 7 亜鉛フィンガー蛋白質を遺伝子工学的に作製した。この新規亜鉛フィンガー蛋白質は、GC ボックス DNA とランダム配列 DNA に対する切断反応を追求したところ、顕著に GC ボックス DNA に対する切断が促進され、配列選択的な DNA 切断が認められた。さらに、3 亜鉛フィンガードメイン間にセリウム結合ペプチドを導入した新規亜鉛フィンガー蛋白質も創製し、セリウム結合部位での DNA 加水分解反応が観察された。このように、触媒機能を持つ人工亜鉛フィンガー His4 型ドメインの開発により、世界で最初の触媒機能を有する酵素型亜鉛フィンガー蛋白質が達成され、生物学や医学領域に有用なツールを提供できたことは価値がある。

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 8 件)

- ① H.Kono, M.Imanishi, S.Negi, K.Tatsutani, T.Sakaeda, A.Hashimoto, C.Nakayama, S.Futaki, Y.Sugiura, Rational design of DNA sequence specific zinc fingers, FEBS Lett., 査読有, 586(6), 918-923(2012).
- ② M.Imanishi, Y.Sugiura, New functions of zinc fingers revealed by substitution of conserved residues, Zinc Fingers:Structure, Properties and Functions, Ed. By S.Gonzalez, Nova Science Publishers, 査読有、141-154(2012).
- ③ M.Imanishi, K.Matsumura, S.Tsuji, T.Nakaya, S.Negi, S.Futaki, Y.Sugiura, Zn(II) binding and DNA binding properties of ligand-substituted XXHH-type zinc finger proteins, Biochemistry, 査読有、51(16), 3342-3348(2012).
- ④ S.Negi, M.Imanishi, M.Sasaki, K.Tatsutani, S.Futaki, Y.Sugiura, An arginine residue instead of a conserved leucine residue in the recognition helix of the finger 3 of Zif268 stabilizes the domain structure and mediates DNA binding, 査読有、Biochemistry, 50(28), 6366-6372(2011).
- ⑤ M.Imanishi, C.Imamura, C.Hogashi, W.Yan, S.Negi, S.Futaki, Y.Sugiura, Zinc finger-zinc finger interaction between the transcription factors, GATA-1 and Sp1, Biochem.Biophys. Res.Commun., 査読有、400(4), 625-630(2010).
- ⑥ 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).
- ⑦ 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.Commun., 査読有、400(4), 625-630(2010).
- ⑧ M.Imanishi, S.Negi, Y.Sugiura, Non-ForkI-based zinc finger nucleases, Engineered Zinc Finger Proteins, Ed. by J.Markay & D.Segal, Methods in Molecular Biology, 査読有、649, 337-349(2010).

[学会発表] (計 6 件)

- ① 根木滋、山岡槿子、福田あずさ、杉浦幸雄、亜鉛フィンガータンパク質のレドックス挙動、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 25 日、横浜市
- ② 根木滋、増山紗永子、山岡槿子、杉浦幸雄、GAGA 亜鉛フィンガータンパク質の酸化に伴う構造および機能変化、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 26 日、横浜市
- ③ 根木滋、谷口仁哉、杉浦幸雄、人工亜鉛フィンガータンパク質のデザインおよびその機能、第 36 回生体分子科学討論会、2011 年 6 月 19 日、札幌市
- ④ 今西未来、中尾智博、松林一央、二木史朗、杉浦幸雄、配位子置換亜鉛フィンガータンパク質の DNA 結合特性、第 24 回金属の関与する生体関連反応シンポジウ

ム、2011年5月31日、千葉市

- ⑤ 増山紗永子、根木滋、野口範子、杉浦幸雄、新規 GAGA 金属置換型フィンガーの創製およびその機能評価、日本化学会第 91 春季年会、2011 年 3 月 26 日、横浜市
- ⑥ 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蛋白質の機能変換、第 10 回日本蛋白質科学会年会、2010 年 6 月 18 日、札幌市

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・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