

(続紙 1)

京都大学	博士（薬学）	氏名	森崎達也
論文題目	マルチ亜鉛フィンガータンパク質の細胞内挙動に関する研究		
(論文内容の要旨)			
序論			
C₂H₂ 型亜鉛フィンガーモチーフは転写因子の代表的な DNA 結合ドメインとして知られ、その優れた結合特性からこれまで種々の標的 DNA への結合を目指した様々な人工亜鉛フィンガータンパク質が創製されてきた。なかでも複数のフィンガーモチーフを連結させたマルチ亜鉛フィンガータンパク質は長鎖 DNA 配列を認識し得るためゲノム中の唯一つの配列を標的とすることができる可能性を持ち、その有用性が注目されている。しかしながら、モチーフ数の増加に伴い標的 DNA との結合平衡に要する時間が顕著に増大することが <i>in vitro</i> での研究より明らかとなっている。本研究ではフィンガーのマルチ化が亜鉛フィンガーの細胞内における挙動に与える影響を、(1)転写因子の DNA 結合ドメインとして用いた場合の転写活性化キネティクス、ならびに、(2)核内での拡散速度の観点から詳細に検討することで、以下に示す有用な知見を得た。			
第一章 マルチ亜鉛フィンガー型人工転写因子の転写活性化キネティクス			
亜鉛フィンガーを転写因子の DNA 結合ドメインとして用いた場合にフィンガーのマルチ化が転写活性化のキネティクスに与える影響を、9 フィンガー(ZF9)型と 3 フィンガー(ZF3)型のモデル人工転写因子(ZF9-ER-AD 及び ZF3-ER-AD)を創製し比較することで明らかにすることを試みた。 <i>In vitro</i> ゲルシフトアッセイの結果より、ZF3 は 6 時間以内に標的 DNA との結合平衡に到達するのに対して、ZF9 は 72 時間もの長時間を要することを確認した。次に、ZF3 と ZF9 に転写活性化ドメイン(AD)を連結させた人工転写因子をデザインし、HeLa 細胞における転写活性化能をレポーターアッセイにより評価した。本研究では、経時的な転写活性をより詳細に、かつ精密に観測するためにエストロゲン受容体リガンド結合ドメイン(ER)を人工転写因子に組み込むことによって、その転写活性化能をリガンドにより制御できるようにした。一定濃度以上のリガンドを添加した場合には、ZF9-ER-AD は添加直後から ZF3-ER-AD と同様に速やかにレポーター遺伝子の転写を促進することが明らかになった。一方で、ZF3-ER-AD はリガンド濃度によらず速やかな転写活性化を示したのに対して、ZF9-ER-AD はリガンド濃度の低下に伴って、その転写活性化が顕著に遅延することが明らかになった。			
第二章 マルチ亜鉛フィンガータンパク質の核内拡散			
近年、種々の天然の転写因子に関して核内での拡散速度が定量され、その機能			

との相関性に関する研究が行われてきた。本章では、FRAP(Fluorescence Recovery After Photobleaching)解析によって、マルチ亜鉛フィンガータンパク質の核内拡散に関する知見を得ることを試みた。

3、6、9 フィンガーのモデルタンパク質である、ZF3、ZF6、ZF9 に NLS(核移行シグナル)と GFP(Green Fluorescent Protein)を付加した蛍光タンパク質をデザインし、それぞれについて FRAP 解析を行った。その結果 ZF3-NLS-GFP は速やかな蛍光回復を示したのに対して、ZF6-NLS-GFP、ZF9-NLS-GFP はフィンガー数の増加に伴って、蛍光回復に要する時間が顕著に増大することが明らかになった。次に、DNA 結合に必須である Arg 残基を Ala 残基に置換した亜鉛フィンガータンパク質(mZF)をデザインし、その GFP 融合タンパク質の FRAP 解析を行った結果、mZF3-NLS-GFP、mZF6-NLS-GFP、mZF9-NLS-GFP とともに速やかな蛍光回復を示した。また、ZF3-NLS-GFP は均一な核内分布を示すのに対し、ZF6-NLS-GFP、ZF9-NLS-GFP は不均一な分布を示し、さらに ZF6-NLS-GFP とヒストン H2B との局在比較から、ZF6-NLS-GFP はヌクレオソームが密でない、比較的オープンなクロマチン領域に分布する傾向を見出した。以上の結果より、マルチ亜鉛フィンガータンパク質はゲノム DNA との非特異的な相互作用により核内での拡散速度が低下することが明らかになった。

以上の研究成果は、これまで *in vitro* 研究のみにより理解されていたマルチ亜鉛フィンガーの挙動に関して、細胞内、特に核内での挙動を、(1)転写因子の DNA 結合ドメインとして用いた場合の濃度依存的な転写活性化における遅延、及び、(2)核内での拡散速度の低下として明らかにした。ゲノム中の単一標的配列からの転写の活性化には亜鉛フィンガーのマルチ化は有効であるが、本結果のように、強い非特異的な相互作用を生じることがあり、細胞内挙動を明らかにすることは、人工マルチ亜鉛フィンガータンパク質の機能を最適化する上でも重要な情報を提供するものである。

(論文審査の結果の要旨)

近年、亜鉛フィンガーモチーフを骨格として、種々の配列を標的とする人工 DNA 結合タンパク質が創製されており、人工転写因子や人工ヌクレアーゼなどの DNA 結合ドメインとしての応用が試みられている。中でも長鎖 DNA 配列を認識するマルチ亜鉛フィンガータンパク質は、ゲノムのように膨大な配列情報中の唯一の配列を識別する可能性を持つことから、ゲノム中の特定の遺伝子进行操作する上での有用性が注目されている。亜鉛フィンガータンパク質の DNA への結合特性は、主に *in vitro* の実験系により評価されてきたが、最終的な機能発現への影響を考えると、それが実際に機能する細胞内での結合特性を明らかにすることが必要不可欠である。申請者は本論文において、マルチ亜鉛フィンガータンパク質の細胞内における挙動を明らかにすることを目指して先駆的かつ独創的な研究を行い、以下に示すような価値ある知見を得た。

まず、第一章において、*in vitro* では結合平衡に長時間を要するマルチ亜鉛フィンガーを DNA 結合ドメインとした人工転写因子を作製し、その転写活性化キネティクスを詳細にわたり検討した。その結果、マルチ亜鉛フィンガー型人工転写因子は細胞内濃度減少に伴って、標的遺伝子の転写活性化に顕著な遅延を示すことを明らかとした。本研究は、これまで平衡状態においてのみ評価されていた亜鉛フィンガー型人工転写因子の転写活性化について、そのキネティクスに注目することで、*in vitro* での結合平衡到達時間の増大というマルチ亜鉛フィンガータンパク質の挙動は、細胞内においても反映されることを明らかとした。

次に、第二章において、FRAP 解析によってマルチ亜鉛フィンガータンパク質の細胞内における拡散速度に関する検討を行った。細胞質ではフィンガー数非依存的に速やかな拡散を示すのに対して、核内ではフィンガーのマルチ化に伴って、拡散速度が顕著に低下することを明らかとした。さらに、この拡散速度の低下がゲノム DNA との相互作用による可能性があることを見出した。亜鉛フィンガータンパク質の拡散速度と機能発現との相関性に関して、今後より詳細に検討すべき課題は多いが、本研究は細胞内における亜鉛フィンガータンパク質のフィンガー数依存的な拡散速度変化を観察した初めての報告であり、非常に重要な成果といえる。

以上、本論文は、マルチ亜鉛フィンガータンパク質の細胞内挙動に関して、非常に多くの有益な知見を提供している。また、亜鉛フィンガーのマルチ化による影響が細胞内においても反映される可能性を示唆し、人工マルチ亜鉛フィンガータンパク質の機能を最適化する上でも今後の研究に大きな影響を与えられらる。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成 22 年 2 月 26 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日以降