

マルチ亜鉛フィンガー型人工転写因子の創製と機能

森崎達也,^{*,a} 今西未来,^a 二木史朗,^a 杉浦幸雄^b

Artificial Transcription Factors Based on Multi-zinc Finger Motifs

Tatsuya MORISAKI,^{*,a} Miki IMANISHI,^a Shiroh FUTAKI,^a and Yukio SUGIURA^b^aInstitute for Chemical Research, Kyoto University, Gokasho, Uji, Kyoto 611-0011, Japan, and ^bFaculty of Pharmaceutical Sciences, Doshisha Women's University, Kodo, Kyotanabe, Kyoto 610-0395, Japan

(Received August 29, 2009)

Artificial transcription factors targeting any desired genes are very attractive from the standpoint of regulating biological functions for life science studies and clinical applications. In order to generate such transcription factors, specific DNA binding domains are required to address a single site for each gene promoter. C₂H₂ type zinc finger motif is one of the best frameworks to create new artificial DNA binding proteins for the following features: the zinc finger motif can recognize three bases DNA, be tandemly repeated by covalent linkage, and work as a monomer. Taking advantage of these features, manifold zinc finger proteins targeting various DNA sequences have been created so far. For application to a target in sequences as complex as the human genome, the significantly strict specificity in DNA binding must be required. Conjugating multiple fingers (multi-zinc fingers) enables to recognize longer sequences which are sufficient for addressing a single site in the human genome, whereas it has become known that as the number of finger motifs increases, the equilibrium time with the target sequence is significantly longer by *in vitro* experiments. Our recent study showed that the multi-zinc finger type artificial transcription factor could activate the reporter gene promptly. There is much interest in creating gene regulators, and the artificial transcription factors based on multi-zinc finger motifs could be a superior scaffold.

Key words—zinc finger protein; artificial transcription factor; kinetics

1. はじめに

標的とする遺伝子発現を意のままに操る人工転写因子の創製は、生体機能を制御する上で、生物学の研究はもとより治療への応用という観点からも非常に魅力的な技術である。^{1,2)} 人工転写因子を利用することで、がん遺伝子として知られる Her-2 タンパク質の発現,³⁾ あるいは血管新生に関与する VEGF タンパク質の発現⁴⁾ を制御できることや、哺乳類の培養細胞で遺伝子回路を人工的に構築できること⁵⁾ などがこれまでに報告されている。

実際にこのような技術を実現するためには、それぞれの遺伝子プロモーター中の配列を特異的に認識する DNA 結合ドメインが必要となる。新規 DNA

結合ドメインを創製する方法として合成小分子⁶⁾ あるいは、タンパク質を用いた手法⁷⁾ が用いられてきたが、中でも C₂H₂ 型亜鉛フィンガーモチーフは新規 DNA 結合タンパク質設計において最も優れた骨格の 1 つであることが知られている (Fig. 1).⁸⁾ ここでは亜鉛フィンガーを用いた人工転写因子について、特に速度論的な特徴を中心に紹介する。



Fig. 1. X-ray Structure of the Zif268-DNA Complex (PDB ID: 1AAY)

^a京都大学化学研究所 (〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄), ^b同志社女子大学薬学部 (〒610-0395 京都府京田辺市興戸)

*e-mail: tatsuya.morisaki@p12.mbox.media.kyoto-u.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 129 年会シンポジウム GS3 で発表したものを中心に記述したものである。

2. 亜鉛フィンガーモチーフの DNA 結合特性

亜鉛フィンガーモチーフは天然の転写因子の代表的な DNA 結合モチーフとして知られている。1つのフィンガーは約 30 アミノ酸からなり、 Zn^{2+} を中心に 2つのシステインと 2つのヒスチジンが配位することでコンパクトな $\beta\beta\alpha$ 構造を形成している。DNA 結合特性として以下の 3 点が挙げられる。⁸⁾ 1) 1つのフィンガーあたり 3 塩基対の DNA を α -ヘリックス上の特定のアミノ酸側鎖を用いることで認識する。2) フィンガーが共有結合により連結された構造をとって DNA に結合する。3) 単量体で機能するため非パルンドローム配列を認識する。認識に関与するアミノ酸を変換することによって、希望する 3 塩基対を認識する人工亜鉛フィンガーを創製することが可能となる。これまでに様々なトリプレットを認識する亜鉛フィンガーモジュールがファージディスプレイ法などにより作製されてきた。⁹⁻¹¹⁾ さらにこれら様々なフィンガーを複数連結させることにより、より長鎖の DNA を認識するマルチ亜鉛フィンガーを創り出すことが可能である (Fig. 2).¹²⁾

ゲノムのような膨大な配列中から特定の位置を標的とするためには、極めて厳密な DNA 結合特異性が要求される。¹³⁾ 連続した 16 塩基対の DNA は確率的に 4^{16} すなわち 4.3×10^9 塩基対に 1 度の頻度で

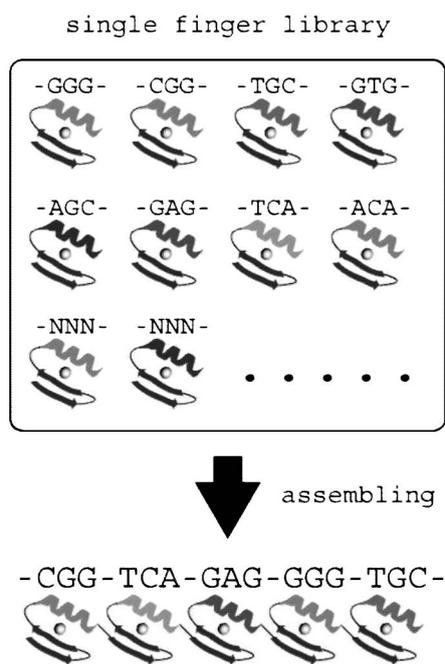


Fig. 2. Creation of Artificial DNA Binding Protein for Desired Sequences by Fusing Zinc Finger Motifs

出現する。ヒトゲノムは約 3×10^9 塩基対からなるので、18 塩基対を認識する 6 フィンガータンパク質はヒトゲノム中唯一の場所を標的する可能性を持つ。ゲノム中に頻繁に存在する繰り返し配列や、非特異結合による毒性を考慮に入れると、さらに長いマルチ亜鉛フィンガーを DNA 結合ドメインとして用いることが望ましい。

筆者らはこれまでに 6, 9 及び 15 のフィンガーを連結させたマルチ亜鉛フィンガータンパク質を創製し、それぞれが約 18, 30 及び 50 塩基対もの長鎖 DNA を認識することを明らかとした。さらに興味深いことにわれわれはフィンガー数の増加に伴い、*in vitro* での標的 DNA との結合平衡に要する時間が顕著に増大することを見出した (Fig. 3).^{14, 15)} マルチ亜鉛フィンガーを人工転写因子の DNA 結合ドメインとして細胞内で用いたときに、この結合特性が機能発現に反映されるならば即効性を求めることができず、また分解による効果の減弱が予測される。この問題に関して、筆者らはマルチ亜鉛フィンガー型人工転写因子も標的遺伝子の転写を迅速に活性化することが可能であることを最近の研究で明らかとした。¹⁶⁾

3. マルチ亜鉛フィンガー型人工転写因子

マウス由来転写因子 Zif268 の DNA 結合ドメインの 3 フィンガーモチーフを 1 ユニット (ZF3) とし、そのユニット 3 つを保存されたリンカー (TGERP) で連結させることによって 9 フィンガータンパク質 (ZF9) を創製した。それぞれの C 末端側に核移行シグナル (NLS) 及び転写活性化ドメインとして NF- κ B ファミリー p65 を連結させた人工転写因子 (ZF-AD) をデザインした (Fig. 4)。大腸菌発現系によって精製された ZF3 は 6 時間以

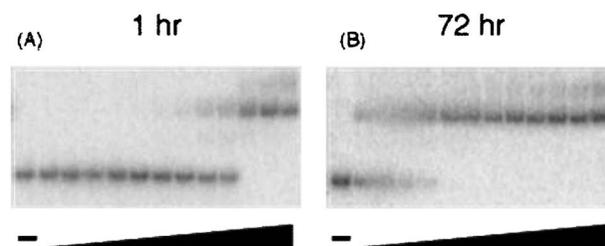


Fig. 3. Multi-zinc Finger Requires Much Longer Time to Reach Equilibrium with the Target DNA

Electrophoretic mobility shift assays for 9-finger protein to its target DNA were carried out after 1 hour incubation (A), and 72 hours incubation (B).

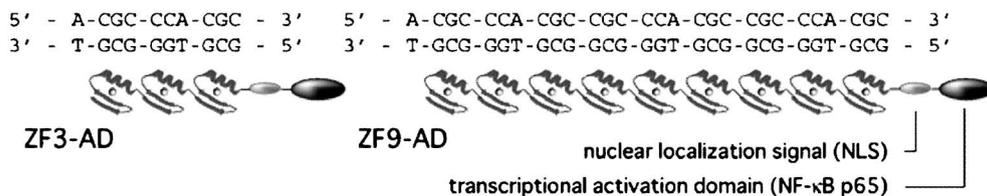


Fig. 4. Schematic Representation of Artificial Transcription Factors Based on Zinc Finger Motifs, ZF3-AD, ZF9-AD, and Each Target DNA Sequences

内に標的 DNA との結合平衡に到達するのに対し、ZF9 はやはり 72 時間もの長時間を要することを *in vitro* ゲルシフトアッセイの結果より確認した。続いて HeLa 細胞における ZF-AD の転写活性化能をレポータアッセイにより評価した結果、トランスフェクション 48 時間後のみならず、6 時間という短時間において ZF9-AD が ZF3-AD と同程度に標的 DNA 配列下流のレポータ遺伝子を活性化することが明らかとなった。そこで経時的な転写活性化能をより詳細に検討するために、人工転写因子をリガンドで制御できるように改変した。¹⁷⁾ 通常のレポータアッセイでは人工転写因子が発現されるとそれに引き続き、その機能発現が連続的にみられるため経時的な転写活性化能を正當に評価することができない。また検出感度の制限により人工転写因子の発現をある程度待たなければならないために、トランスフェクション後短時間でのアッセイを行うことができない。これらの問題点を解決するために NLS をエストロゲン受容体リガンド結合ドメインに変換することにより、経時的な転写活性化能をより詳細に、確実な開始点から観察することを可能とした。このリガンド応答性人工転写因子を ZF-ER-AD と命名した。トランスフェクション 24 時間後、十分量の人工転写因子が発現された後にリガンドを添加し経時的な転写活性化能を観察した結果、ZF9-ER-AD は ZF3-ER-AD と同様に速やかにレポータ遺伝子の転写を活性化することを明らかとした (Fig. 5)。¹⁶⁾ われわれの得た結果はマルチ亜鉛フィンガーの欠点と考えられる *in vitro* での結合平衡到達時間の増大が、細胞内で転写因子の DNA 結合ドメインとして用いる場合には克服できる可能性を示唆するものである。この特性の変化は、例えば分子クラウディング効果¹⁸⁾ やシャペロン様活性を有するタンパク質が存在する¹⁹⁾ 細胞内環境による影響、あるいは細胞内に導入されたレポータ遺伝子の量に対して人

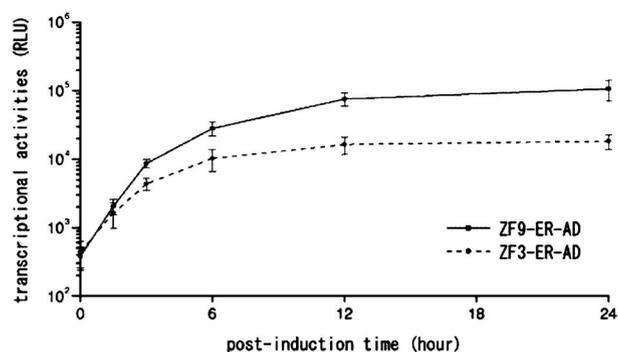


Fig. 5. Prompt Activation of the Multi-zinc Finger Based Artificial Transcription Factor
(Partly modified from Ref. 16.)

工転写因子が多量に存在することによる影響と考えられる。亜鉛フィンガー型人工転写因子の特性を理解するために更なる研究が必要であるが、筆者らが得た知見より、マルチ亜鉛フィンガータンパク質は人工転写因子構築に極めて有用であると期待される。

REFERENCES

- 1) Blancafort P., Segal D. J., Barbas C. F. III, *Mol. Pharmacol.*, **66**, 1361–1371 (2004).
- 2) Koh J. T., Zheng J., *ACS Chem. Biol.*, **2**, 599–601 (2007).
- 3) Magnenat L., Schwimmer L. J., Barbas C. F. III, *Gene Ther.*, **15**, 1223–1232 (2008).
- 4) Kang Y. A., Shin H. C., Yoo J. Y., Kim J. H., Kim J. S., Yun C. O., *Mol. Ther.*, **16**, 1033–1040 (2008).
- 5) Weber W., Stelling J., Rimann M., Keller B., Daoud-El Baba M., Weber C. C., Auel D., Fussenegger M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2643–2648 (2007).
- 6) Dervan P. B., Doss R. M., Marques M. A., *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents*, **5**, 373–387 (2005).
- 7) Negi S., Imanishi M., Matsumoto M., Sugiura

- Y., *Chem. Eur. J.*, **14**, 3236–3249 (2008).
- 8) Pavletich N. P., Pabo C. O., *Science*, **252**, 809–817 (1991).
 - 9) Segal D. J., Dreier B., Beerli R. R., Barbas C. F. III, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 2758–2763 (1999).
 - 10) Dreier B., Beerli R. R., Segal D. J., Flippin J. D., Barbas, C. F. III, *J. Biol. Chem.*, **276**, 29466–29478 (2001).
 - 11) Dreier B., Fuller R. P., Segal D. J., Lund C. V., Blancafort P., Huber A., Koksche B., Barbas C. F. III, *J. Biol. Chem.*, **280**, 35588–35597 (2005).
 - 12) Segal D. J., Barbas C. F. III, *Curr. Opin. Biotechnol.*, **12**, 632–637 (2001).
 - 13) Cornu T. I., Thibodeau-Beganny S., Guhl E., Alwin S., Eichtinger M., Joung J. K., Cathomen T., *Mol. Ther.*, **16**, 352–358 (2008).
 - 14) Kamiuchi T., Abe E., Imanishi M., Kaji T., Nagaoka M., Sugiura Y., *Biochemistry*, **37**, 13827–13834 (1998).
 - 15) Hirata T., Nomura W., Imanishi M., Sugiura Y., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **15**, 2197–2201 (2005).
 - 16) Morisaki T., Imanishi M., Futaki S., Sugiura Y., *Biochemistry*, **47**, 10171–10177 (2008).
 - 17) Beerli R. R., Schopfer U., Dreier B., Barbas C. F. III, *J. Biol. Chem.*, **275**, 32617–32627 (2000).
 - 18) Ellis R. J., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **11**, 114–119 (2001).
 - 19) Roemer S. C., Adelman J., Churchill M. E., Edwards D. P., *Nucleic Acids Res.*, **36**, 3655–3666 (2008).