

氏 名	エン 閻 ビ 薇
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 651 号
学位授与の日付	平 成 20 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Design of artificial 6-zinc finger peptides: linker alteration and DNA binding selectivity (新規6-亜鉛フィンガーペプチドの創製：リンカーの改変によるDNA結合選択性の向上)
論文調査委員	(主 査) 教 授 二 木 史 朗 教 授 藤 井 信 孝 教 授 松 崎 勝 巳

論 文 内 容 の 要 旨

序 論

ポストゲノム時代において、遺伝子を標的とする医療が期待されている。代表的なDNA結合モチーフとして知られるC₂H₂型亜鉛フィンガーは、1つのモチーフ当たり3塩基（トリプレット）を認識し、複数のフィンガーが天然に保存された「TGEKP」リンカー配列により連結され、組み合わせられることにより、様々な標的DNA配列に結合することができる。近年、そのDNA結合に関与するアミノ酸残基を改変することで、様々なDNAトリプレットに特異的に結合する人工亜鉛フィンガーモチーフが生み出されてきた。特に、ゲノム中での選択的な遺伝子発現制御を実現するためには、18塩基を認識できることが必要であり、これを可能とする人工6-亜鉛フィンガーペプチドが亜鉛フィンガーモチーフを6つ連結することによって、創られてきた。しかし、64種類全てのトリプレットに対応する亜鉛フィンガーライブラリーはまだ創られていない。この問題を解決するための1つの方法として、亜鉛フィンガーにより認識できない塩基は読みとばし、認識可能な不連続な塩基配列に結合させることで、ゲノム中の特異的配列を認識するアプローチが考えられる。本研究では、3-亜鉛フィンガーペプチド同士を2種類のリンカーで連結することにより、1) 不連続な標的配列への選択的結合能、並びに、2) 不連続な標的配列間の相対位置の識別能を有する新規6-亜鉛フィンガーペプチドの創製を試みた。

第一章 アルギニンリンカーを有する新規6-亜鉛フィンガーペプチドの創製

転写因子Sp1のDNA結合ドメインは3つの亜鉛フィンガーモチーフ（Sp1ZF3）からなり、GC-boxと呼ばれる9塩基対に結合する。Sp1ZF3同士を天然型のリンカーで連結した6-亜鉛フィンガーペプチドは連続する2つのGC-box配列にしか強く結合できない。また、この3-亜鉛フィンガー間を長いグリシンリンカーで連結したものは連続、または不連続な標的配列に対する選択性が低いことが報告されている。そこで、今回3-亜鉛フィンガー間に正電荷を有するリンカーを導入することによって、不連続な標的配列への結合選択性を有する新規6-亜鉛フィンガーペプチドの創製を試みた。

まず、Sp1ZF3同士をアルギニン8残基からなるリンカーで連結した6-亜鉛フィンガーペプチド、Sp1ZF6(Arg)8を構築し、大腸菌発現系から精製した。標的DNAとして、連続している2つのGC-box([2GC(0)])と10bp離れている2つのGC-box([2GC(10)])を用い、Sp1ZF6(Arg)8の標的DNAに対する結合親和性、及び結合様式を調べた。ゲルシフトアッセイの結果、Sp1ZF6(Arg)8の[2GC(10)]に対する結合親和性は、[2GC(0)]に対するそれに比べて20倍以上高いことが明らかとなった。また、DNase Iフットプリント法及びメチル化干渉法の結果から、Sp1ZF6(Arg)8は、[2GC(10)]の両方のGC-boxを認識できるが、[2GC(0)]の5'側GC-boxへの認識は非常に弱いことが分かった。以上の結果から、正電荷を有するポリアルギニンリンカーは、不連続な標的DNA結合サイト[2GC(10)]への6-亜鉛フィンガーペプチドの結合選択性に重要な役割を果たすことが示唆された。

第二章 ヘリックスリンカーを有する新規6-亜鉛フィンガーペプチドの創製

本章では、Sp1ZF3同士を α -ヘリックス傾向性の高いペプチド配列 (EAAAR)₄をリンカーとして用いて連結し、標的となる不連続な2つのGC-box配列間の相対位置による6-亜鉛フィンガーペプチドのDNA結合性、及びリンカー構造の変化を調べた。コントロールとして、フレキシブルな (G4S)₄をリンカーとした6-亜鉛フィンガーペプチドを作製した。標的DNAとして、2つのGC-boxがDNAの1ヘリカルターン (10 bp)、又は半ターン (5 bp) 離れている [2GC(10)], [2GC(5)] 配列を使用した。[2GC(10)] では2つのGC-boxがDNA軸の同じ側にあり、2つの認識サイト間の距離は約30Åあると推定される。これは (EAAAR)₄が α -ヘリックス構造をとった場合に予想される長さとはほぼ等しい。一方、[2GC(5)] では2つのGC-boxがDNA軸の反対側にあり、2つの認識サイト間の距離は30Åよりも長いと考えられる。

CDスペクトル測定の結果、Sp1ZF6(EAAAR)₄のリンカー領域のヘリックス含量は、DNAに結合していないときに比べ、[2GC(10)] に結合した時にはほぼ等しく、[2GC(5)] の場合には低下することが示唆された。またゲルシフトアッセイ及びDNA競合実験の結果より、Sp1ZF6(EAAAR)₄は [2GC(10)] への結合親和性が高く、コントロールペプチドに比べ、[2GC(10)] への顕著なDNA配列選択性を示すことが明らかとなった。これらの結果は、 α -ヘリックス傾向性の高いリンカーを用いることによって、DNA軸の同じ側、又は反対側といった2つの認識サイトの相対位置に対する結合選択性が得られることを示唆している。

以上のように、新規リンカーを導入することによって、不連続なDNA認識配列に対する結合選択性を示す新規6-亜鉛フィンガーペプチドを創製することができた。これらの研究はさらに高いDNA結合性と配列選択性を有する亜鉛フィンガーペプチドの設計に有益な知見を与えるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

近年、代表的なDNA結合モチーフであるC₂H₂型亜鉛フィンガーの改変によって、様々なトリプレットを認識する人工亜鉛フィンガーが報告されている。また、それらを6つ連結することにより、ゲノム配列選択的な制御に必要とされる18塩基対 (bp) を認識できる人工6-亜鉛フィンガーペプチドが作られてきた。しかし、64種類 of 全トリプレットに対応する亜鉛フィンガーはまだ存在せず、すべての連続した18bpを人工亜鉛フィンガーペプチドが認識できるわけではない。この問題を解決するための1つの方法として、申請者は、亜鉛フィンガーが認識できない塩基を読みとばし、認識可能な不連続な塩基配列に結合する亜鉛フィンガーペプチドを作製するというアプローチを考案し、6-亜鉛フィンガーペプチドを構成する2つの3-亜鉛フィンガーペプチド間に適当なリンカーを挿入することにより、不連続な塩基配列への結合選択性の向上を図った。

転写因子Sp1のDNA結合ドメインは3つの亜鉛フィンガーモチーフ (Sp1ZF3) からなり、GC-boxと呼ばれる9bpに結合することが知られている。第一章では、連続した2つのGC-box配列 [2GC(0)] と比べ、10bp離れた2つのGC-box配列 [2GC(10)] への結合選択性の向上を目指して、Sp1ZF3同士をアルギニン8残基で連結した新規6-亜鉛フィンガーペプチド、Sp1ZF6(Arg)₈を創製した。ゲルシフトアッセイの結果、Sp1ZF6(Arg)₈の [2GC(10)] に対する結合親和性は、[2GC(0)] に比べて20倍以上高いことが明らかとなった。また、フットプリント法及びメチル化干渉法の結果、Sp1ZF6(Arg)₈は、[2GC(10)] の両GC-boxを認識できるが、[2GC(0)] の5'側GC-boxの認識は非常に弱いことが分かった。以上により、ポリアルギニンリンカーは、不連続な標的DNA結合サイトへの6-亜鉛フィンガーペプチドの結合選択性に重要な役割を果たすことが示唆された。

第二章では、不連続な2つのGC-box間の相対位置の識別、すなわち、2つのGC-boxが、DNA1ヘリカルターン (10 bp)、又は半ヘリカルターン (5 bp) 離れた位置に存在するDNA配列である [2GC(10)] と [2GC(5)] を区別することを目指した。そのために、Sp1ZF3同士をヘリックス性の高い (EAAAR)₄配列で連結した6-亜鉛フィンガーペプチド、Sp1ZF6(EAAAR)₄を創製した。CDスペクトル測定の結果、Sp1ZF6(EAAAR)₄のリンカーのヘリックス含量は、[2GC(10)] 結合時にはDNA非結合時とほぼ等しいものの、[2GC(5)] 結合時には低下することが示唆された。また、ゲルシフトアッセイ及びDNA競合実験の結果より、Sp1ZF6(EAAAR)₄は [2GC(5)] に比べ、[2GC(10)] への顕著なDNA配列選択性を示すことが明らかとなった。これらの結果は、ヘリックス性の高いリンカーを用いることによって、DNA軸の同じ側、あるいは反対側といった両認識サイトの相対位置に依存した結合選択性が得られることを示唆している。

以上，本研究では，新規リンカーを導入した6-亜鉛フィンガーペプチドが，不連続なDNA認識配列に対する結合選択性を有することが示された。本研究は，より高いDNA結合親和性と選択性を有する亜鉛フィンガーペプチドの設計に有益な知見を提供するものとする。

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。

更に，平成20年2月21日に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。