

分子進化法による
Transcription activator-like effector の機能拡張

2016

辻 将吾

目次

序論3
第一章 5' 末端塩基非依存的 TALE の創製8
第一節 リピート-1 の W232 置換の検討8
第二節 リピート-1 のランダム化と B1H スクリーニングによる選出12
第二章 メチル化シトシン選択的結合 TALE の創製15
第一節 5mC 選択的ユニットのスクリーニング16
第二節 人工ユニットを用いた内在遺伝子のメチル化状態依存的な活性化23
総括30
実験の部31
引用文献42
謝辞45

略号

本論文で使用した略号は以下の通りである。

5mC : 5-methylcytosine

6-FAM : 6-Carboxyfluorescein

AD : Activation domain

BSA : Bovine serum albumin

B1H screening : Bacterial one-hybrid screening

Cas9 : CRISPR -associated proteins 9

cDNA : Complementary DNA

CRISPR : Clustered regularly interspaced short palindromic repeats

DTT : Dithiothreitol

EDTA : Ethylenediaminetetraacetic acid

EMSA : Electrophoresis mobility shift assay

FITC : Fluorescein isothiocyanate

GAPDH : Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

gRNA : guide RNA

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

NLS : Nuclear localization signal

NP40 : Nonidet P-40

TAL or TALE : Transcription activator-like effector

TALEN : TALE nuclease

PCR : Polymerase chain reaction

RASSF2 : Ras association domain-containing protein2

RNAP : RNA polymerase

RVD : Repeat variable diresidues

SDS-PAGE : Sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis

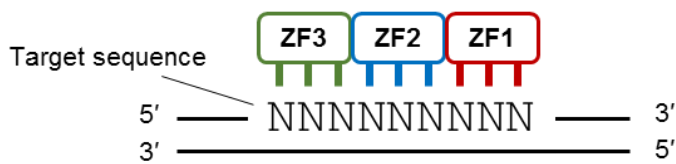
ZF : Zinc finger

序論

任意の塩基配列に結合するようにデザイン可能なDNA結合タンパク質を様々な機能性タンパク質と融合することにより、ゲノム配列選択的に遺伝子を操作することができる。例えば、転写を活性化あるいは抑制するタンパク質との融合により、任意の遺伝子の転写を特異的に制御する人工転写因子を作製することができる。またDNA切断活性をもつタンパク質と融合させれば、任意のDNA部位を切断する人工制限酵素を作製することができる。このような人工タンパク質を用いることで、遺伝子機能の解析、遺伝子治療、ゲノム編集など様々な方面への応用が進んでいる。

ゲノム配列選択的な遺伝子操作を行うためには、DNA結合タンパク質を目的の配列に結合するように設計する必要がある。天然の転写因子などに見られる代表的なDNA結合モチーフとしてヘリックスターンヘリックスモチーフやロイジンジッパーモチーフなどがある。しかし、これらのモチーフは二量体を形成することで機能し、パリンδροームなDNA配列を認識することから、任意の塩基配列を認識するように設計することは難しい[1, 2]。設計が可能なタンパク質としてジンクフィンガーモチーフがあげられる。最も研究が進んでいるC₂H₂クラスのジンクフィンガーは、コンパクトなββα構造をしており、単量体で機能して3塩基を認識する。複数のジンクフィンガーを直列に連結することで、より長い配列を認識させることが可能である[3]。セレクション等によって、異なる3塩基を認識するジンクフィンガーのアレイが作製されており、これらを連結することで任意の塩基配列を認識するように設計することができる(Fig. 0-1A)[4]。しかし、連結するジンクフィンガーモチーフの組み合わせによっては、実際に認識する塩基が設計通りに行かないことも多く、目的の配列に結合するタンパク質を作製することは容易ではない[5]。他方、配列特異的にDNAを認識する方法として、タンパク質ではなく核酸を用いる方法がある。近年注目されているClustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated proteins 9(CRISPR-Cas9)法では、guide RNA(gRNA)と呼ばれる100塩基程度のRNA断片を利用する(Fig. 0-1B)[6, 7]。gRNA中の20塩基からなる領域と相補的な塩基対を形成するDNA配列に、Cas9ヌクレアーゼが誘導される。Cas9ヌクレアーゼによるDNAの切断のほかにも、DNA切断活性を不活性化したCas9に機能性タンパク質を融合させることで、転写調節やエピジェネティック修飾などの遺伝子操作を標的部位に施すことが可能である[8, 9]。標的配列と相補的なgRNA配列を設計するだけで、任意の配列を標的にできるという利便性の高さから、CRISPR-Cas9法の利用が生命科学分野において近年急速に広がっている。し

(A) Zinc finger



(B) CRISPR/Cas9

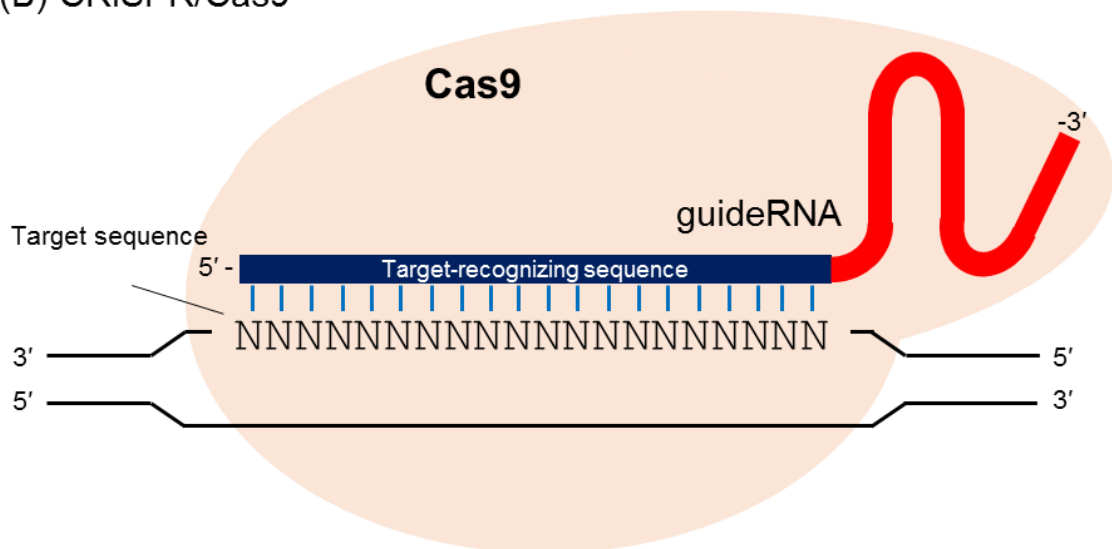


Fig. 0-1 Schematic representation of DNA binding mode of designable DNA recognition tools. (A) Engineered zinc finger containing three fingers, which binds to 9-base sequence. (B) CRISPR/Cas9 system. One end (blue) of the guideRNA binds to the target sequence and the other end (Red) delivers Cas9 to the target site.

かしながら、gRNA 中の 20 塩基の標的決定配列のうちの末端領域における mismatches は許容的であると報告されており、本来意図していない DNA 配列に対する作用が生じる可能性がある[6, 10]。したがって確実性を重視する研究における使用には注意が必要である。また RNA-DNA 間の相互作用による標的配列の認識は、ワトソン・クリック型塩基対の形成という一対一対応の形で行われるため、認識能をさらに改良することは難しいといえる。一方、DNA 結合タンパク質の場合には、相互作用するアミノ酸は 20 種類存在し、1 塩基の認識に複数のアミノ酸が関与しているため、認識様式の多様性が高い。したがって特異性が高く、アミノ酸配列の改変によって、配列特異性の向上や修飾塩基の認識能を付加するなどの機能拡張がさらに期待できる。このように、DNA 結合タンパク質は、特異性、機能拡張性という点で優れているが、その設計の困難さが問題となる。一方、近年発見された Transcription activator-like effector (TALE) は、これまで不可能であった簡便な設計が可能な DNA 結合タンパク質として注目されている。

TALE は、植物病原菌 *Xanthomonas* から発見された DNA 結合タンパク質である[11]。天然の TALE は宿主の特定 DNA 配列に結合し、感染した植物の遺伝子発現を操作することで、疾患プロセスを促進する働きがある。TALE は 34 アミノ酸から成るユニットが 10~25 程度繰り返される特徴的な DNA 結合ドメインを含んでおり、各繰り返しユニットひとつが DNA 配列中の 1 塩基を認識することで標的 DNA 配列に結合する (Fig. 0-2) [11-14]。各繰り返しユニットは Repeat variable diresidues (RVD) と呼ばれる 12、13 番目のアミノ酸にのみ多様性をもっており、この RVD の配列によって各ユニットが認識する塩基が決定される。異なるユニットを組み合わせるだけで任意の塩基配列に結合するタンパク質を容易に設計できることから、配列特異的な DNA 認識ツールとして有用である。特に TALE とヌクレアーゼを融合した TALE nuclease (TALEN) を利用したゲノム編集技術の発展は目覚ましく、遺伝子ノックアウト、ノックイン、一塩基多型の改変、などの技術が確立されつつある[15]。ゲノム編集分野においては、より簡便な設計が可能な CRISPR-Cas9 法の利用が急増しているが、CRISPR-Cas9 法は前述のように配列特異性という面で不安がある[6, 10]。一方で TALEN のオフターゲット効果は低いと報告されており、オフターゲットを低減する必要がある場合には有用な選択肢である[16, 17]。TALEN によるゲノム編集技術の他にも、蛍光タンパク質を融合した TALE を生細胞内で発現させることによる標的配列の可視化技術や、タグ標識した TALE を用いた免疫沈降によってゲノム中の特定配列を単離する技術など、TALE の高い配列特異性を活かした諸技術が開発されている[18, 19]。しかし、これらの技術はゲノム中の全ての部位を対象として利用することはできない。なぜならば、TALE が標的 DNA に対して効率的に結合するためには、繰り返しユニットによって認識される塩基配列に加えて、5'末端

側にチミンが必要であるという制限があるためである[20, 21]。したがって、チミンを含まない領域に結合する TALE を設計することはできない。また、DNA 塩基は様々な修飾を受けることが知られているが、修飾塩基を選択的に認識する TALE ユニットは報告されていない。そこで、本研究では、TALE タンパク質に対して分子進化法を適用することで、より自由に標的配列を選択することができる TALE タンパク質の創出を目指した。その結果、第一章では 5'末端塩基に依存せずに高い DNA 結合活性をもつ TALE の創製に成功し、第二章ではメチル化修飾を受けたシトシン塩基を選択的に認識する TALE ユニットの創製に成功した。以下にその研究成果の詳細について述べる。

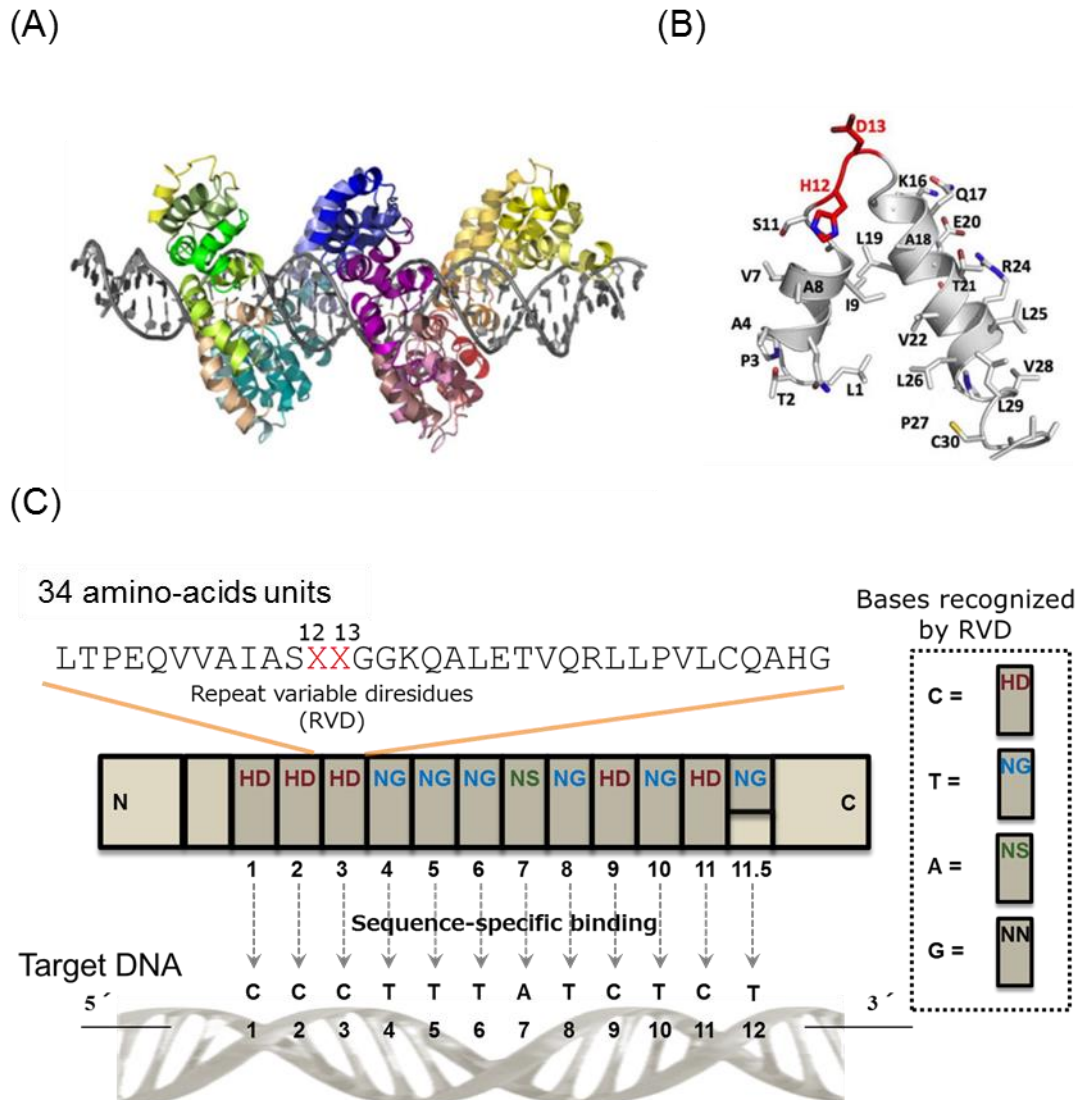


Fig. 0-2 (A) Structures of the DNA binding region of a TALE, PthXo1 in complex with its target site (PDB: 3UGM). (B) Structure of a single TALE unit. RVD (HD) that recognize cytosine are shown in red (PDB: 3UGM). (C) Schematic representation of DNA binding mode of TALEs. The bases recognized by individual units are shown in the right box.

第一章

5'末端塩基非依存的 TALE の創製

TALE は配列選択の自由度の高さと設計の容易さから、配列特異的な DNA 認識ツールとして広く応用されている。しかし、TALE の DNA 結合には、標的 DNA の 5'末端塩基がチミンである必要がある[20, 21]。このため、チミンを含まない領域には TALE を結合させることが出来ない。このような 5'-T 要求性は、TALE を利用する上で大きな障害となる。そこで本章では、TALE のアミノ酸配列を改変することで、5'-T 制限をもたない TALE の創製を試みた。

第一節 リピート-1 の W232 置換の検討

本研究では、骨格となる TALE タンパク質として先行研究で広く調べられており、他の TALE と比較して強い結合活性をもつことが知られる dHax3 を使用した[22-24]。dHax3 のうち、N 末端領域 241 アミノ酸、繰り返しユニット領域 398 アミノ酸、および C 末端領域 183 アミノ酸を DNA 結合ドメイン dHax3 (N241/C183) として用いた (以下、これを野生型と表記する) (Fig. 1-1)。



Fig. 1-1 Structural representation of dHax3 and dHax3(N241/C183). dHax3 contains a central repeat domain, a nuclear localization signal (NLS), and a transcriptional activation domain (AD). The central repeat domain consists of 11.5 repeat units.

まず、野生型 TALE を用いて 5'末端塩基が TALE 結合に及ぼす影響について評価した。TALE 結合配列の 5'末端塩基を T/A/G/C いずれかに置換した配列を含むレポーターベクターを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行ったところ 5'-T 配列では 5'-A/G/C 配列の 10 倍以上の活性が見られ、TALE の標的配列への結合には 5'-T が重要であることが確認された (Fig. 1-2)。

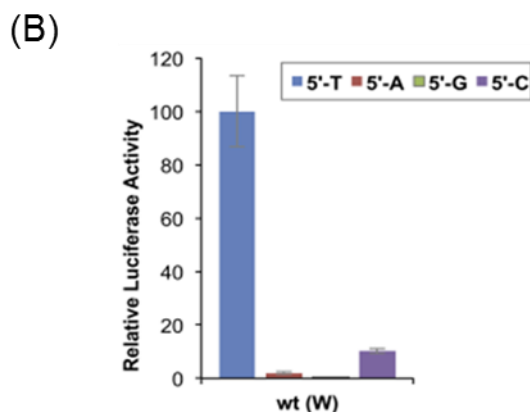
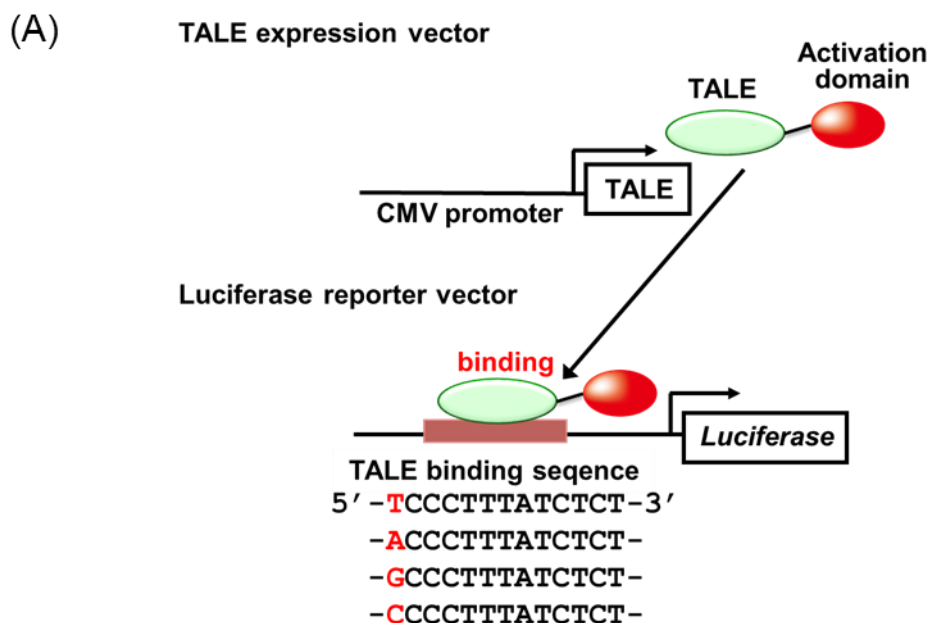
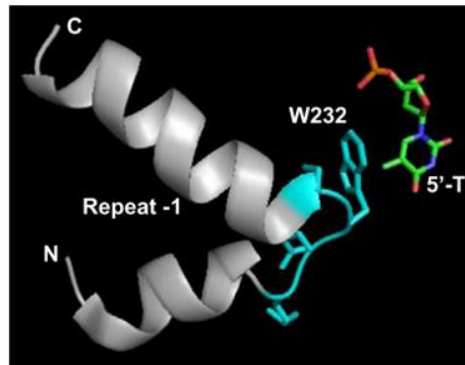


Fig. 1-2 (A) Schematic representation of the luciferase reporter assay used in this study. TALE-expression vector and luciferase reporter vector were co-transfected into HeLa cells. Twenty four hour after the transfection, luciferase activity was determined to assess TALE binding ability. (B) Luciferase reporter activity of wild-type dHax3(N241/C183) for reporter vectors with TALE binding sequence beginning with 5'-T/A/G/C (blue, red, green, and purple, respectively). Data are expressed as means \pm SD. n = 3.

次に 5'-T 制限をもたない TALE の創製に取り組んだ。TALE-DNA 複合体の結晶構造から、TALE による 5'-T 認識には、繰り返し領域の N 末端側に存在するリピート-1 と呼ばれる繰り返しユニット類似構造部分が 5'-T 近傍に位置しており、認識への関与が示唆されていた (Fig. 1-3A) [14, 25]。そこで、このリピート-1 に変異を導入することで 5'末端塩基認識様式の改変を試みた。まず、リピート-1 ヘアピンループ中で特に 5'-T 近傍に位置している W232 を、他の 19 種のアミノ酸に置換した。各置換体の DNA 結合能をルシフェラーゼレポーターアッセイによって評価したところ、W232Y 置換体を除く全ての置換体において 5'-T 配列への結合能が大きく低下した (Fig. 1-3B)。このことから、W232 が 5'末端塩基認識において重要な役割を担うことが示唆された。しかしながら、いずれの置換体の場合にも、5'-T 以外の配列への結合能の上昇はみられず、5'末端塩基認識様式を変えるには W232 の置換だけでは不十分であることが明らかになった。

(A)



(B)

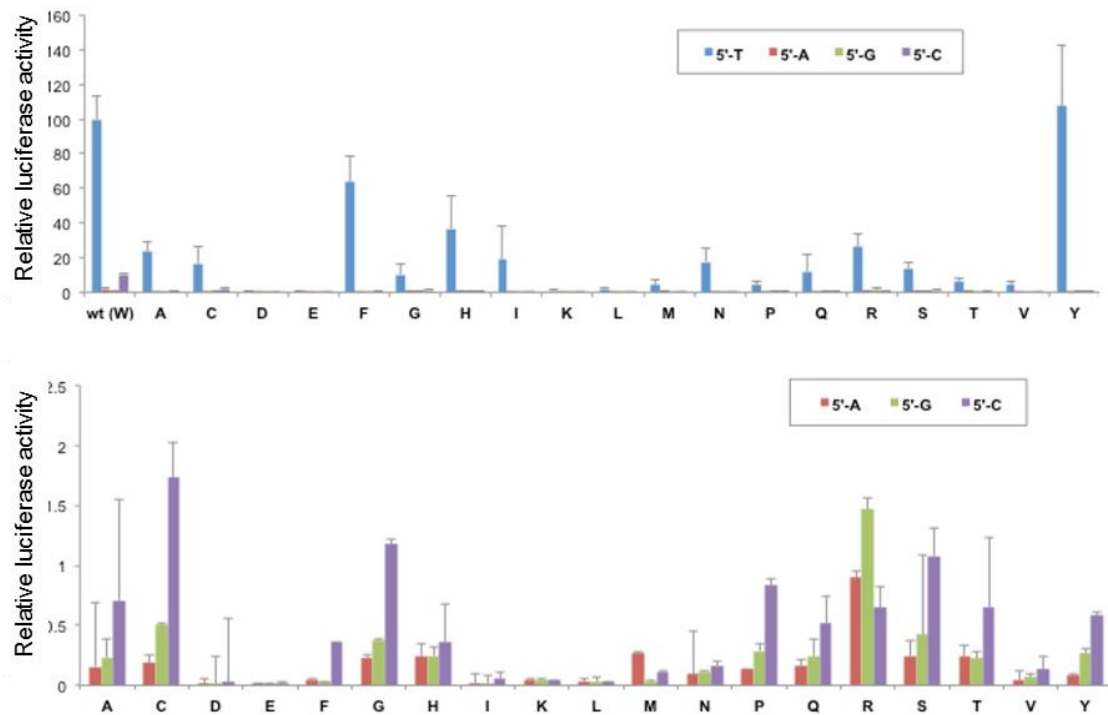


Fig. 1-3 (A) Recognition of a 5'-T by W232 in repeat-1 (PDB: 3UGM). (B) Luciferase reporter activity of wild type and W232 mutants for reporter vectors with dHax3 binding site beginning with 5'-T/A/G/C (upper). The luciferase activities of W232 mutants for reporters with 5'-A/G/C were less than 2 % of that of wild type for 5'-T sequence as shown in the lower panel. In both panels, the luciferase activity of the wild type for 5'-T was defined as 100. Data are expressed as means \pm SD. n = 3.

第二節 リピート-1 のランダム化と B1H スクリーニングによる選出

W232 置換体の結果から、5'-T の制限をなくすためには、リピート-1 ヘアピンループ構造全体の置換が必要であると考えた。そこで、ヘアピンループ構造全体にあたる 230 番目から 233 番目の 4 アミノ酸 (KQWS) をランダム化した (Fig. 1-3A)。ランダム化ライブラリーから、5'-T 以外の配列に対して結合性を示すリピート-1 配列を Bacterial one-hybrid (B1H) スクリーニングにより選出した[26, 27]。B1H スクリーニングでは、ランダム化 TALE と大腸菌 RNA ポリメラーゼの ω サブユニットの融合タンパク質を発現するプラスミドと、TALE 結合配列をヒスチジン合成酵素遺伝子 (HIS3) の上流に配置したレポータープラスミドとを同時に大腸菌に形質転換する (Fig. 1-4A)。形質転換された大腸菌をヒスチジン非含有培地中で培養した後、生存大腸菌がもつプラスミドを回収、配列を確認することで、レポーター配列に結合する TALE のアミノ酸配列を得ることができる。これまでに、TALE 類似タンパク質である *Ralstonia* TALE が 5'-G 配列を標的とすることが報告されていたことから、スクリーニングには 5'-A、5'-C 配列を標的配列として用いた[28]。スクリーニングの結果、5'-A、5'-C 配列いずれを標的配列とした場合にも、ほとんど同じアミノ酸配列パターンが得られた (Fig. 1-4B)。特に Q231R と S233A という変異が高度に保存されていた。

得られた変異体の DNA 結合能を評価するために、代表的な変異体 4 つ (AA230-233= SRGA, SRPA, ARG, ARPA) を用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行った (Fig. 1-4C)。その結果、全ての変異体において 5'-T 以外の配列に対する結合能の有意な上昇が見られた。野生型に比べて変異体では 5'-T 配列に対する結合能は 30%程度低下したものの、5'-T/A/G/C いずれの配列に対しても高い結合能を示したことから、5'末端塩基非依存的な TALE タンパク質が創製できたといえる。

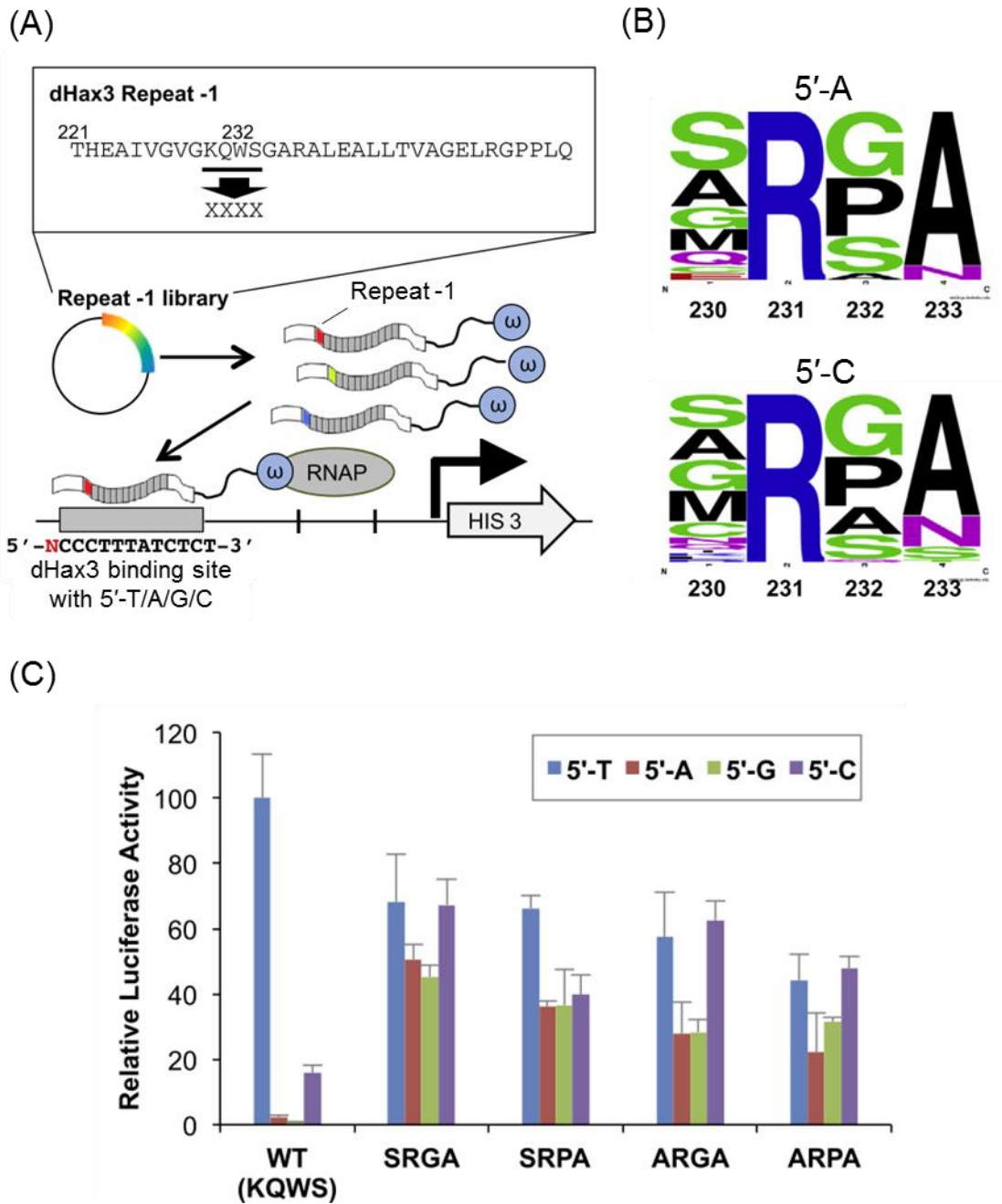


Fig. 1-4 (A) Schematic representation of the B1H system used in this study. Four amino acid residues, K230-S233, were randomized shown as XXXX. (B) Sequences obtained from the dHax3(N241/C183) library with a randomized loop region are displayed as a sequence logo. The upper and lower panels show the results using the 5'-A and 5'-C reporters, respectively. (C) The luciferase reporter activities of the mutants SRGA, SRPA, ARGA, and ARPA. Data are expressed as means \pm SD. n = 3.

以上のように本研究では、TALE リピート-1 中のヘアピンループ構造部分をランダム化し、B1H screening による選出を行うことで、結合配列の 5'末端塩基が T/A/G/C、いずれの場合でも高い結合活性を示す TALE タンパク質を創製することに成功した。変異体が全ての 5'末端塩基に結合活性を示した理由としては、変異体において高度に保存されていた 231R と DNA 骨格中リン酸基との静電相互作用が生じている可能性が考えられる。

今回創製した TALE を用いれば、標的配列選択の自由度が大きく上昇するだけでなく、これまで標的にできなかった T を含まない配列に結合する TALE をデザインできる。したがって、本研究の結果は TALE を利用した遺伝子改変技術、遺伝子治療など多方面への応用が期待される。

第二章

メチル化シトシン選択的結合 TALE の創製

DNA のメチル化は、遺伝子発現、クロマチン構造、ゲノム安定性などを制御するエピジェネティック因子である[29]。DNA メチル化は発生、分化、細胞周期などに応じて変化し、またその機能の破綻が疾患の原因となることが報告されている[30-32]。哺乳類における DNA のメチル化は主に CpG ジヌクレオチド中のシトシンで起こることから、この 5 位メチル化シトシン (5mC) の生体内での機能を調べるために多くの 5mC 検出法が考案されている。しかし、生細胞中で個別の 5mC をゲノム配列特異的に検出する方法は報告されていない。このことから個々の 5mC がもつ生物学的な意義に関しては不明な点が多い。

現在汎用されている 5mC 検出法の一つとして、バイサルファイトシーケンス法がある[33]。この手法によって単一塩基レベルでのゲノム網羅的な 5mC 解析が可能となった。しかし、この手法は細胞からゲノム DNA を抽出する必要があることから、生細胞中でのメチル化状態の解析には用いることが出来ない。一方、細胞レベルでの 5mC 検出法として、蛍光標識した 5mC 抗体や 5mC 結合タンパク質を生細胞内のゲノム DNA に直接作用させる方法がある[34-36]。この方法では、顕微鏡やフローサイトメーターを用いて、細胞内ゲノムのメチル化状態を細胞非侵襲的に調べることが可能である。しかし、5mC 抗体は周辺配列非特異的であり、かつ生細胞内への導入が困難であるという問題がある。また既存の 5mC 結合タンパク質では標的にできる配列に制限があり、検出できる 5mC 部位は限られている。したがって周辺配列特異的に任意の配列を標的にできるような 5mC 認識プローブの開発が望まれる。そこで、TALE がもつ設計自由度の高い DNA 認識能を 5mC 認識に活かすことが想起される。

TALE を用いた 5mC の認識に関して、これまでに幾つかの報告がある。TALE ユニットのうちで RVD “NG” (アスパラギン、グリシン) を含むユニット (以下 “NG” ユニットと表記する) はチミン塩基を認識するユニットとして汎用されているが、チミンと 5mC の構造的類似性から “NG” ユニットは 5mC にも結合することが報告されている [37, 38]。また “NG” ユニットを利用することで、標的配列中のシトシンがメチル化状態の場合にのみ TALE を結合させることが可能であると報告されている[39-41]。しかし、既報告における “NG” ユニットの 5mC 選択性の検証は *in vitro* 系での実験によるものに限られており、クロマチン構造や他の 5mC 結合タンパク質が存在する細胞内ゲノム DNA に対しても “NG” ユニットが同様に機能するかは不明である。さらに、“NG” ユニットの 5mC 選択性はそれ

程高くなく、TALE の結合を標的配列のメチル化状態依存的に制御するには不十分であった[41]。そこで本研究では、既存ユニットを改変することで、生細胞内でより 5mC 選択的に結合するユニットを創製し、TALE を 5mC 認識ツールとして応用することを目指した。

第一節 5mC 選択的ユニットのスクリーニング

これまでに、天然にはない塩基認識能をもつユニットを作製するために、天然アミノ酸で可能な 400 種類の RVD 配列をもつユニット全てに関して塩基特異性が調べられている[42-44]。しかし、これらの研究において調べられているのは A、T、G、C に対する結合性のみであり、5mC に対する結合性は調べられていない。これらのユニットの中に 5mC に対して高い選択性を示す RVD 配列が存在する可能性は十分にあると考えられる。さらに、DNA 結合タンパク質においては、標的塩基と直接相互作用していないアミノ酸の改変であっても、タンパク質の塩基認識改変につながるものが報告されている[45, 46]。これらの点を鑑み、RVD およびその周辺アミノ酸を改変したライブラリーを作製し、B1H スクリーニングによって 5mC 選択的なユニットを選出することとした。

5mC を標的としたスクリーニングを行うにあたり、大腸菌が恒常的に発現している DNA メチル化酵素である Dcm メチラーゼに着目した[47]。この酵素は CCTGG 配列中の 2 番目の C をメチル化する。そこで、CCTGG を含む配列を標的とする TALE を設計した (Fig. 2-1) (以下この TALE を TAL_{Dcm} と表記する)。また、TALE は N 末端側に位置するユニットの方が、認識塩基ミスマッチによる影響を受けやすいことが知られている[48, 49]。そこで 5mC 認識に関わるユニットの影響を最大にするため、Dcm メチラーゼ認識配列を TAL_{Dcm} 標的配列の 5' 末端側に配置した。TAL_{Dcm} 標的配列を含むレポータープラスミドのメチル化状態を調べるため、スクリーニングに用いる大腸菌中からレポータープラスミドを回収し、非メチル化状態の CCTGG 配列を切断する制限酵素である PspGI による切断処理を行った後、電気泳動により切断パターンの解析を行った (Fig. 2-2A)。レポータープラスミドは PspGI によって切断されなかったことから、レポータープラスミドが大腸菌内で適切にメチル化されていることが示唆された。5mC 選択的なユニットを得るため、メチル化を受ける C を認識するユニットにあたるユニット 2 の RVD およびその前後の計 4 アミノ酸をランダム化したライブラリーを作製した (Fig. 2-1)。このライブラリーを用いて B1H スクリーニングを行ったところ、複数の変異体ユニットが得られた。しかし、得られた変異体ユニットの配列からは、特定の配列パターンを見出すこ

とは出来なかった (Fig. 2-3)。そこで、得られた全ての変異体ユニットの塩基選択性を、ルシフェラーゼレポーターアッセイによって個別に評価することにした。まず変異体ユニットを含む TAL_{Dcm} と転写活性化ドメインとの融合タンパク質を作製した。またルシフェラーゼ遺伝子のプロモーター部位に TAL_{Dcm} 標的配列を 3 コピー含むレポーターベクター 3×TAL_{Dcm}/pGL3 を作製した。3×TAL_{Dcm}/pGL3 を Dcm (-) および Dcm (+) の大腸菌から回収することで、非メチル化、メチル化状態のレポーターベクターを調製した (以下それぞれ C レポーター、5mC レポーターと表記する)。2つのレポーターベクターのメチル化状態は *PspGI* による切断によって確認を行った (Fig. 2-2B)。

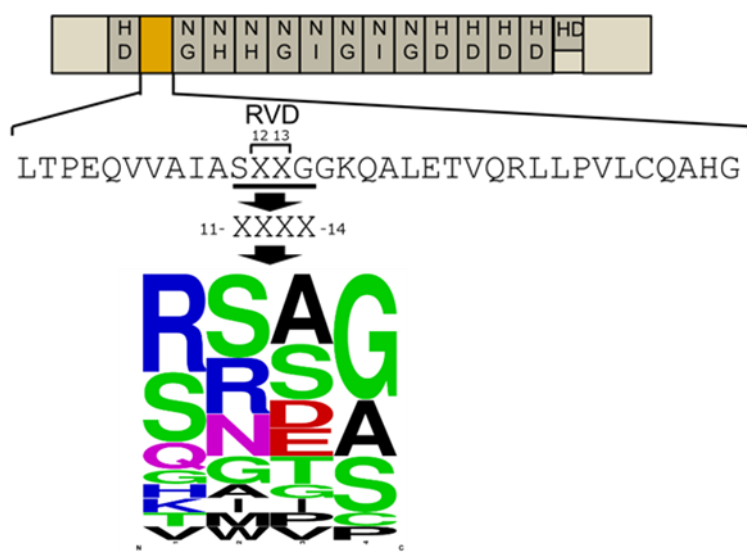


Fig. 2-3 Sequence logo of the RVD and their neighboring amino acid residues of TALE units selected by B1H screening. Any pattern was not identified from the logo.

変異体ユニットの評価に先立って、まず既存の TALE ユニットの 5mC 選択性をルシフェラーゼレポーターアッセイによって評価した (Fig. 2-4)。C 選択的であると報告されている RVD “HD” (ヒスチジン、アスパラギン酸) をもつユニット (以下“HD”ユニットと表記する) をユニット 2 に用いた場合、TAL_{Dcm} は 5mC レポーターよりも C レポーターに対してより高い活性を示した。一方、“NG”ユニットをユニット 2 に用いた場合には、C レポーターと 5mC レポーターに対する活性の違いはほとんど見られなかった。これらの結果は精製タンパク質を用いて行った Electrophoresis mobility shift assay (EMSA) の結果とも相関していた (Table 1)。以上の結果から “NG”ユニットのメチル化識別能は必ずしも高くないということが示された。

次に、変異体ユニットの 5mC 選択性をルシフェラーゼレポーターアッセイによって評価した (Fig. 2-5A)。変異体ユニットのうち “SWGG”、“RMAA”、“RNAA”、“QSAA”、“RIDS”、“QNSS”ユニットは、“NG”ユニットよりも高い 5mC 選択性があることがわかった。しかし、これらのユニットの活性は著しく低く、実用は難しいと考えられた。興味深いことに、高い 5mC 選択性を示した変異体ユニットのうち、3つの変異体“RMAA”、“RNAA”、“QSAA”ユニットにおいて、後半 2 残基が AA で共通していた。そこで次に、この共通配列である後半 2 残基の AA を固定し、前半 2 残基をランダム化した“XXAA”配列をもつライブラリーを作製し、B1H スクリーニングにより 5mC 選択的ユニットの選出を行った。スクリーニングから得られた変異体ユニットの 5mC 選択性をルシフェラーゼレポーターアッセイによって評価した結果、“AGAA”、“REAA”、“STAA”、“NSAA”、“CSAA”、“SAAA”、“NKAA”、“ASAA”変異体ユニットが高い 5mC 選択性を示した (Fig. 2-5B)。その中でも特に“ASAA”ユニットが最も高い活性を示した。“ASAA”ユニットはレポータープラスミドのメチル化の程度に比例してより高い活性を示したことから、メチル化依存的に標的シトシンを認識していることが示された (Fig. 2-6)。

さらに、“ASAA”ユニットの 5mC 選択性を EMSA によっても評価した (Table 2)。“ASAA”ユニットを含む TAL_{Dcm} は C 配列よりも 5mC 配列に対して 1.9 倍強い親和性を示した。一方、NG ユニットの含まれる TAL_{Dcm} の場合には、5mC 配列に対する親和性は C 配列の 1.2 倍の強さであったことから、“ASAA”ユニットが “NG”ユニットよりも高いメチル化識別能を有することが示された。

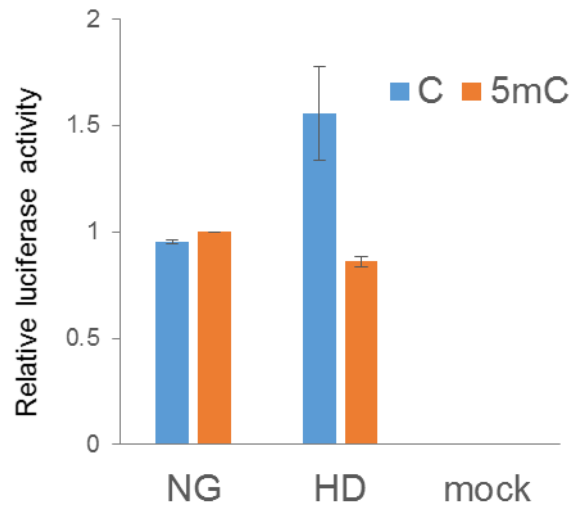


Fig. 2-4 Luciferase reporter activities of TAL_{Dcm} having RVD “NG” or “HD” at unit 2 position. Luciferase activities were normalized to that of RVD “NG” for the 5mC reporter. Data are expressed as means \pm SD. n = 3

Table 1 K_d values of 11.5TAL_{Dcm} having RVD “NG” or “HD” at unit 2 position to dsDNA containing a TAL_{Dcm} binding site with unmethylated or methylated cytosine.

Unit 2	K_d (nM) ^a		Relative K_d (C/5mC)
	C	5mC	
NG	95 \pm 23	74 \pm 36	1.2
HD	43 \pm 11	105 \pm 18	0.4

^a Determined by EMSA

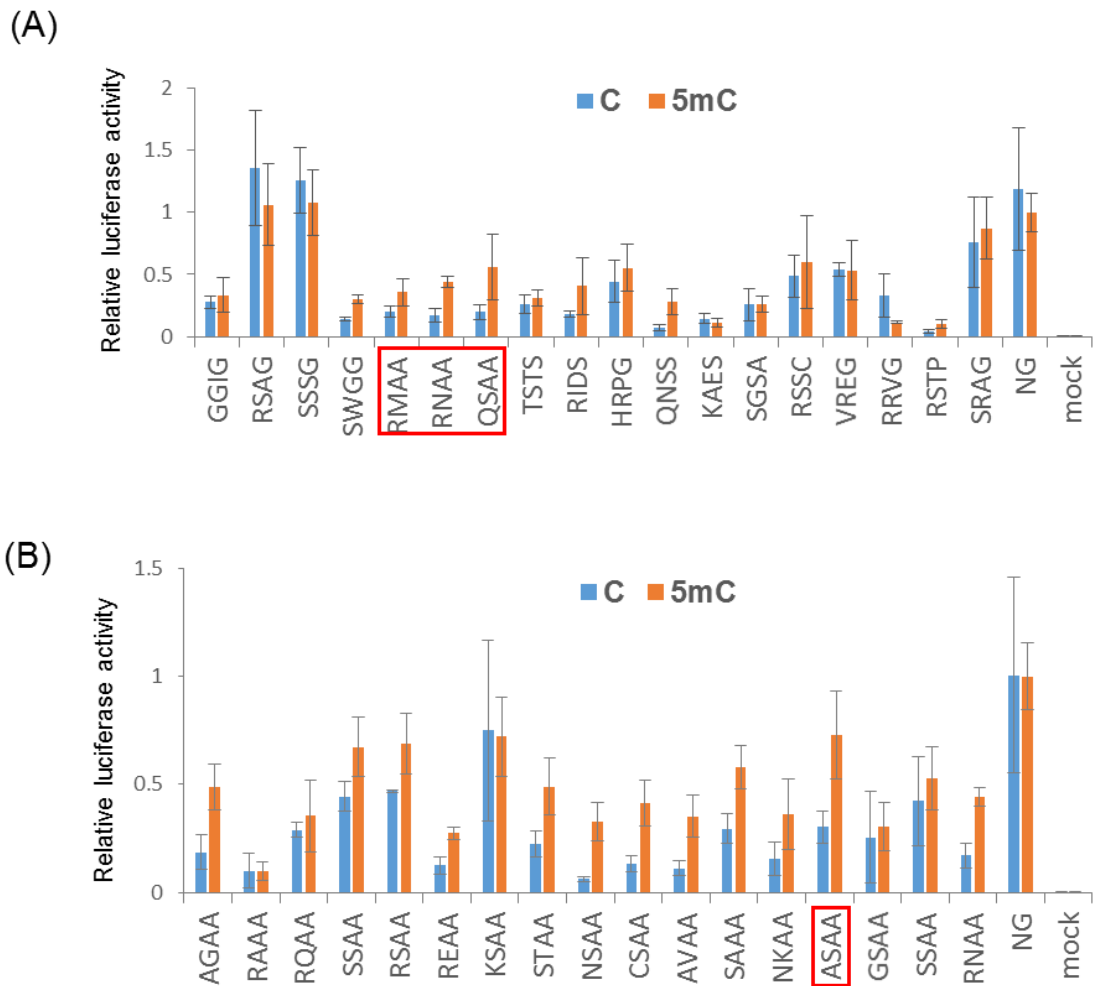


Fig. 2-5 Base specificities of the units selected by B1H screening. (A) Luciferase reporter activities of TAL_{Dcm} having the units identified from “XXXX” library for reporter vectors with C- or 5mC-binding sites. The red square indicates “XXAA” mutants. (B) Luciferase reporter activities of TAL_{Dcm} having the units identified from “XXAA” library for reporter vectors with C- or 5mC-binding sites. The red square indicates the “ASAA” unit. The activities were normalized to that of RVD “NG” for the 5mC reporter. Data are expressed as means \pm SD. n = 3.

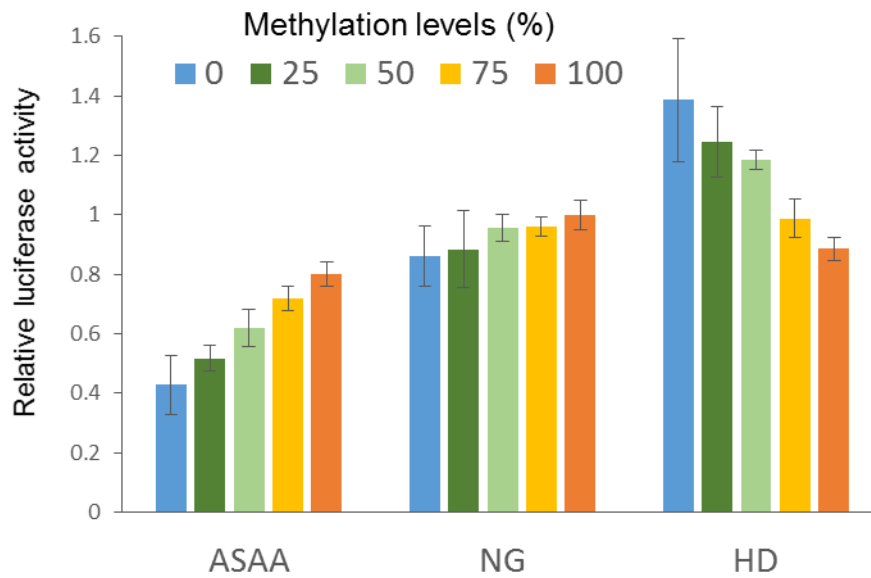


Fig. 2-6 Methylation-dependent transcriptional activation of TAL_{Dcm} with the “ASAA” unit, RVD “NG” or RVD “HD” at unit 2. Luciferase activities of TAL_{Dcm} for reporter vectors with different methylation percentages were examined. Each luciferase activities were normalized to that of TAL_{Dcm} with RVD “NG” for the 100 % methylated reporter. Reporter vectors were prepared by mixing C and 5mC reporters in the indicated ratios. Data are expressed as means \pm SD. n = 3.

Table 2 K_d values of 11.5 TAL_{Dcm} having the “ASAA” unit or RVD “HD” at unit 2 position to dsDNA containing a TAL_{Dcm} binding site with unmethylated or methylated cytosine.

Unit 2	K_d (nM) ^a		Relative K_d (C/5mC)
	C	5mC	
ASAA	235 \pm 10	121 \pm 20	1.9
NG	95 \pm 23	74 \pm 36	1.2

^a Determined by EMSA

第二節 人工ユニットを用いた内在遺伝子のメチル化状態依存的な活性化

哺乳類において、シトシンのメチル化は主に CpG ジヌクレオチド部位のシトシンで起こる。そこで、“ASAA”ユニットが CpG 配列中の 5mC を識別できるかどうかを調べるため、CpG を含む配列を標的とする TALE を設計し、EMSA によってその結合親和性を評価した (Fig. 2-7, Table 3)。5mC 識別ユニットとして NG ユニットを用いた場合には 5mC 配列と C 配列に対する結合親和性には差はほとんどみられなかった。一方、“ASAA”ユニットを用いた場合には、5mC 配列に対してより高い結合親和性を示した。これらのことから、“ASAA”ユニットは CpG 配列中の 5mC を識別する能力を有することがわかった。しかし、“ASAA”ユニットを 2 つ含む TALE の場合には、5mC 配列に対する選択性は見られなかった (Fig. 2-8, Table 4)。このことは、“ASAA”ユニットの結合親和性がそれほど高くないため、2 つのユニットを含むことで TALE 全体としての結合親和性が低くなりすぎてしまうことが原因だと考えられる。

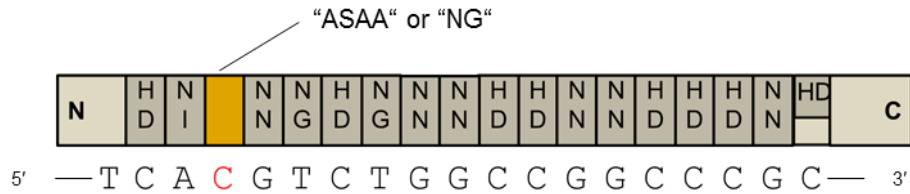


Fig. 2-7 The design of TALE that targets the sequence containing CpG. C or 5mC was used at the cytosine colored in red for EMSA.

Table 3 K_d values of TALEs having "ASAA" unit or RVD "NG" at unit 3 position to dsDNA containing the target sequence with unmethylated or methylated cytosine.

Unit 3	K_d (μM) ^a		Relative K_d (C/5mC)
	C	5mC	
ASAA	2.3 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.6
NG	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	1.1

^a Determined by EMSA

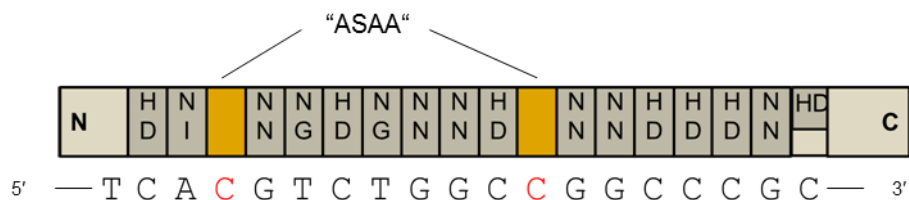


Fig. 2-8 The design of TALE that targets the sequence containing two CpGs. C or 5mC were used at the cytosines colored in red for EMSA.

Table 4 K_d values of a TALE containing two “ASAA” units to dsDNA containing the target sequence with unmethylated or methylated cytosines at the two CpG sites shown in (Fig. 2-8).

	K_d (μM) ^a		Relative K_d (C/5mC)
	C x 2	mC x 2	
ASAA x 2	2.1 ± 0.1	2.0 ± 0.1	1.0

^a Determined by EMSA

次に“ASAA”ユニットの内在ゲノム DNA への適用可能性を調べるため、内在遺伝子のメチル化状態依存的な転写活性化を試みた。*Ras association domain-containing protein2* (*RASSF2*) は癌抑制遺伝子のひとつであり、*RASSF2* タンパク質は癌細胞に対してアポトーシスを誘導する[50, 51]。*RASSF2* のプロモーター領域は多くの腸管癌細胞において高度にメチル化を受けていることから、癌診断のマーカーになり得ると考えられている[52]。SW480 と HCT116 細胞は異なる *RASSF2* プロモーターのメチル化状態をもつことが報告されている[50]。両細胞の *RASSF2* プロモーター領域のメチル化状態をバイサルファイトシーケンス法によって調べたところ、報告通り SW480 細胞においては高度にメチル化されており、HCT116 細胞ではほとんどメチル化されていないことがわかった (Fig. 2-9)。そこで、*RASSF2* プロモーター領域の CpG を含む部位を標的とした TALE を設計した (Fig. 2-10) (以下 TAL_{RASSF2} と表記する)。 TAL_{RASSF2} の標的配列への結合によって *RASSF2* 遺伝子を活性化させるために、 TAL_{RASSF2} に p300 ヒストンアセチルトランスフェラーゼを融合した。そして、 TAL_{RASSF2} -p300 融合タンパク質を SW480 および HCT116 細胞中に発現させ、*RASSF2* の発現量変化を RT-qPCR によって評価した。“ASAA”ユニットに関しては、メチル化された *RASSF2* プロモーターをもつ SW480 細胞に発現させた場合にのみ有意な転写活性化が生じた (Fig. 2-11A)。一方、“NG”ユニットに関しては、SW480 細胞と HCT116 細胞の両方で転写活性化が生じた (Fig. 2-11B)。このことから、“ASAA”ユニットが SW480 細胞中でのみ *RASSF2* の転写活性化を誘導したことは、細胞種の違いによるトランスフェクション効率の違いや、クロマチン構造の違いに由来するものではなく、“ASAA”ユニットによってメチル化配列選択的な TALE の結合が生じた結果であると考えられる。

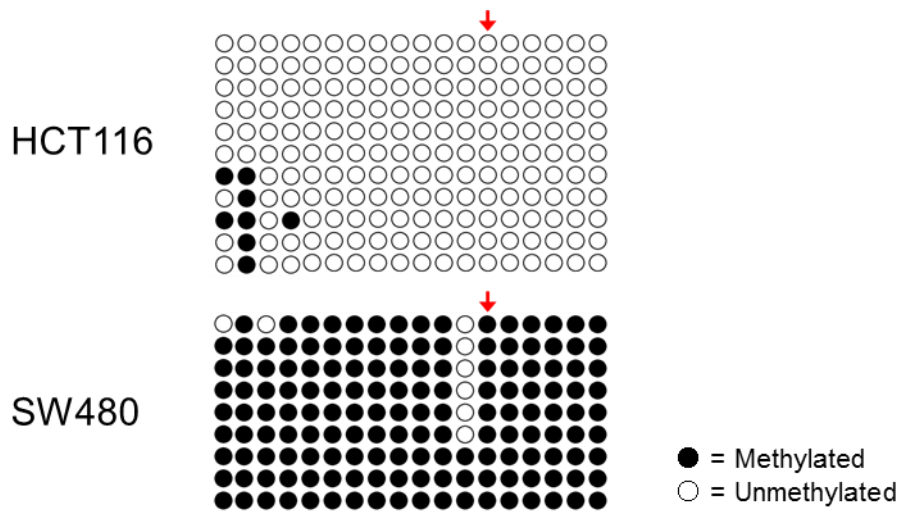


Fig. 2-9 Methylation status of the target region including TAL_{RASSF2} binding site. Data were obtained by bisulfite sequencing of the genome prepared from HCT116 or SW480 cells (HCT116; n=10, SW480; n=9). Red arrows indicate the CpG position targeted by TAL_{RASSF2} .

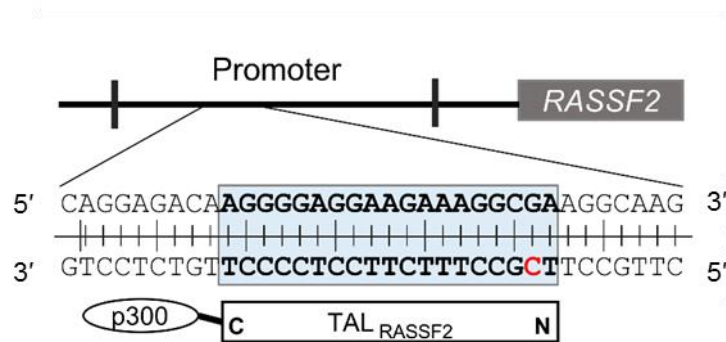
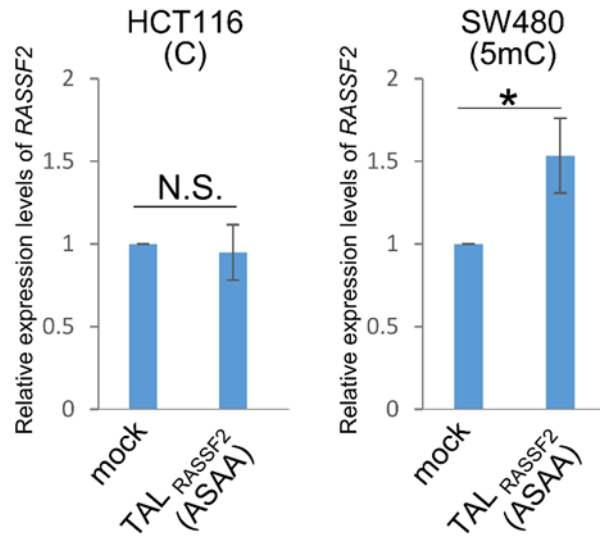


Fig. 2-10 Design of TAL_{RASSF2} -p300 that targets the *RASSF2* promoter region. The target sequence of TAL_{RASSF2} is highlighted with light blue. The target 5mC is colored in red.

(A)



(B)

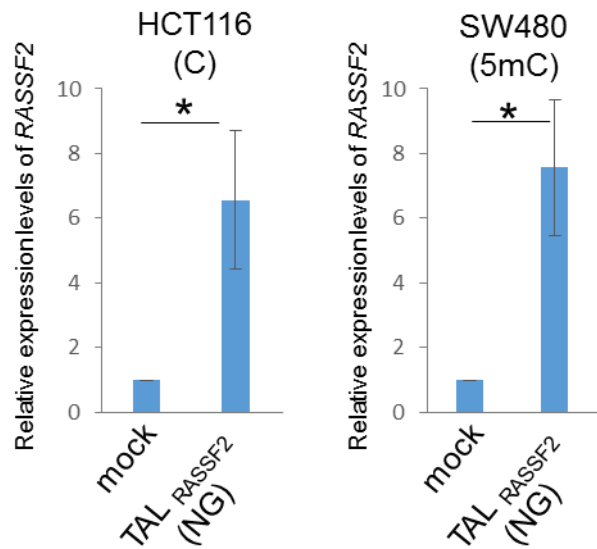


Fig. 2-11 Twenty-four hours after transfection of (A) TAL_{RASSF2}-p300 (“ASAA”) or (B) TAL_{RASSF2}-p300 (“NG”), relative expression levels of *RASSF2* mRNA in HCT116 and SW480 cells were examined by RT-qPCR. The expression levels were normalized to those of GAPDH. Data are expressed as means \pm SD. n = 3; *P < 0.05.

以上のように、本研究において Dcm メチラーゼを利用した B1H スクリーニングによって、高い 5mC 選択性をもつ人工 TALE ユニットの創製することができた。また、人工ユニットは内在ゲノム DNA に対しても高い 5mC 選択性を示した。スクリーニングによって高い選択性をもつユニットを得ることができた理由のひとつとして、アミノ酸ランダム化を RVD だけでなく、その周辺部位にまで拡張したことが考えられる。人工ユニットの結合親和性はそれほど高くはなく、改善の余地はあるが、本研究により TALE を生細胞中ゲノム DNA の任意の部位にメチル化状態依存的に結合させることが可能となった。メチル化依存的な結合能を有する TALE は、エピジェネティクス研究を進める上で強力なツールとなると考えられる。例えば、蛍光標識した TALE を用いることで個別の 5mC の状態変化を経時的に検出することが可能になる。また TALE を転写因子、ヌクレアーゼ、DNA 修飾酵素などと融合させることで、種々の遺伝子操作を標的部位のメチル化状態依存的に誘導することが可能になる。5mC の他にも生体内には様々な修飾塩基が存在するが、修飾塩基を選択的に認識する TALE ユニットの創出するという本研究の概念は、他の修飾塩基にも広く適用できる。本研究は 5mC および他の修飾塩基の生物学的機能について研究するための新たな手法を提供するものであると言える。

総括

本研究では、アミノ酸のランダム化と大腸菌によるスクリーニングを組み合わせた分子進化法を駆使することで、TALE タンパク質の機能改変に取り組んだ。第一章では、TALE の 5'末端塩基認識にリピート-1 中の W232 が重要な役割をもつことを示すと同時に、このリピート-1 に改変を施すことで 5'末端塩基に依存しない TALE を創製することに成功した。また第二章では、天然の TALE ユニットの改変を施すことで、5mC に高い選択性で結合する TALE ユニットの創製に成功した。また創製した人工ユニットを用いて、内在遺伝子をメチル化状態依存的に活性化することができた。これらを活用することで、これまで標的にできなかった配列に結合する TALE を設計できることから、本研究成果は TALE を利用した遺伝子改変技術、エピジェネティクス研究、遺伝子治療など多方面への応用が期待される。

実験の部

第一章に関する実験

TALE タンパク質のデザイン

dHax3(N241/C183)のアミノ酸配列は以下の通りである。

MPGSRTRLPSPPAPSPAFSADSFSDLLRQFDPSLFNTSLFDSLPPFGAHHTEAATGEWD
EVQSGLRADAPPPTMRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAAQVDLRTLGYSSQQQ
QEKIKPKVRSSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTAVVKYQDMIAALPEATHE
AIVGVGKQWSGARALEALLTVAGELRGPPLQLDTGQLLKIAKRGGVTAVEAVHAWRNAL
TGAPLN 242

LTPEQVVAIASSHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
LTPEQVVAIASSHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
LTPEQVVAIASSHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
LTPEQVVAIASNSGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
LTPEQVVAIASNSGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
LTPEQVVAIASSHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
LTPEQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
LTPEQVVAIASSHDGGKQALETVQRLLPVLCQAHG
LTPEQVVAIASNGGG 634

RPALESIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPALDAVKKGLPHAPALIKRTNRRRI
PERTSHRVADHAQVVRVLGFFQCHSHPAQAFDDAMTQFGMSRHGLLQLFRRVGVTELEA
RSGTLPPASQRWDRI LQASGMKRAKPSPTSTQTPDQASLHAFADSLERDL DAPS PMHEG
DQTRAS 817

_____ = リピート-1 ランダム化部位

===== = RVDs

プラスミドベクターの作製

1. dHax3(N241/C183)発現ベクター; dHax3(N241/C183)/pCMVt

pLenti-EF1a-Backbone(NG) (Addgene plasmid 27963) をテンプレートに用い、dHax3
のN末端ドメイン 241 アミノ酸 (AA: 48–288)、C末端ドメイン 183 アミノ酸
(AA: 678–860)、およびその下流に位置する核移行シグナル、転写活性化ドメイ

ン (VP64) をコードする塩基配列部位を PCR 法により増幅した[24, 53]。増幅した断片を、哺乳類細胞において強発現を誘導する CMV プロモーターを含む pCMV-AD (Stratagene) ベクター中の *Bam*HI, *Kpn*I サイトに挿入した。このベクターの *Nhe*I, *Stu*I サイトに、11.5 繰り返しユニット領域をコードする塩基配列を挿入して dHax3(N241/C183)/pCMVt を作製した。11.5 繰り返しユニット領域は Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit 2.0 (Addgene Kit # 1000000024) により dHax3 と同じ RVD を持つユニットをコードする塩基配列を連結することで作製した[24]。また W232 の点変異導入は High-Fidelity DNA polymerase (New England Biolabs) を用いて QuikChange Site-Directed Mutagenesis 法により行った。

2. ルシフェラーゼレポーターベクター

5'末端塩基が T/A/G/C のいずれかである dHax3 結合配列を含むオリゴ DNA (operon) を相補鎖とアニーリングさせた後、pGL3 (Promega) ベクターの *Sac*I, *Spe*I サイトに挿入することで作製した。

3. ω- dHax3(N241/C183)発現ベクター; dHax3(N241/C183)/pB1H2W5

dHax3(N241/C183) をコードする配列を B1H expression vector pB1H2W5-Prd (Addgene plasmid 18039) 中の *Kpn*I, *Xba*I サイトに挿入することで、dHax3(N241/C183)の N 末端に ω サブユニットが融合したタンパク質を大腸菌で発現するベクターdHax3(N241/C183)/pB1H2W5 を作製した。

4. B1H レポーターベクター

5'末端塩基が A, C のいずれかである dHax3 結合配列を含むオリゴ DNA (operon) を相補鎖とアニーリングさせた後、pH3U3-mcs (Addgene plasmid 12609) の *Not*I, *Eco*RI サイトに挿入することで作製した。

全てのプラスミドの配列は ABI PRISM 3130 genetic analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析し、正しく作製できていることを確認した。

リピート-1 ライブラリーの構築

dHax3(N241/C183)/pCMVt をテンプレートとし、mix 塩基を含むプライマーを用いた PCR 法により、230K-233S 部分をコードする塩基を NNSNNSNNSNNS (S=G/C) と置換したリピート-1 をコードする DNA 断片を得た。この断片を dHax3(N241/C183)/pB1H2W5 の *Bsa*I, *Asc*I サイトに挿入した。得られたベクターを NEB10β Electrocompetent *E. coli* (New England Biolabs) にエレクトロポレーション法を用いて形質転換した。形質転換が起こった大腸菌コロニー約 5.0×10^6 個を集菌し、LB 培地中 37 °C で一晚培養した後に、菌液からプラスミドを回収したものをリピート-1 ライブラリー、Library-dHax3(N241/C183)/pB1H2W5、として用いた。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

TALE 発現ベクター (150 ng)、ルシフェラーゼレポーターベクター (200 ng)、コントロールベクター (pRL-TK; Promega) (50 ng)、を HeLa 細胞に同時にトランスフェクションした。トランスフェクションは Lipofectamine LTX (Life Technologies) を用い、推奨プロトコールに従って行った。トランスフェクション後 24 時間のルシフェラーゼ活性を Dual luciferase reporter system (Promega) を用いて測定した。

Bacterial one-hybrid (B1H) スクリーニング

Library-dHax3(N241/C183)/pB1H2W5 と pH3U3 レポーターベクターを大腸菌 USO 株 *hisB⁻ pyrF⁻ rpoZ⁻* (Addgene 18049) に同時に形質転換した。B1H screening は[27]に記載の方法に従って行った。実験は NM 培地にカナマイシン (25 µg/ml)、カルベニシリン (100 µg/ml)、3-アミノトリアゾール (5 mM)、Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) (10 µM) を含む条件で行った。形質転換した大腸菌の NM 培地での培養は 37 °C で 48~72 時間行った。生存大腸菌がもつプラスミドの塩基配列を解析し、リピート-1 のアミノ酸配列パターンは sequence logo を用いて表した[54]。

第二章に関する実験

プラスミドベクターの作製

1. TAL_{Dcm} 発現ベクター; TAL_{Dcm}/pCMVt

まず、pNG2 vector (Addgene Kit #1000000024) 中の RVD をコードする塩基配列付近に *MfeI* と *HindIII* の認識配列を QuikChange site directed mutagenesis 法により導入し、pNG⁺ベクターを作製した[24]。その後、pNG2 の代わりに pNG2⁺を用いて、Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit 2.0 (Addgene Kit #1000000024) により TAL_{Dcm} の各リピートをコードする塩基配列を連結し、pCMVt vector に挿入することで TAL_{Dcm}/pCMVt を得た[24]。

2. ルシフェラーゼレポーターベクター

TAL_{Dcm} 結合配列を含むオリゴ DNA (eurofins) を相補鎖とアニーリングさせた後、pGL3 (Promega) ベクターの *SacI*, *SpeI* サイトに挿入することで作製した。

3. ω-TAL_{Dcm} 発現ベクター; TAL_{Dcm}/pB1H2W5

TAL_{Dcm} をコードする配列を pB1H2W5-Prd (Addgene plasmid 18039) 中の *KpnI*, *XbaI* サイトに挿入した。これにより、大腸菌中で TAL_{Dcm} の N 末端に ω サブユニットが融合したタンパク質を発現するベクター、TAL_{Dcm}/pB1H2W5 を得た。

4. B1H レポーターベクター ; TAL_{Dcm}/pH3U3

TAL_{Dcm} 結合配列を含むオリゴ DNA (eurofins) を相補鎖とアニーリングさせた後、pH3U3-mcs (Addgene plasmid 12609) の *NotI*, *EcoRI* サイトに挿入することで TAL_{Dcm}/pH3U3 を得た。

5. 11.5TAL_{Dcm} 大腸菌発現ベクター ; N-His 11.5TAL_{Dcm}/pET42b

pET42b (Novagen) の *NdeI*, *HindIII* サイトに His-tag をコードする配列および *XmaI*, *NheI* サイトを含む合成オリゴ DNA (5'-TATGCACCATCACCATCACCAC CCCGGGGTAGGAGCTAGCTGAA-3') (Invitrogen) を挿入した。次に TAL_{Dcm} コード配列を上で導入した *XmaI*, *NheI* サイトに挿入することで N-His 11.5TAL_{Dcm}/pET42b を作製した。

6. TAL_{RASSF2}-p300 融合タンパク質発現ベクター ; TAL_{RASSF2}-p300/pCMVt

TAL_{RASSF2} 発現プラスミドを Golden Gate TALEN and TAL Effector Kit 2.0 (Addgene Kit # 1000000024) により作製した。さらに、pcDNA3.1-p300 (Addgene plasmid 23252) 中の p300 アセチルトランスフェラーゼをコードする配列を PCR 法で増幅し、TAL_{RASSF2} をコードする配列下流の *BspEI*, *SexAI* サイトに挿入することで TAL_{RASSF2}-p300/pCMVt を得た。

プラスミドライブラリーの調製

合成オリゴ DNA (5'-CAATTGCCNNSNNSNNSNNSGGCAAGCAAGCTT-3' S=C/G) を相補鎖とアニーリングさせた後、TAL_{Dcm}/pB1H2W5 の *MfeI*, *HindIII* サイトに挿入した。得られたベクターを NEB10β Electrocompetent *E. coli* (New England Biolabs) にエレクトロポレーション法を用いて形質転換した。形質転換が起こった大腸菌コロニー約 5.0×10^6 個を集菌し、LB 培地中 37 °C で 1 時間培養した後に、菌液からプラスミドを回収して“XXXX”-library を作製した。“XXAA”-library は、合成オリゴ DNA (5'-CAATTGCCNNSNNSGCGGCCGCAAGCAAGCTT-3') を用いて、“XXXX”-library と同様の方法で作製した。

プラスミドレポーターのメチル化状態の確認

3×TAL_{Dcm}/pGL3-mTK を、ECOS Competent *E. coli* DH5α (ニッポンジーン) もしくは *dam*⁻/*dcm*⁻ Competent *E. coli* (New England Biolabs) に形質転換した。それぞれを LB 培地中で培養後、集菌しプラスミドを回収することで、TAL_{Dcm} 標的配列がメチル化、あるいは非メチル化状態の 3×TAL_{Dcm}/pGL3-mTK を調製した。両プラスミドを *BamHI* (New England Biolabs) で切断し線状化した後、メチル化感受性の制限酵素 *PspGI* (New England Biolabs) で切断し、アガロースゲルで電気泳動することで、メチル化状態を確認した。メチル化割合の異なるルシフ

ェラーゼレポーターベクターはメチル化、非メチル化プラスミドを各割合で混合することで調製した。

ルシフェラーゼレポーターアッセイ

TALE 発現ベクター (150 ng)、ルシフェラーゼレポーターベクター (200 ng)、コントロールベクター (pRL-TK; Promega) (50 ng)、を HeLa 細胞に同時にトランスフェクションした。トランスフェクションは Lipofectamine LTX (Life Technologies) を用い、推奨プロトコールに従って行った。トランスフェクション後 24 時間のルシフェラーゼ活性を Dual luciferase reporter system (Promega) を用いて測定した。

Bacterial one-hybrid (B1H) スクリーニング

“XXXX” library もしくは “XXAA” library と pH3U3 レポーターベクターを大腸菌 USO 株 hisB⁻ pyrF⁻ rpoZ⁻ (Addgene 18049) に同時に形質転換した。B1H screening は[27]に記載の方法に従って行った。実験は NM 培地にカナマイシン (25 µg/ml)、カルベニシリン (100 µg/ml)、3-アミノトリアゾール (5 mM)、IPTG (10 µM) を含む条件で行った。形質転換した大腸菌の NM 培地での培養は 37°C で 72 時間行った。生存大腸菌がもつプラスミドの塩基配列を確認し、ランダム化を導入した部位のアミノ酸配列パターンを sequence logo [54]を用いて表した。

Electrophoresis mobility shift assay (EMSA)

・タンパク質発現及び精製

TALE 発現用 pET42 ベクターを大腸菌 BL21(DE3)株に塩化カルシウム法で形質転換した後、0.2 mM IPTG 存在下、18 °C で 12 時間培養した。集菌後、Buffer A (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 2 mM sodium azide, pH 8.0) 中で超音波破碎後、可溶性画分をアフィニティークロマトグラフィーによって精製した [カラム: HisTrap HP (GE Healthcare)、溶出液 A : 20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 5 mM イミダゾール, 2 mM sodium azide, pH 8.0、溶出液 B : 20 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 500 mM imidazole, 2 mM sodium azide, pH 8.0]。得られたタンパク質は更に、ヘパリンカラムによって精製した [カラム: HiTrap Heparin HP (GE Healthcare)、溶出液 C : 10 mM NaH₂PO₄, 2 mM sodium azide, pH 7.4、溶出液 D : 10 mM NaH₂PO₄, 2 M NaCl, 2 mM sodium azide, pH 7.4]。最後にゲル濾過クロマトグラフィーによって精製した [カラム: Superdex 75 (GE Healthcare)、溶出液 E : 480 mM KCl, 1.6 mM EDTA, 2 mM DTT, 12 mM Tris-HCl, pH 7.5]。タンパク質純度は SDS-PAGE によって確認し、タンパク質濃度は 280 nm の吸光度を測定することで算出した。

- ・ 標的 DNA 断片の調製

用いた DNA 断片は次のように調製した。標的 DNA 配列を含むオリゴ DNA 及び 5'末端を 6-FAM でラベルした相補配列を終濃度 100 nM となるように純水で溶解した後、95 °C で 10 分間加温し、その後 90 分かけて 30 °C まで冷却しアニールさせた。使用した DNA 配列は以下の通りである。

TAL_{Dcm} 標的 DNA

Fwd: 5'-CCGCGGCCGCTCX (C or 5mC) TGGTATATCCCCCGAGGAGTTCG-3'
(5'末端に 6-FAM ラベルしたものを使用した)

Rev: 3'-CGAACTCCTCGGGGGATATAACCAGGAGCGGCCGCGG-5'

TAL_{RASSF2} 標的 DNA

Fwd: 5'-CTCAGCAGTX (C or 5mC) GCCTTTCTTCCTCCCCTTCGTTAGC-3'
(5'末端に 6-FAM ラベルしたものを使用した)

Rev: 3'-GCTAACGAAGGGGAGGAAGAAAGGX (C or 5mC) GACTGCTGAG-5'

- ・ EMSA による結合親和性の評価

TALE の結合反応は、12 mM Tris-HCl、60 mM KCl、2 mM DTT、2.5% グリセロール、5 mM MgCl₂、100 µg/mL BSA、200 µM EDTA、0.05 % NP40、25 ng/µL poly(dI-dC)(dI-dC) double strand を含む反応液中で 2.5 nM の FITC 標識 DNA 断片と 25 °C で 30 分間インキュベーションすることにより行った。結合反応後、溶液を 4 °C で 30 分間インキュベーションした後、1/2 TAE 緩衝液中で 1.3% アガロースゲルを用いて 4 °C で 20 分間電気泳動し、タンパク質と結合している DNA と遊離 DNA とを分離した。泳動後のゲルは Typhoon FLA 9500 (GE Healthcare) を用いて撮影し、Image J software (NIH) および、カレイダグラフ (Synergy Software) を用いて解析した。

バイサルファイトシーケンシング

ゲノム DNA は NucleoSpin Tissue (タカラバイオ) により回収した。バイサルファイト反応は EZ-DNA Methylation-Gold Kit (ZYMO research) を用いて、推奨プロトコールに従って行った。バイサルファイト変換後の DNA を Zymo Taq DNA polymerase (ZYMO research) を用いて PCR 法によって増幅し、TOPO TA vector (Thermo Fisher Scientific) に挿入した。挿入配列の塩基配列を確認し、QUMA ソフトウェアによって解析した[55]。

TAL_{RASSF2}-p300 のトランスフェクションと RT-qPCR

TAL_{RASSF2}-p300 発現ベクターを HCT116、SW480 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションはそれぞれ Lipofectamine 3000 (Life Technologies)、

Lipofectamine LTX (Life Technologies) を用い、推奨プロトコールに従って行った。24 時間後、トータル RNA を NucleoSpin RNA (タカラバイオ) を用いて回収した。500 ng のトータル RNA を鋳型として、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (タカラバイオ) を用いて cDNA に逆転写した。定量 PCR は PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。測定には 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific) を用い、コントロール遺伝子として *Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase* (*GAPDH*) を用いた。使用したプライマーは以下の通りである。

RASSF2

Fwd: 5'-AGAATGGACTACAGCCACCAAAC-3'

Rev: 5'-CACAATGAACTCGTCTTCTTCCTC-3'

GAPDH

Fwd: 5'-CCTGTTCGACAGTCAGCCG-3'

Rev: 5'-CGACCAAATCCGTTGACTCC-3'

タンパク質のデザイン

TAL_{Dcm} の配列は以下の通りである。

MDPIRPRRPS PARELLPGPQPDRVQPTADRGVSA PAPSPLDGLPARRTVSRTRLPSPPA
PSPAFSAGSFS DLLRPFDPSSLDTSSLDSMPAVGTPHTAAAPAEWDEAQSALRAADDP
PTVRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDAS PAAQVDLRTLGYSSQQQEKIKPKVRS
TVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVTYQHIITALPEATHEDIVGVGKQW
SGARALEALLTDAGELRGPPLQLDTGQLVKIAKRGGVTAMEAVHASRNALTGAPLN
LTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIAxxxxGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIASNHGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIASNHGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIASNIGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIASNGGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHG
LTPDQVVAIASHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHG

HRVADYAQVVRVLEFFQCHSHPAYAFDEAMTQFGMSRNLVQLFRRVGVTELEARGGTL
PPASQRWDRI LQASGMKRAKPSPTSAQTPDQASLHASSRD*

_____ = Randomized region of repeat 2
===== = RVDs
..... = FLAG-tag
~~~~~ = His-tag

11.5TAL<sub>Dcm</sub> の配列は以下のとおりである。

MHHHHHHELRLRTPSPAPSPAFSAGSFSDLLRPFDPSSLDTSSLDSMPAVGTPHTAAA  
PAEWDEAQ SALRAADDPPTVRVAVTAARPPRAKPAPRRRAAQPSDASPAAQVDLRTL  
YSQQQQEKIKPKVRSSTVAQHHEALVGHGFTHAHIVALSQHPAALGTVAVTYQHIIT  
ALPEATHEDIVGVGKQWSGARALEALLTDAGELRGPPLQLDTGQLVKIAKRGV  
TAMEAVHASRNALTGAPLN

LTPDQVVAIASSHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHG  
LTPDQVVAIAASxxxxGKQALETVQRLLPVLCQDHG  
LTPDQVVAIASSNGKGKQALETVQRLLPVLCQDHG  
LTPDQVVAIASNHGKGKQALETVQRLLPVLCQDHG  
LTPDQVVAIASNHGKGKQALETVQRLLPVLCQDHG  
LTPDQVVAIASSNGKGKQALETVQRLLPVLCQDHG  
LTPDQVVAIASNIGKGKQALETVQRLLPVLCQDHG  
LTPDQVVAIASSNGKGKQALETVQRLLPVLCQDHG  
LTPDQVVAIASNIGKGKQALETVQRLLPVLCQDHG  
LTPDQVVAIASSNGKGKQALETVQRLLPVLCQDHG  
LTPDQVVAIASSHDGGKQALETVQRLLPVLCQDHG  
LTPDQVVAIASSHDGGKQALE

SIVAQLSRPDPALAALTNDHLVALACLGGRPAMDAVKKGLPHAPELIRRVRNRRIGERTS  
HRVADYAQVVRVLEFFQCHSHPAYAFDEAMTQFGMSRNLVQLFRRVGVTELEARGGTL  
PPASQRWDRI LQASGMKRAKPSPTSAQTPDQASLHASLHAFADSLERDL DAPS  
PMHEGDQTRAS\*

\_\_\_\_\_ = ASAA, SNGG, or SHDD  
===== = RVDs  
~~~~~ = His-tag

TAL_{RASSF2-p300} の配列は以下のとおりである。

CDLMDGRDAFLTLARDKHLEFSSLRRAQWSTMCMLVELHTQSQDYPYDVPDYA*

_____ = ASAA or SNGG

===== = RVDs

..... = NLS

----- = p300 histone acetyltransferase

~~~~~ = HA tag

## 引用文献

- 1 B. W. Matthews, D. H. Ohlendorf, W. F. Anderson and Y. Takeda, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982, 79, 1428.
- 2 T. E. Ellenberger, C. J. Brandl, K. Struhl and S. C. Harrison, *Cell*, 1992, 71, 1223.
- 3 N. P. Pavletich and C. O. Pabo, *Science*, 1991, 252, 809.
- 4 C. O. Pabo, E. Peisach and R. A. Grant, *Annu. Rev. Biochem.*, 2001, 70, 313.
- 5 C. L. Ramirez, J. E. Foley, D. A. Wright, F. Müller-Lerch, S. H. Rahman, T. I. Cornu, R. J. Winfrey, J. D. Sander, F. Fu, J. A. Townsend, T. Cathomen, D. F. Voytas and J. K. Joung. *Nat. Methods*, 2008, 5, 374.
- 6 M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna and E. Charpentier, *Science*, 2012, 337, 816.
- 7 J. D. Sander and J. K. Joung, *Nat. Biotechnol.*, 2014, 32, 347.
- 8 S. Konermann, M. D. Brigham, A. E. Trevino, J. Joung, O. O. Abudayyeh, C. Barcena, P. D. Hsu, N. Habib, J. S. Gootenberg, H. Nishimasu, O. Nureki and F. Zhang, *Nature*, 2015, 517, 583.
- 9 I. B. Hilton, A. M. D'Ippolito, C. M. Vockley, P. I. Thakore, G. E. Crawford, T. E. Reddy and C. A Gersbach, *Nat. Biotechnol.*, 2015, 33, 510.
- 10 Y. Fu, J. A. Foden, C. Khayter, M. L. Maeder, D. Reyon, J. K. Joung and J. D. Sander, *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31, 822.
- 11 M. J. Moscou and A. J. Bogdanove, *Science*, 2009, 326, 1501.
- 12 A. J. Bogdanove and D. F. Voytas, *Science*, 2011, 333, 1843.
- 13 T. Gaj, C. A. Gersbach and C. F. Barbas 3rd, *Trends Biotechnol.*, 2013, 31, 397.
- 14 A. N. Mak, P. Bradley, R. A. Cernadas, A. J. Bogdanove and B. L. Stoddard, *Science*, 2012, 335, 716.
- 15 J. K. Joung and J. D. Sander, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2013, 14, 49.
- 16 C. Y. Park, J. Kim, J. Kweon, J. S. Son, J. S. Lee, J. E. Yoo, S. R. Cho, J. H. Kim, J. S. Kim and D. W. Kim, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, 111, 9253.
- 17 J. P. Guilinger, V. Pattanayak, D. Reyon, S. Q. Tsai, J. D. Sander, J. K. Joung and D. R. Liu, *Nat. Methods*, 2014, 11, 429.
- 18 Y. Miyazari, C. Z. Birling and M. E. T. Padilla, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 2013, 20, 1321.
- 19 H. Ma, P. Reyes-Gutierrez and T. Pederson, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110, 21048.
- 20 J. Boch, H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt and U. Bonas, *Science*, 2009, 326, 1509.
- 21 P. Romer, S. Recht, T. Strauss, J. Elsaesser, S. Schornack, J. Boch, S. Wang and T. Lahaye, *New*

- Phytol.*, 2010, 187, 1048.
- 22 D. Deng, C. Yan, X. Pan, M. Mahfouz, J. Wang, J. K. Zhu, Y. Shi and N. Yan, *Science*, 2012, 335, 720.
  - 23 M. M. Mahfouz, L. Li, M. Shamimuzzaman, A. Wibowo, X. Fang and J. K. Zhu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2011, 108, 2623.
  - 24 F. Zhang, L. Cong, S. Lodato, S. Kosuri, G. M. Church and P. Arlotta, *Nat. Biotechnol.*, 2011, 29, 149.
  - 25 A. N. Mak, P. Bradley, A. J. Bogdanove and B. L. Stoddard, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2013, 23, 93.
  - 26 M. B. Noyes, X. Meng, A. Wakabayashi, S. Sinha, M. H. Brodsky and S. A. Wolfe, *Nucleic Acids Res.*, 2008, 36, 2547.
  - 27 M. B. Noyes, *Methods Mol. Biol.*, 2012, 78, 679.
  - 28 O. de Lange, T. Schreiber, N. Schandry, J. Radeck, K. H. Braun, J. Koszinowski, H. Heuer, A. Strauss and T. Lahaye, *New Phytol.*, 2013, 199, 773.
  - 29 J. A. Law and S. E. Jacobsen, *Nat. Rev. Genet.*, 2010, 11, 204.
  - 30 Z. D. Smith and A. Meissner, *Nat. Rev. Genet.*, 2013, 14, 204.
  - 31 S. E. Brown, M. F. Fraga, I. C. G. Weaver, M. Berdasco and M. Szyf, *Epigenetics*, 2007, 2, 54.
  - 32 G. Egger, G. Liang, A. Aparicio and P. A. Jones, *Nature*, 2004, 429, 457.
  - 33 S. J. Cokus, S. Feng, X. Zhang, Z. Chen, B. Merriman, C. D. Haudenschild, S. Pradhan, S. F. Nelson, M. Pellegrini and S. E. Jacobsen, *Nature*, 2008, 452, 215.
  - 34 F. Santos, B. Hendrich, W. Reik and W. Dean, *Dev. Biol.*, 2002, 241, 172.
  - 35 S. Kobayakawa, K. Miike, M. Nakao and K. Abe, *Genes Cells*, 2007, 12, 447.
  - 36 C. Desjobert, M. E. Maï, T. Gérard-Hirne, D. Guianvarc'h, A. Carrier, C. Pottier, P. B. Arimondo and J. Rioud, *Epigenetics*, 2015, 10, 82.
  - 37 D. Deng, P. Yin, C. Yan, X. Pan, X. Gong, S. Qi, T. Xie, M. Mahfouz, J. K. Zhu, N. Yan and Y. Shi, *Cell Res.*, 2012, 22, 1502.
  - 38 J. Valton, A. Dupuy, F. Daboussi, S. Thomas, A. Marechal, R. Macmaster, K. Melliand, A. Juillerat and P. Duchateau, *J. Biol. Chem.*, 2012, 287, 38427.
  - 39 G. Kubik, M. J. Schmidt, J. E. Penner and D. Summerer, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2014, 53, 6002.
  - 40 G. Kubik and D. Summerer, *ChemBioChem*, 2015, 16, 228.
  - 41 G. Kubik, S. Batke and D. Summerer, *J. Am. Chem. Soc.*, 2015, 137, 2.
  - 42 J. Yang, Y. Zhang, P. Yuan, Y. Zhou, C. Cai, Q. Ren, D. Wen, C. Chu, H. Qi and W. Wei, *Cell Res.*, 2014, 24, 628.
  - 43 A. Juillerat, C. Pessereau, G. Dubois, V. Guyot, A. Marechal, J. Valton, F. Daboussi, L. Poirot, A. Duclert and P. Duchateau, *Sci. Rep.*, 2015, 5, 8150.
  - 44 J. C. Miller, L. Zhang, D. F. Xia, J. J. Campo, I. V. Ankoudinova, D. Y. Guschin, J. E. Babiarz,

- X. Meng, S. J. Hinkley, S. C. Lam, D. E. Paschon, A. I. Vincent, G. P. Dulay, K. A. Barlow, D. A. Shivak, E. Leung, J. D. Kim, R. Amora, F. D. Urnov, P. D. Gregory and E. J. Rebar, *Nat. Methods*, 2015, 12, 465.
- 45 B. M. Lamb, A. C. Mercer and C. F. Barbas 3rd, *Nucleic Acids Res.*, 2013, 41, 9779.
- 46 B. P. Hubbard, A. H. Badran, J. A. Zuris, J. P. Guilinger, K. M. Davis, L. Chen, S. Q. Tsai, J. D. Sander, J. K. Joung and D. R. Liu, *Nat. Methods*, 2015, 12, 939.
- 47 B. R. Palmer and M. G. Marinus, *Gene*, 1994, 143, 1.
- 48 J. F. Meckler, M. S. Bhakta, M.-S. Kim, R. Ovadia, C. H. Habrian, A. Zykovich, A. Yu, S. H. Lockwood, R. Morbitzer, J. Elsaesser, T. Lahaye, D. J. Segal and E. P. Baldwin, *Nucleic Acids Res.*, 2013, 41, 4118.
- 49 A. Juillerat, G. Dubois, J. Valton, S. Thomas, S. Stella, A. Marechal, S. Langevin, N. Benomari, C. Bertonati, G. H. Silva, F. Daboussi, J. C. Epinat, G. Montoya, A. Duclert and P. Duchateau, *Nucleic Acids Res.*, 2014, 42, 5390.
- 50 K. Akino, M. Toyota, H. Suzuki, H. Mita, Y. Sasaki, M. Ohe-Toyota, J. P. J. Issa, Y. Hinoda, K. Imai and T. Tokino, *Gastroenterology*, 2005, 129, 156.
- 51 W. N. Cooper, L. B. Hesson, D. Matallanas, A. Dallol, A. von Kriegsheim, R. Ward, W. Kolch and F. Latif, *Oncogene*, 2009, 28, 2988.
- 52 J. Shi, G. Zhang, D. Yao, W. Liu, N. Wang, M. Ji, N. He, B. Shi and P. Hou, *Am. J. Cancer Res.*, 2012, 2, 116.
- 53 R. R. Beerli, D. J. Segal, B. Dreier and C. F. Barbas 3rd, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 14628.
- 54 T. D. Schneider and R. M. Stephens, *Nucleic Acids Res.*, 1990, 18, 6097.
- 55 Y. Kumaki, M. Oda and M. Okano, *Nucleic Acids Res.*, 2008, 36, W170.

## 謝辞

終わりに臨み、終始御懇篤なる御指導ならびに御鞭撻を賜りました京都大学化学研究所 二木 史朗 教授に謹んで感謝の意を表します。

数々の御指導、御助言を頂きました 今西 未来 博士（京都大学化学研究所 講師）、河野 健一 博士（京都大学化学研究所 助教）、中瀬 生彦 博士（大阪府立大学ナノ科学・材料研究センター 特別講師）、武内 敏秀 博士（大阪大学大学院医学系研究科 寄附講座講師）に深く感謝致します。

本研究を行うにあたりまして細胞を御供与頂きました 鈴木 拓 博士（札幌医科大学医学研究科 教授）に心より感謝申し上げます。

折りに触れ、活発なご討議を戴き、研究以外の面でも大変御世話になりました 田中 弦 博士（杏林大学医学部 助教）東 佑翼 博士（スイス連邦工科大学チューリッヒ校）、能代 大輔 博士（金沢大学理工研究域）、広瀬 久昭 博士（東京大学理学研究科）、Yu Hao-Hsin 博士（ScinoPharm Taiwan）、片山沙綾香 博士（旭化成）、奥 彰彦 博士（アストラゼネカ）、川口 祥正 博士（塩野義製薬）及び京都大学化学研究所 生体機能設計化学研究領域の皆様心より感謝致します。

本研究の一部は日本学術振興会の援助によるものであり、あらためて感謝いたします。

最後に、私が研究の未知に進むことを理解し、惜しみないご支援を下された父、母、友人達に、この場をお借りして心から感謝致します。