人工 DNA 結合タンパク質のデザインと細胞機能制御への展開

今西 未来

Design of Artificial DNA Binding Proteins toward Control and Elucidation of Cellular Functions

Miki Imanishi

Institute for Chemical Research, Kyoto University; Gokasho, Uji, Kyoto 611-0011, Japan.

(Received July 30, 2012)

An artificial transcription factor that can regulate the expression of specific genes at a desired time is very useful for research in chemical biology, cell biology, and future gene therapy. A C2H2 zinc finger motif, one of zinc-containing proteins, is known as the most ubiquitous DNA binding motif. The motif is attractive for designing artificial transcription factors with desired DNA binding specificities because of its characteristic DNA binding properties: (1) recognition of 3 bp per motif, (2) tandemly connected modular structure, and (3) binding to non-palindrome sequences as a monomer. Taking advantage of these properties, artificial DNA binding proteins with new DNA binding characteristics have been designed. By changing the linker region between two 3-zinc finger domains, artificial 6-zinc finger proteins were developed and shown to skip DNA sequences. Zinc-responsive transcription factors were created by altering one of the zinc ligands. An artificial zinc finger transcription factor targeting a core clock gene induced phase shifts of the cellular “circadian rhythm”. Herein, I will summarize creation and function of the above-mentioned artificial zinc finger-type DNA binding proteins and transcription factors.

Key words——zinc finger; protein design; circadian rhythm; transcription factor

1. はじめに

タンパク質の構造決定が進むとともに、新しい機能を持ったタンパク質のデザインが大きく注目されている。中でも、膨大なゲノム中から標的とする遺伝子の発現を選択的かつ意図するタイミングで操ることができる人工転写因子は、生命現象の解明に貢献するのみならず、病因遺伝子の制御など医薬応用に向けても有用である。このような人工転写因子をデザインするためには、まず標的とする遺伝子プロモーター中の DNA 配列を特異的に認識する DNA 結合ドメインが必要である。代表的な DNA 結合モチーフとして知られる C2H2 型ジンクフィンガーモチーフは、その特徴的な DNA 結合様式から、人工 DNA 結合タンパク質をデザインするための最も優れた鋳型の 1 つであることが知られている。こ

では、筆者が行ってきたジンクフィンガーモチーフを用いた人工転写因子の創製と、人工転写因子による細胞の概日時計の人為的制御に関して紹介する。

2. C2H2 型ジンクフィンガータンパク質の DNA 結合

ジンクフィンガーは亜鉛イオンの結合によってドメイン構造を形成する代表的な構造モチーフである。ゲノム解析から、全遺伝子の約 3% もがジンクフィンガーをコードしており、ジンクフィンガーはヒト転写因子中に最も多くみられる DNA 結合モチーフであることが明らかになっている。亜鉛イオンと結合する配位子アミノ酸であるシステイン (C) とヒスチジン (H) の組合せによって、C4 型、C3H 型、C2H2 型、C4-C4 型などが存在する。その中でも、C2H2 型ジンクフィンガーは最も代表的な DNA 結合モチーフとして知られている。このモチーフは $CX_2-4CX_{12}HX_{2-6}H$ 配列を含む約 30 アミノ酸残基からなり、保存された 2 つのシステイン残基とヒスチジン残基に亜鉛イオンが四面体型配位構造をとって結合する。亜鉛イオンはジンクフィン

The author declares no conflict of interest.

京都大学化学研究所 (〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄)

e-mail: imiki@scl.kyoto-u.ac.jp

本総説は、平成 24 年度日本薬学会奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

ガーの構造形成因子であり、システイン残基とヒスチジン残基への亜鉛イオンの結合により、N末端側の逆平行 β シートとそれに引き続く α ヘリックスからなるコンパクトな球状構造が形成される [Fig. 1 (A)]. 亜鉛イオンによる適切な構造形成はDNA結合能の発揮に必須であるが、亜鉛イオンはDNAとの相互作用には直接係わっていない。マウス転写因子 Zif268 のDNA結合ドメインに存在するC2H2型ジンクフィンガーとその標的DNAとの複合体の結晶構造解析から、C2H2型ジンクフィンガーの興味深いDNA結合の特徴が明らかになっている [Figs. 1 (B) and (C)].¹⁾ その特徴とは、①1つのフィンガーが3塩基を認識し、その認識には α ヘリックス上の特定のアミノ酸側鎖が関与する、②複数フィンガーが保存されたリンカー配列を介して直列に連結された構造を持つ、③単量体でDNAに結合する、というものである。このような規則性のあるDNA認識様式を持ち、モジュール構造をとってDNA結合能を発揮するC2H2型ジンクフィンガーは、新しいDNA結合特性を有する人工タンパク質の鋳型として大変魅力的である。^{2,3)}

3. リンカー改変型ジンクフィンガータンパク質

これまでに、C2H2型ジンクフィンガーの α ヘリ

ックス上に存在するDNA認識に直接係わるアミノ酸残基を変えることによって、任意のDNAトリプレットに対応するジンクフィンガーがデザインされてきた。⁴⁻⁷⁾ 約30億塩基対からなるヒトゲノム中から唯一のDNA領域を標的とするには、確率論的に、4¹⁶=42.9億塩基(>30億塩基)に1回の確率で出現することから、16塩基対以上を特異的に認識するDNA結合ドメインが必要である。C2H2型ジンクフィンガーは1つのフィンガーあたり3塩基対を認識するので、6つのフィンガーの連結体は18塩基対を認識することが期待される。実際、様々な3塩基対に対応するジンクフィンガー同士を保存されたリンカー配列 (TGEKP) を用いて連結するモジュラーアセンブリー法によって、様々な長さのDNA配列を標的とするマルチジンクフィンガーがデザインされてきた (Fig. 2).⁸⁻¹⁰⁾

一方、より多様なDNA配列を標的とするには、離れたDNA領域を選択的に認識できるジンクフィンガーも有用である。そこで筆者は、ジンクフィンガー同士を連結するリンカー領域に着目し、リンカーの長さ、柔軟性、電荷、構造を系統的に変化させたフィンガー6連結体を作製した (Fig. 3)。そ

Fig. 1. C2H2-type Zinc Finger Domain

(A) Structure of a C2H2-type zinc finger domain. (B, C) DNA binding of the three-zinc-finger domain array from mouse Zif268 transcription factor. (B) Schematic view showing the zinc finger domain binding to the DNA double helix. (C) End view showing the α -helices involving in DNA recognition.

Fig. 2. Schematic Representation of the Principle of the Modular Assembly Method of Zinc Finger Motifs Recognizing 3 bp

Fig. 3. Creation of 6-zinc Finger Proteins with Various Linkers; Flexible, Cationic, Structural, or Catalytic Linkers

の結果、ポリアルギニンリンカーを導入した場合には不連続標的配列への高い結合選択性が得られ、¹¹⁾ また DNA1 ターンに相当する長さの α ヘリックス構造をとり易いペプチド配列で連結した場合には、DNA のトポロジー（位相）に依存した結合選択性を獲得すること¹²⁾ が示された。また、リンカーの長さを調節することによって、転写開始複合体の形成を促進することが期待される「DNA 湾曲」を誘発する人工ジンクフィンガータンパク質も創製することができた。^{13,14)}

さらに、4 価のセリウムイオンの結合によって DNA 加水分解活性を示すことが知られているカルシウム結合ループアナログをジンクフィンガードメイン間のリンカーとして用いた場合には、セリウムイオン存在下、標的配列間で DNA が切断された。¹⁵⁾ リンカーは単純にジンクフィンガー同士を連結する役割だけではなく、その DNA 結合特性に大きな影響を与えるうえに、エンドヌクレアーゼ活性などの新しい機能を付加できる可能性を秘めていると考えられる。

4. 亜鉛濃度応答性人工転写因子

標的遺伝子の発現を思い通りに制御するためには、「適したタイミングでの機能制御」が求められる。マウス転写因子 Zif268 のような典型的な C2H2 型ジンクフィンガーでは、2 つのシステイン及びヒスチジン配位子への亜鉛イオンの結合は極めて強い。そのため、低い亜鉛イオン濃度環境であっても、ジンクフィンガーは亜鉛イオンと結合し、構造形成ひいては DNA 結合能を保持している。一方、配位子アミノ酸を置換することによって、亜鉛イオンの結合親和性を下げることができれば、亜鉛イオン濃度に応答した構造形成能及び DNA 結合能を示すのではないかと考えた。そこで、最もその性質が

Fig. 4. Creation of Zn(II)-responsive Transcription Factor

(A) Schematic representation of the Zn(II)-induced DNA binding and transcriptional control of a zinc finger protein containing a ligand-substituted zinc finger motif. (B) Zn(II)-dependent transcriptional activity of an artificial transcription factor with a CDHH-type zinc finger motif. At 24 h post-transfection, the medium was exchanged with fresh medium containing zinc pyrithione (ZnPy) and ZnSO₄, and the cells were incubated for another 9 h.

よく研究されている転写因子 Zif268 のジンクフィンガードメインに存在する 3 つの C2H2 型ジンクフィンガーのうち、2 番目のジンクフィンガーの配位子システインの 1 つをヒスチジン、アスパラギン酸、グルタミン酸に置換した [Fig. 4(A)].¹⁶⁾

配位子置換型ジンクフィンガーの亜鉛イオン結合親和性は野生型よりも低い、その度合いは異なり、ヒスチジン置換体では約 10 倍、アスパラギン酸及びグルタミン酸置換体では約 500 倍低下することが明らかになった。また、亜鉛イオンの配位構造に関しては、ヒスチジン置換体では野生型と同じ四面体型配位構造をとるのに対し、アスパラギン酸及びグルタミン酸置換体では異なった構造であることが示唆された。DNA 結合活性に関しては、亜鉛イオン十分量存在下ですべての配位子置換型ジンクフィンガーが DNA に結合することがわかった。その結合親和性は野生型よりも低下するものの、アスパラギン酸置換体では約 4 倍の低下に留まることが示された。また、グルタミン酸置換体では約 20 倍、ヒスチジン置換体では約 700 倍低下した。これらの結果は、配位子置換型ジンクフィンガードメインの亜鉛イオン結合性と DNA 結合性とは相関しないと

いうことを示唆している。興味深いことに、金属キレートであるエチレンジアミン四酢酸 (ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA) 存在下でも DNA に強く結合する野生型とは異なり、配位子置換型は亜鉛イオン低濃度条件では DNA 結合活性をほとんど示さなかった。

細胞内環境でもこのような亜鉛イオン応答性の DNA 結合能が発揮されれば、細胞内の亜鉛イオン濃度に応答した転写調節が可能になると考えられる。そこで、最も強く DNA に結合したアスパラギン酸置換体を含む DNA 結合ドメインと、転写活性化ドメインとを融合した人工転写因子を発現する発現ベクター、及び、ルシフェラーゼ遺伝子上流プロモーター中にジンクフィンガー結合配列を有するレポーターベクターを構築した。これらを HeLa 細胞にトランスフェクションし、転写活性化量を測定した。その結果、細胞培養液中の亜鉛イオンの濃度に依存した転写活性化がみられた [Fig. 4(B)].¹⁷⁾ すなわち、ジンクフィンガーの配位子を一カ所置換するだけで、亜鉛イオン濃度応答性の転写因子として機能することが明らかになった。この方法は、バックグラウンドが低い上、ジンクフィンガーの DNA 結合能そのものを調節できるため、速やかな応答性も期待される。

5. 細胞時計を操るジンクフィンガー型人工転写因子

血圧、体温、睡眠・覚醒など、様々な生理現象には約 24 時間周期で変動するリズムが認められる。この概日リズムを制御しているのは概日時計と呼ばれる機構で、「同調・発振・出力」から構成されている。約 24 時間周期での振動を生み出す「発振」を司るのは、約 20 種類の時計遺伝子が形成する転写・翻訳のネットワークであり、これら時計遺伝子の発現自体が約 24 時間周期でリズムに変動していることが明らかになってきた。またこの「発振」を受け、数々の時計制御遺伝子がリズムに「出力」され、様々な生理現象としてあらわれる。さらに、概日時計には光照射などの環境変化に応答するために、リズムをリセット（位相シフト）させる「同調」機構が存在する。このような「同調、発振、出力」機構で構成される体内時計は、脳・中枢のみならず個々の末梢細胞にも存在し、培養細胞でもリズムを強く検出することができる。しかしながら、

細胞の時計システムは複雑な上、同種の転写因子結合エレメントが複数の遺伝子上に存在するため、個々のエレメント、及び個々の遺伝子を選択的に操作することが困難である。そのため、発振を司るコアクロックに直接かつ遺伝子選択的に作用して、細胞の時計を人為的に調節するといった試みはこれまでになかった。

特に「同調」機構においては、グルココルチコイドホルモン、¹⁸⁾ フォルスコリン、¹⁹⁾ 血清²⁰⁾ などを培養細胞に添加することによって位相シフトが生じることが知られているものの、これらの刺激の結果、様々な遺伝子の発現が変動してしまうため、どの遺伝子、どのエレメントが重要であるのかが不明であった。その上、体内時計の同調を人為的に制御する際に、意図しない副反応が伴ってしまう。したがって、特定のエレメントに選択的に作用して、同調を誘起する分子ツールが求められている。筆者らは、C2H2 型ジンクフィンガーのアミノ酸改変と連結によって、任意の DNA 配列へ結合する人工 DNA 結合タンパク質がデザインできることに着目し、時計遺伝子 *Period1* のグルココルチコイド応答配列 (glucocorticoid response element; GRE) のみを標的とするマルチジンクフィンガー、及び、このジンクフィンガーを DNA 結合ドメインとする人工転写因子をデザインした。そしてこれを用いて、細胞の分子時計を人為的にリセットすることに成功した。²¹⁾

GRE は「(A/G)GNACA NNN (A/T)GTNC(C/T)」からなる保存配列を有する。様々な遺伝子プロモーター上の数ある GRE の中から、標的遺伝子 *Period1* の GRE のみへの高い選択性を期待して、その周辺配列も含めた 18 塩基対を標的とする 6-ジンクフィンガー連結体を作製した。ゲルシフトアッセイ及びクロマチン免疫沈降の結果、このジンクフィンガーは他の遺伝子プロモーター中の GRE には結合せず、ゲノム中の標的に高い選択性で結合することが示唆された (Fig. 5)。

このジンクフィンガーに転写活性化ドメイン (AD) を融合した人工転写因子をデザインし、さらに、この人工転写因子の蓄積・分解をリガンドの添加によって制御できる分解制御ドメイン (DD)²²⁾ を付加した「リガンド応答性ジンクフィンガー型人工転写因子; DD-ZF-AD」を NIH3T3 細胞内で発現させた。この細胞に、マウス *Period1* プロモ-

Fig. 5. Specific DNA Binding of the Designed Zinc Finger Protein to *Per1* Distal GRE

(A) The results of electrophoretic mobility shift assays of the designed zinc finger protein (0.05–250 nM) to various GREs. The shaded bases are identical to those in the *Per1* dGRE target. (B) The results of Chromatin immunoprecipitation assays for a myc-epitope-tagged zinc finger protein expressed in NIH3T3 cells. The inset shows a representative result of PCR amplification of immunoprecipitated samples by the indicated antibodies using mouse *Period1* distal GRE primer.

Fig. 6. Control of Circadian Phase by an Artificial Zinc Finger Transcription Factor

(A, B) Phase-dependent phase shift of the DD-ZF-AD-expressing cells by addition of the ligand. Left; The change of mPer2-luc luminescence was monitored. Black arrows indicate the time of application of the ligand or vehicle. As indicated by the horizontal grey arrows, phase delay (A) and advance (B) were observed. Right; Quantification of the phase shift of the wild-type (ZF(-)) and the DD-ZF-AD-expressing cells (ZF(+)). 1.13 ± 0.38 h (mean $\pm$ S.D.) phase delay (A) and 0.87 ± 0.21 h (mean $\pm$ S.D.) phase advance (B). (C) Schematic representation of the artificial zinc finger transcription factor, DD-ZF-AD, and its function.

ター駆動型ルシフェラーゼレポーターベクター (mPer2-luc) をトランスフェクションし、ルシフェリン含有培地を用いてリアルタイムで時計遺伝子発現パターンをモニタリングした [Figs. 6(A) and (B); left]. 発現リズムの山 [Fig. 6(A)] 若しくは谷 [Fig. 6(B)] の時点でリガンドを添加して DD-ZF-AD による *Period1* 遺伝子の転写を特異的に活性化したところ、リガンド添加のタイミング依存的に、時計遺伝子発現リズムの位相が前後にシフトし

た (Fig. 6).

本研究では、人工 DNA 結合タンパク質という新しい分子ツールを用いて、初めて体内時計の「同調」を遺伝子選択的に誘起することに成功し、また、「同調」における *Period1* 遺伝子の重要性を直接的に示すことができたと言える。高い選択性で時計遺伝子ネットワークに直接作用し、リズムのリセットを誘起できる本人工転写因子は、概日リズムの制御メカニズムの解明のみならず、副反応を抑えた時間

治療の新しい概念を生み出し、また、ゲノムを直接標的とする新しいプロモーター解析法の開発に向けても大きな前進をもたらすことが期待される。

6. おわりに

ジンクフィンガーは約 30 アミノ酸というコンパクトなモチーフでありながら、亜鉛イオン結合能と DNA 認識能という 2 つの分子認識能を保持している。この精密な分子認識能を利用してデザインされた「人工ジンクフィンガー型 DNA 結合タンパク質」は、天然のジンクフィンガーにはない新しい機能を発揮した。今後、遺伝子制御、遺伝子編集、遺伝子解析のための新しいツールとして、生命科学研究、及び、医薬への応用がますます期待される。

謝辞 大学院時代よりご指導頂き、ジンクフィンガー研究の道を開いて頂きました杉浦幸雄先生（現同志社女子大学薬学部）に深く感謝します。また、研究に対して、ご支援、ご協力頂きました、京都大学化学研究所 二木史朗先生及び、旧杉浦研、二木研の皆様は厚く御礼申し上げます。また、時計遺伝子の制御に関する研究は、京都大学大学院薬学研究科の岡村 均先生、土居雅夫先生との共同研究であり、深く感謝いたします。

REFERENCES

- 1) Elrod-Erickson M., Rould M. A., Nekludova L., Pabo C. O., *Structure*, **4**, 1171–1180 (1996).
- 2) Klug A., *Annu. Rev. Biochem.*, **79**, 213–231 (2010).
- 3) Negi S., Imanishi M., Matsumoto M., Sugiura Y., *Chemistry*, **14**, 3236–3249 (2008).
- 4) Beerli R. R., Dreier B., Barbas C. F. 3rd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1495–1500 (2000).
- 5) Maeder M. L., Thibodeau-Beganny S., Osiak A., Wright D. A., Anthony R. M., Eichinger M., Jiang T., Foley J. E., Winfrey R. J., Townsend J. A., Unger-Wallace E., Sander J. D., Muller-Lerch F., Fu F., Pearlberg J., Gobel C., Dassie J. P., Pruett-Miller S. M., Porteus M. H., Sgroi D. C., Iafrate A. J., Dobbs D., McCray P. B. Jr., Cathomen T., Voytas D. F., Joung J. K., *Mol. Cell*, **31**, 294–301 (2008).
- 6) Mandell J. G., Barbas C. F. 3rd, *Nucleic Acids Res.*, **34**, W516–W523 (2006).
- 7) Sander J. D., Zaback P., Joung J. K., Voytas D. F., Dobbs D., *Nucleic Acids Res.*, **35**, W599–W605 (2007).
- 8) Beerli R. R., Barbas C. F. 3rd, *Nat. Biotechnol.*, **20**, 135–141 (2002).
- 9) Imanishi M., Nakamura A., Morisaki T., Futaki S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **387**, 440–443 (2009).
- 10) Liu Q., Segal D. J., Ghiara J. B., Barbas C. F. 3rd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 5525–5530 (1997).
- 11) Imanishi M., Yan W., Morisaki T., Sugiura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **333**, 167–173 (2005).
- 12) Yan W., Imanishi M., Futaki S., Sugiura Y., *Biochemistry*, **46**, 8517–8524 (2007).
- 13) Imanishi M., Hori Y., Nagaoka M., Sugiura Y., *Biochemistry*, **39**, 4383–4390 (2000).
- 14) Imanishi M., Sugiura Y., *Biochemistry*, **41**, 1328–1334 (2002).
- 15) Nakatsukasa T., Shiraishi Y., Negi S., Imanishi M., Futaki S., Sugiura Y., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **330**, 247–252 (2005).
- 16) Imanishi M., Matsumura K., Tsuji S., Nakaya T., Negi S., Futaki S., Sugiura Y., *Biochemistry*, **51**, 3342–3348 (2012).
- 17) Imanishi M., Nakaya T., Morisaki T., No-shiro D., Futaki S., Sugiura Y., *Chembiochem*, **11**, 1653–1655 (2010).
- 18) Balsalobre A., Brown S. A., Marcacci L., Tronche F., Kellendonk C., Reichardt H. M., Schutz G., Schibler U., *Science*, **289**, 2344–2347 (2000).
- 19) Yagita K., Okamura H., *FEBS Lett.*, **465**, 79–82 (2000).
- 20) Balsalobre A., Damiola F., Schibler U., *Cell*, **93**, 929–937 (1998).
- 21) Imanishi M., Nakamura A., Doi M., Futaki S., Okamura H., *Angew. Chem. Int. Ed.*, **50**, 9396–9399 (2011).
- 22) Banaszynski L. A., Chen L. C., Maynard-Smith L. A., Ooi A. G., Wandless T. J., *Cell*, **126**, 995–1004 (2006).