

研究課題別評価書

1. 研究課題名

新規時計関連タンパク質の探索法の開発

2. 氏名

今西 未来

3. 研究のねらい

生物における一日約 24 時間というリズムの発振を司るタンパク質は時計タンパク質とよばれ、それらの遺伝子発現自体がフィードバック制御によって約 24 時間周期のリズムを形成していることが知られている。これまでに、遺伝学的な手法によって、種々の時計タンパク質が発見されてきたものの、リズム形成のメカニズムは不明な点が多く、関与するタンパク質やプロモーター上のエレメントに関する知見を得ることが重要な鍵をにぎる。私は、リズム形成に関わる要因を探索するために、ゲノム DNA に作用し、時計遺伝子の発現リズムに摂動を与えることのできる人工 DNA 結合タンパク質を、新しい分子ツールとして利用できないかと考えた。そこで、代表的な転写因子の DNA 結合モチーフとして知られる Cys2-His2 型ジンクフィンガーモチーフをもとに、様々な遺伝子配列に結合しうる人工 DNA 結合タンパク質および転写因子のライブラリーを作製し、人工ジンクフィンガータンパク質(転写因子)を用いた時計遺伝子発現リズムの調節、および内在性の調節因子の探索を目指した。

4. 研究成果

マルチジンクフィンガータンパク質のDNA結合性および転写因子としての性質

【フィンガー連結体の作製と DNA 結合性の解析】

代表的な DNA 結合モチーフの1つである Cys2-His2 型ジンクフィンガードメインは、フィンガーあたり3塩基を認識し、フィンガーが複数個連結した構造をとって単量体で連続した DNA 配列に結合するという特徴がある。従って、様々なトリプレットに対応するジンクフィンガーモチーフを連結することによって、長い任意の DNA 配列への結合能を付与することが期待される。そこで、まず、ジンクフィンガー連結体(マルチジンクフィンガー)を作製し、それらの DNA 結合能を検討した。標的 DNA 配列として、時計遺伝子プロモーターに存在するシスエレメントを選択した。マウス時計遺伝子 *Period1*

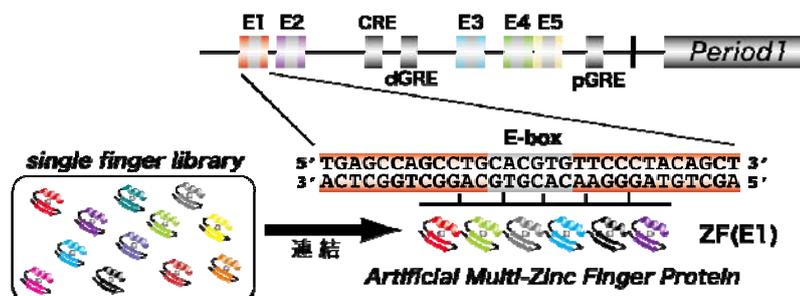


Figure 1. 時計遺伝子 *mPeriod1* プロモーター転写調節エレメントを標的とする人工マルチジンクフィンガータンパク質の作製

のプロモーター上には、リズム的な発現に関わるとされる、E-box 配列が5個(E1~E5とする)、また核内受容体結合配列、cAMP 応答配列など、様々な転写因子結合エレメントが存在する。しかしながら、時計遺伝子発現のリズム形成における、これらのエレメント各々の寄与はほとんど明らかにされておらず、またゲノム上の特定部位に変異を導入することは簡単ではない。したがって、標的配列選択性の高いジンクフィンガーを得ることができるかどうかは、エレメントの機能評価に向けて重要な意味を持つと考えられる。選択性を発揮するためには、ゲノムサイズを考慮すると16塩基対以上のDNA配列に結合できることが望まれる。そこで、各エレメントを含む周辺18塩基対を標的とするジンクフィンガー6連結体を作製した(Figure 1)。DNA結合実験の結果、例えばE2を標的として作製した6-ジンクフィンガータンパク質は、同じE-boxと呼ばれるシスエレメントであるにもかかわらず、Figure 2に示すように、E2を含む標的配列にのみ結合し、高いDNA配列結合選択性を示した。他のエレメントを標的とした場合も、極めて高い選択性で目的配列に結合することが明らかとなった。一方、作製した6-ジンクフィンガータンパク質の中には、DNA結合能を持たないものも多いことが明らかとなった。そこで、フィンガー欠失体を用いてDNA結合能を検討した結果、各ジンクフィンガーモチーフとDNAトリプレットは完全に独立した対応関係にあるわけではなく、連結体のDNA結合能は、フィンガーの組み合わせによって影響を受けることが示唆された。

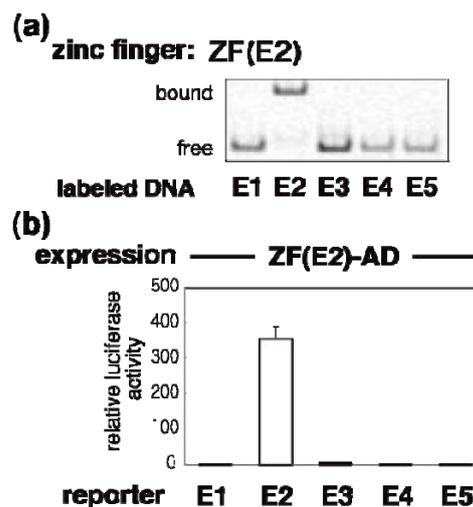


Figure 2. E2-box を標的として作製した6-ジンクフィンガータンパク質のDNA結合配列選択性 (a) 精製タンパク質を用いたゲルシフトアッセイ (b) 細胞内でのレポーターアッセイ

【ヘリックスリンカーの導入による不連続配列への選択的結合】

現在までに、全てのトリプレットに対応するジンクフィンガーモチーフは得られていない。したがって、認識できないDNA配列をスキップする、すなわち、不連続な配列に結合できる人工DNA結合タンパク質は有用であり、人工ジンクフィンガータンパク質のライブラリーの多様化を生み出すことが期待される。そこで、効率的に不連続配列に結合できるフィンガーの連結方法を検討した。具体的には、ヘリックス構造を形成しやすいペプチド配列(EAAAR)₄を用い、GC-box配列に結合する、転写因子Sp1のジンクフィンガードメイン(Sp1ZF3)同士を連結し、6つのフィンガーを有するSp1ZF6(EAAAR)₄を作製した(Yan, et al. 2007)。ヘリックスを形成した際のリンカーの長さはDNA1ヘリカルターン分(約10bp)に相当すると予測される。2

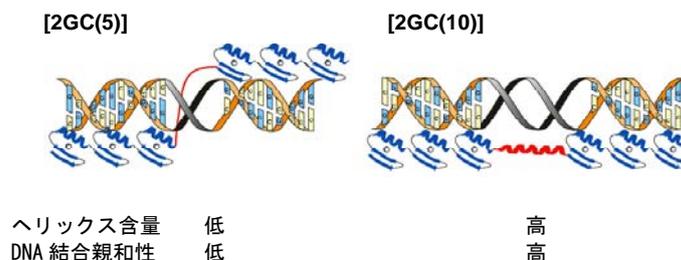


Figure 3. ヘリックスリンカーを導入したマルチジンクフィンガータンパク質

つの認識配列が1ヘリカルターン離れ、同位相にある 2GC(10)と、逆位相にある 2GC(5)に対する結合性を、フレキシブルなリンカーで連結したものと比較した。その結果、Sp1ZF6(EAAAR)₄ は、2GC(10)への選択性が高く、またこの時、リンカーのヘリックス傾向性も高いことが明らかとなった (Figure 3)。DNA 認識には直接関与しないリンカー領域が、不連続配列の位置選択性には極めて重要な役割を果たすことを示す結果であり、ジンクフィンガータンパク質のデザインにとって有用な知見を提供するものと考えられる。

【マルチジンクフィンガー型人工転写因子の創製】

様々な DNA 配列に結合するジンクフィンガーと転写調節ドメインとの融合タンパク質は、標的配列下流の遺伝子発現を制御する人工転写因子として働くことが期待される。また、膨大なゲノム

サイズを考慮すると、長い DNA 配列に対して高い選択性で結合することができるマルチジンクフィンガードメインが求められる。一方、in vitro での DNA 結合実験の結果から、フィンガーの連結数が3、6、9と増加するにつれ、DNA 結合平衡に到達する時間が顕著に増加する (<2時間~72 時間程度)ということが明らかとなった (Figure 4a)。そこで、フィンガーを9個有するマルチジンクフィンガー型転写因子を作製し、細胞内での経時的な転写調節能を、3フィンガー型のものと比較した (Morisaki, et al. 2008)。具体的には、天然に存在する転写因子 Zif268 の DNA 結合ドメイン ZifZF3 をもとに、リガンドの添加に

よって機能発現をスイッチできるよう、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人工転写因子、ZifZF3ERAD および ZifZF9ERAD を作製した。リガンド添加 1.5 時間後の9フィンガー型 ZifZF9ERAD の転写活性化量は、3フィンガー型と比べほぼ等しく、速やかに転写を活性化することが示唆された (Figure 4b)。また、不十分な標的配列に対しては顕著な転写活性化は認められなかったことから、ZifZF9ERAD の細胞内における配列選択性は高く、また、見られた速やかな転写活性化は、一部のフィンガーによる部分的結合ではなく、9フィンガーの結合によって引き起こされていることが示唆された。マルチジンクフィンガー型転写因子の高い DNA 結合選択性に関しては、*mPeriod1* プロモーター中のエレメントを標的としたジンクフィンガー由来の人工転写因子を用いた実験からも示された (Figure 2b)。これらの結果から、作製したマルチジンクフィンガー型転写因子の細胞内での有用性が期待される。

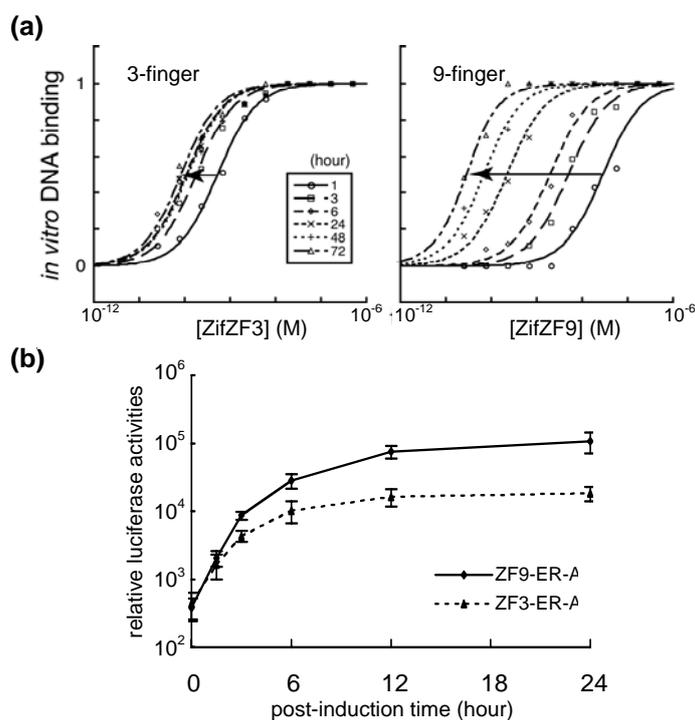


Figure 4. 3フィンガータンパク質と9フィンガータンパク質の (a) in vitro DNA 結合 (b)細胞内転写活性化の時間変化

ジンクフィンガー型人工転写因子の時計遺伝子発現への作用

人工ジンクフィンガータンパク質が時計遺伝子の発現リズムに与える作用を検討するために、*mPeriod1* プロモーターを標的として作製した各ジンクフィンガータンパク質に核移行シグナル (NLS) を融合した ZF-NLS、さらに転写活性化ドメインを融合した ZF-AD を NIH3T3 細胞内で発現させ、時計遺伝子の発現パターンのモニタリングを行った。発現パターンの検出は、時計遺伝子プロモーター下流にルシフェラーゼ遺伝子を挿入したレポーターベクターを、ジンクフィンガータンパク質発現ベクターとコトランスフェクション後、ルシフェリン含有メディウムを使用し、細胞内発光を光電子増倍管を用いてリアルタイムで検出した。その結果、ZF-NLS の発現によっては、時計遺伝子発現パターンに変化は認められなかった。一方、転写活性化ドメインを有する ZF-AD を発現させた場合、レポーター遺伝子の発現量の変動(リズム)が増強され、より持続性の高い周期的発現が見られた。このジンクフィンガー型転写因子は、*mPeriod1* プロモーターを標的としているにもかかわらず、他の時計遺伝子プロモーター制御下のレポーター遺伝子のリズム的な発現も誘起したことから、ジンクフィンガー型人工転写因子の内在的な時計制御システムへの作用が示唆される。ゲノム中の特定領域に選択的に作用できる人工ジンクフィンガータンパク質は、時計遺伝子のリズム的な発現メカニズムの解明のみならず、人為的に時計遺伝子発現リズムを増強するための、これまでにない分子ツールとしての応用が期待される。

5. 自己評価

人工ジンクフィンガーライブラリーの作製に関しては、DNA 結合親和性の獲得が簡単ではなく、当初想定していたサイズには及ばなかった。しかしながら、DNA 配列選択性が高いジンクフィンガーを作製することができ、さらに、結合性に関する詳細な検討および、リンカー改変体の作製を通じ、任意の配列に結合できる DNA 結合タンパク質のデザインにとって重要な情報が得られた。また、マルチジンクフィンガー型転写因子の高い塩基配列選択性と速やかな転写活性化を細胞内でも示し、その有用性を支持する結果を得た。時計遺伝子への作用に関しては、作製した人工マルチジンクフィンガー型転写因子を用いることによって、時計遺伝子の発現リズムに摂動を与えることができた。研究期間内では、リズム形成を担う因子を特定するには至らなかったが、様々な遺伝子に変動を及ぼす薬剤刺激とは異なり、ゲノムの特定部位を直接標的とする分子ツールが得られたことによって、これまでにない方法で、生物リズム形成のメカニズムに迫ることが可能になると考えている。

6. 研究総括の見解

ジンクフィンガーの配列特異性と柔軟なモジュール構造を利用した、時計タンパク質の新たな探索法という独創性の高い研究である。時計遺伝子の特定の塩基配列領域に結合するジンクフィンガー連結体の作成を狙うとともに、これを用いて時計遺伝子発現リズム因子の探索に挑戦した。主たる成果は次の2点である。

①DNA結合で飛躍的に配列選択性を高めた 6-ジンクフィンガータンパク質の作成に成功した。また、そのジンクフィンガーモチーフ間にフレキシブルなリンカーを介在させることによりDNA中の不

連続な塩基配列の検出に成功した。

②ジンクフィンガー連結体と転写活性化ドメインの融合タンパク質を細胞内で発現させ、時計遺伝子の発現リズムが増強される現象の確認に成功した。

また、9-ジンクフィンガー連結体を用いて長大なDNA配列に対しても適応可能であることを確認し、この方法の有用性を更に確かなものとした。

これらの研究成果は 2 篇の原著論文、3 件の学会招待講演にまとめられている。また平成 20 年 9 月に Chemistry in the New World of Bioengineering and Synthetic Biology にて The Best Poster Prize を受賞している。

DNA結合選択性を高めるための一連の実験から、時計遺伝子がジンクフィンガーによって制御できることを証明し、生物の概日リズムの解明につながる時計タンパク質探索法の実現性を提示したことは高く評価できる。現段階ではジンクフィンガーと DNA との結合性や発現リズム増強のメカニズムなど未解明の部分も多く、かつ時計遺伝子の分子論的解明もまだ十分されていない。時計タンパクの探索だけでなく、一般性の高い分析手法を開発する、という姿勢を意識しながら研究を進めていくことを期待する。

7. 今後の展開

引き続き、フィンガー個々の特性が連結体の DNA 結合性にどのように反映されるかに関する解析、および連結方法の更なる改良をすすめ、マルチジンクフィンガーによる高い DNA 結合親和性と選択性の獲得法を確立したい。それによって、時計遺伝子に限らず、様々な遺伝子をゲノムの特定領域から制御できる人工転写因子として、また、プロモーター解析のツールとして、生命科学研究に活かすことができると考えている。時計遺伝子の発現リズムが人工転写因子によって増強されたのは、大変興味深い現象であるが、そのメカニズムに関しては未解明である。遺伝子発現の時間変化や一細胞ごとのリズムを解析し、人工ジンクフィンガー型転写因子の作用機序を明らかにすることによって、時計遺伝子の周期的な発現リズムの形成を担う要因を解明していく予定である。

8. 主な論文等

(A)さきがけの個人研究者が主導で得られた成果

(1)論文(原著論文)発表

論文(国際)

- ・ Wei Yan, Miki Imanishi, Shiroh Futaki, Yukio Sugiura, "Alpha-Helical Linker of an Artificial 6-Zinc Finger Peptide Contributes to Selective DNA Binding to a Discontinuous Recognition Sequence" *Biochemistry*, 46, 8517-8524 (2007)
- ・ Tatsuya Morisaki, Miki Imanishi, Shiroh Futaki, Yukio Sugiura, "Rapid Transcriptional Activity in Vivo and Slow DNA Binding in Vitro by an Artificial Multi-Zinc Finger Protein" *Biochemistry*, 47, 10171-10177 (2008)

(2)特許出願 なし

(3)受賞

- ・平成 20 年 9 月 Chemistry in the New World of Bioengineering and Synthetic Biology (Royal Society of Chemistry), The Best Poster Prize 受賞

(4)学会発表

口頭発表(国内)

- ・今西未来、“亜鉛フィンガー型人工転写因子の創製:遺伝子制御と情報解析に向けて”、日本薬学会第 127 年会、2007
- ・今西未来、“遺伝子制御に向けたマルチ亜鉛フィンガータンパク質の創製”、バイオメディカル分析科学シンポジウム、2007

ポスター発表(国際)

- ・ M. Imanishi, A. Nakamura, and S. Futaki, “Artificial Zinc Finger-Type Transcription Factors Targeting Circadian Clock Genes” Chemistry in the New World of Bioengineering and Synthetic Biology, 2008

ポスター発表(国内)

- ・今西未来、中村篤史、二木史朗、“時計遺伝子プロモーターに作用するジンクフィンガー型人工転写因子の創製”、第 3 回バイオ関連化学合同シンポジウム 2008
- ・中村篤史、今西未来、二木史朗、土居雅夫、岡村均、“ジンクフィンガー型人工転写因子を用いた時計遺伝子プロモーター制御”、第 15 回日本時間生物学会学術大会、2008

(5)招待講演

招待講演(国内)

- ・今西未来、“亜鉛フィンガーを用いた人工 DNA 結合タンパク質の創製とその応用”、日本分析化学会第 55 年会、2006

(B) その他の主な成果

なし