

新規時計関連タンパク質探索法の開発

今西 未来
京都大学化学研究所

1. 研究のねらい

一日約 24 時間という概日リズム (生物時計) 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、および調節因子探索技術の確立を目指した。

2. 研究成果

(a) マルチジンクフィンガータンパク質の DNA 結合親和性および選択性の検討

代表的な DNA 結合モチーフの一つである Cys2-His2 型ジンクフィンガーは 1 つのフィンガーが約 30 アミノ酸からなり、亜鉛イオンの配位によってコンパクトな $\beta\beta\alpha$ 構造を形成する。Cys2-His2 型ジンクフィンガードメインの DNA 結合様式には、(1) フィンガーあたり 3 (~4) 塩基を認識する (2) ヘリックス上の特定の位置の 3 (~4) アミノ酸の側鎖が塩基認識に関わる (3) フィンガーが複数個連結した構造をとって連続した DNA 配列に結合する (4) 単量体で DNA 結合するため、非回文配列を標的とできる、という特徴がある (Figure 1)。これらの特徴を利用して、これまでに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がセレクションされてきたが、それらを連結することによって、期待する DNA 結合能が得られるかどうかは、明らかではない。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。マルチジンクフィンガータンパク質の標的 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* 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、転写因子 Bmal1/Clock の結合サイト「E-box」(5' - CACGTG -3') 配列が 5 個 (E1~E5 とする)、また、核内受容体結合配列 (5' - RGAACANNNTGTTCY -3') も複数個、cAMP 応答配列 (CRE) など、様々なエレメントが存在することが知られている。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



Figure 1. Sp1 zinc finger domain (Sp1ZF3) - GC box DNA 複合体: 3 塩基対を認識するフィンガーが 3 つ連なったモジュール構造をとり、GC box 配列 (9 塩基対) に結合する

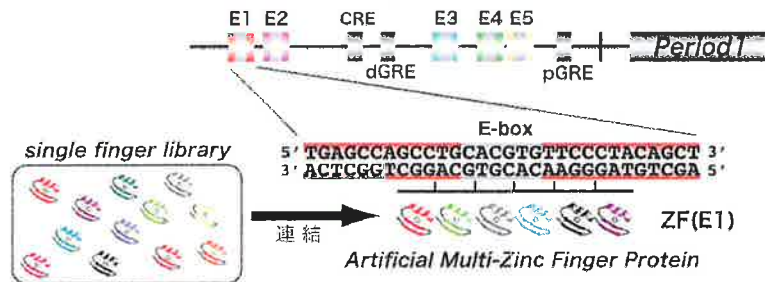


Figure 2. *mPeriod1* プロモーター転写調節エレメントを標的とする人工マルチジンクフィンガータンパク質の作製

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 2)。DNA 結合実験の結果、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、E2、E4 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、それぞれ E2、E4 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。また、*Period1* プロモーター上のグルココルチコイド応答配列のうち上流側に存在するもの (dGRE) を標的とした 6-ジンクフィンガータンパク質 ZF (dGRE) は、グルココルチコイドの刺激によって活性化することが知られているゲノム中の様々な遺伝子プロモーターの GRE 配列にはほとんど結合せず、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 (Figure 3)。これらの結果から、フィンガーの連結によって、DNA 配列選択的な分子ツールとしての活用を期待できるマルチジンクフィンガーが得られることが示唆される。一方、E1、E3、E5 を含む DNA 配列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 DNA 結合能を有していな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。

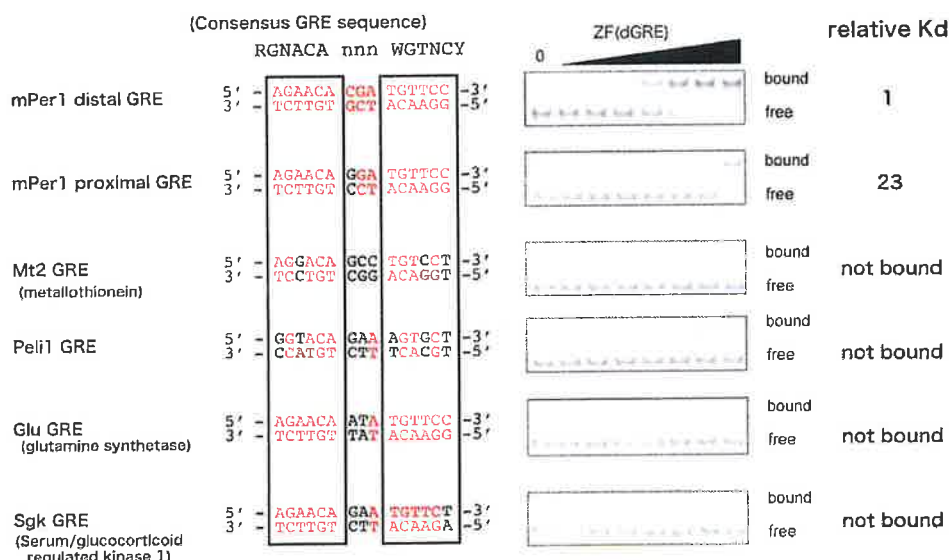


Figure 3. *mPeriod1* dGRE を標的として作製したマルチジンクフィンガータンパク質の、様々な GRE 配列に対する DNA 結合性の比較 (赤字は標的 dGRE 配列と同一の塩基を示す)

また、マルチジンクフィンガーの作製において、フィンガー間を連結するリンカー領域に着目した。天然で保存されたリンカー (TGEKP) 配列を用いる場合、連続した DNA 配列に結合しやすく、不連続配列には結合できない。しかし現在までに、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ため、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ると考えられる。これまでに、より長いフレキシブルなリンカーを用いて連結したマルチジンクフィンガータンパク質は、不連続な配列に結合できることを明らかにしてきた。しかしながら、その場合、連続配列にも同様に結合し、選択性が低いという問題があった。そこで、より効率的に不連続配列に結合できる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 (EAAAAR) 4 を使い、GC-box と呼ばれる配列に結合する、転写因子 Sp1 のジンクフィンガードメイン (Sp1ZF3) 同士を連結

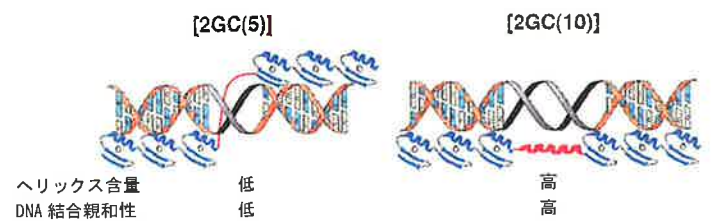


Figure 4. ヘリックスリンカーを導入したマルチジンクフィンガータンパク質

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 DNA 1ヘリカルターン分 (約 10 bp) に相当すると予測され、2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、0.5ヘリカルターン離れ、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 (GGGGS)4 で連結した Sp1ZF6(GGGGS)4 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、ヘリックス傾向性も高いことが明らかとなった (Figure 4)。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。

(b) マルチジンクフィンガー型人工転写因子

様々な DNA 配列に結合するジンクフィンガーと転写活性化あるいは抑制ドメインとの融合タンパク質は、標的配列下流の遺伝子を調節する人工転写因子として働くことが期待される。また、細胞内での遺伝子発現調節において、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 DNA 結合ドメイン (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時間未満~72 時間程度) ということが明らかとなった (Figure 5a)。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 と、これを 3 ユニット連結した 9-フィンガータンパク質 ZifZF9 に転写活性化ドメイン (Activation Domain; p65) を融合した、ZifZF3AD および、ZifZF9AD を作製した。ZifZF3 の標的 DNA 配列 ZBSI と、これを 3 つ連結した ZBSIII とをルシフェラーゼ遺伝子上流に挿入したレポーターベクターを用い、ZifZF3AD および、ZifZF9AD の転写活性化能を測定した。その結果、in vitro での結果とは異なり、トランスフェクション後 6 時間という短時間においても、ZifZF9AD は ZifZF3AD と同程度の転写活性化能を示した。さらに、リガンドの添加によってジンクフィンガードメインの機能発現をスイッチできるように、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。リガンドを添加してから 1.5 時間後の、ZifZF9ERAD の転写活性化量は、ZifZF3ERAD 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 5b)。また、ZifZF9ERAD は、ZBSI を有するレポーター遺伝子の転写をほとんど活性化しなかったことから、細胞内において、ZifZF9 の ZBSIII への配列選択性は高く、また、見られた速やかな転写活性化は、ZBS 配列への不完全な結合によってではなく、ZBSIII へ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に転写活性化ドメイン、もしくは抑制ドメインを融合した人工転写因子を用いた実験からも示された。これらの結果から、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。

(c) 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* プロモーター中のシスエレメント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 SV40 由来核移行シグナル (NLS) を融合した ZF-NLS、さらに転写活性化ドメイン (Activation Domain; VP16 x 4) 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 (Figure 6)。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が挿入され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

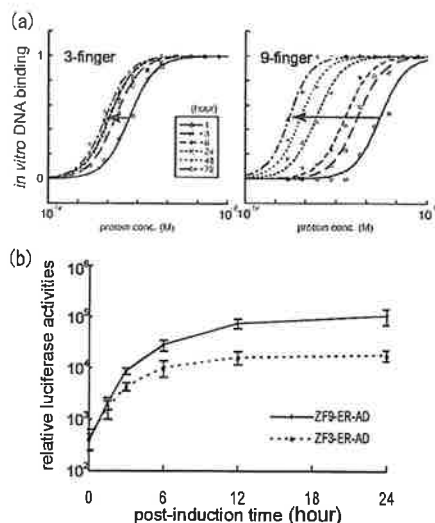


Figure 5. 3フィンガータンパク質と9フィンガータンパク質の (a) in vitro DNA 結合 (b) 細胞内転写活性化の時間変化

ターとコトランスフェクション後、ルシフェリン含有メEDIUM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

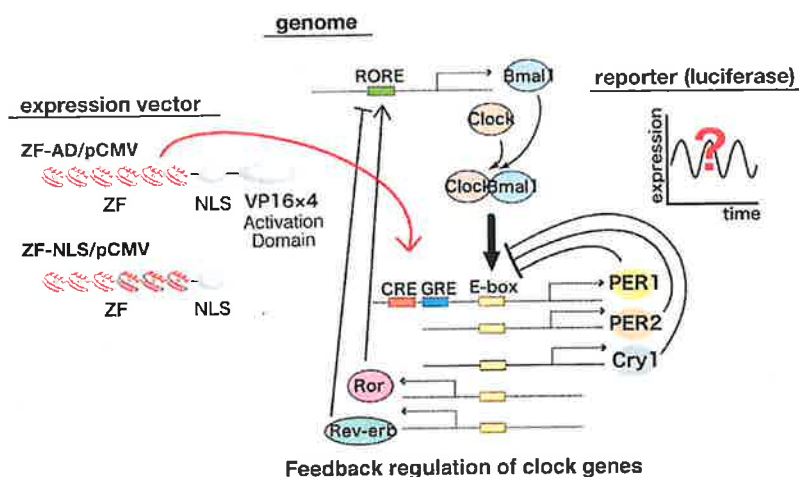


Figure 6. シスエレメントを標的とするジンクフィンガー型転写因子の時計遺伝子発現パターンへの影響の検討

子は、*mPeriod1* プロモーターを標的としているにもかかわらず、*mPeriod1* 以外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、これまでになかった分子ツールとしての応用が期待される。

3. 主な発表

論文

- Yan, W., Imanishi, M., Futaki, S., and Sugiura, Y. "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)
- Morisaki, T., Imanishi, M., Futaki, S., and Sugiura, Y. "Rapid Transcriptional Activity in Vivo and Slow DNA Binding in Vitro by an Artificial Multi-Zinc Finger Protein", *Biochemistry*, 47, 10171-10177 (2008)

招待講演

- 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 年 9 月
- 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 年 7 月

4. 受賞

- Chemistry in the New World of Bioengineering and Synthetic Biology (Royal Society of Chemistry) "Artificial Zinc Finger-Type Transcription Factors Targeting Circadian Clock Genes" The Best Poster Prize 受賞 2008 年 9 月