

整理番号	H29-J-137	報告者氏名	愛場 雄一郎
------	-----------	-------	--------

研究課題名

核酸・ペプチド複合体を用いた高機能性材料の開発

<代表研究者> 機関名： 名古屋大学                      職名： 助教      氏名： 愛場 雄一郎

<共同研究者> 機関名：                                      職名：                      氏名：  
 機関名：                                      職名：                      氏名：  
 機関名：                                      職名：                      氏名：  
 機関名：                                      職名：                      氏名：

<研究内容・成果等の要約>

CRISPR/Cas9 システムに代表されるように、ゲノム編集技術は近年目覚ましい進歩を遂げている。これにより、ゲノム配列を自由に改変することが容易となり、遺伝子改変を利用した高機能化だけでなく、新規遺伝子の機能解明やそれに伴う生命現象の理解が進んでいる。

ここで、これらのゲノム編集技術は、ゲノム DNA を配列選択的に認識する人工的に改変された DNA 結合タンパクを利用している。これに対し、生体内の 2 本鎖構造を形成したゲノム DNA を配列選択的かつ直接認識可能な新規機能性材料が構築できれば、新たなゲノム編集技術の構築が可能となるだけでなく、特定の遺伝子の機能を選択的に制御する遺伝子発現制御への応用も期待できる。これにより、生命現象のメカニズム解明だけでなく、遺伝子病などを対象とした新たな創薬技術の創生など、非常に広範な分野での応用が期待される。そこで本研究では、人工核酸とペプチドおよびタンパクとの新規複合体を用いて、ゲノム DNA を認識する新規高機能性材料の開発について検討を行った。

具体的には PNA と呼ばれる人工核酸と、Zinc Finger タンパクと呼ばれる比較的分子量の小さな DNA 結合タンパクに着目した。両者を連結した PNA-Zinc Finger 複合体を合成することで、2 本鎖 DNA の選択的かつ効率的な認識を達成することを目指した。Native Chemical Ligation と呼ばれるペプチド連結手法を利用し、PNA と化学合成した Zinc Finger タンパクとの複合化に成功した。さらに、DNA 結合について評価を行い、PNA によるインベージョン複合体の形成も確認した。

現在は、連結手法の最適化を進めるとともに、大腸菌を用いた発現系を利用し、複数のドメインからなるサイズの大きな Zinc Finger の調製と PNA との連結について検討を進めている。今後は、両者の間のリンカー長さ、Zinc Finger 部分の設計についてより詳細に検討を進め、DNA 結合力および選択性という観点から、本新機構機能性材料の特性についてさらなる知見を集めつつ、最適化した複合体を構築する。また、最終的には本系を利用したゲノム DNA 認識応用についても検討したいと考えている。

## &lt;研究発表（口頭、ポスター、誌上別）&gt;

- 1) 河内 奈緒美、日比野 柁、愛場 雄一郎、荘司 長三  
「人工核酸 PNA とペプチド・タンパク質との複合化による DNA 認識効率の向上」  
第 50 回中部化学関係学協会支部連合秋季大会、令和 1 年 11 月 9 日、信州大学（口頭発表）
- 2) Y. Aiba,  
“*Peptide Chemistry*”  
ASUKA Symposium 2019 (Advanced Science for fUture in KAshihara), June 13, 2019, Nara, Japan (oral)
- 3) 愛場 雄一郎  
“細胞内応用を目指したペプチド核酸 PNA の開発”  
第 3 回先端ケミカルバイオロジー研究会、平成 30 年 6 月 10 日、東京大学（口頭発表、招待講演）
- 4) 愛場 雄一郎  
“ゲノム DNA 認識に向けたペプチド核酸（PNA）の開発”  
第 2 回統合物質創製化学研究推進機構（IRCCS）若手の会、平成 30 年 6 月 15-16 日、北海道（口頭発表）
- 5) 愛場 雄一郎、河内 奈緒美、日比野 柁、ウルビナ ヘラルド、荘司 長三、渡辺 芳人  
“ペプチド連結反応を利用した PNA の高機能化”  
第 30 回生体機能関連化学若手の会サマースクール、2018 年 7 月 19-20 日、宮崎（ポスター発表）
- 6) 愛場 雄一郎  
“人工核酸を利用した配列選択的 DNA 認識と応用”  
奈良県立医科大学特別講演、平成 30 年 8 月 24 日、奈良県立医科大学（口頭発表、招待講演）
- 7) 愛場 雄一郎  
“人工核酸を用いた遺伝子発現制御技術の開発”  
第 7 回化学フロンティア研究会、2018 年 9 月 1-2 日、札幌（口頭発表、招待講演）
- 8) 河内 奈緒美・日比野 柁・有安 真也・愛場 雄一郎・荘司 長三・渡辺 芳人  
“PNA と機能性ペプチド・DNA 結合タンパク質との複合化によるインベーション効率の向上”  
第 8 回 CSJ 化学フェスタ 2018、10 月 23-25 日、東京（ポスター発表）

<研究の目的、経過、結果、考察（5000 字程度、中間報告は 2000 字程度）>

### 【研究背景】

次世代シーケンサーの開発による技術的な革新に加え、分子生物学分野における研究の進展から、様々な生物種のゲノム情報が明らかにされている。さらに、近年目覚ましい進展を遂げているゲノム編集技術（ゲノム配列を自在に改変する技術、ゲノム DNA のカット&ペーストや配列置換が可能）により、ゲノム DNA 中の特定遺伝子配列を目的に応じて変更することが可能となり、これまで役割が明らかでなかった遺伝子（タンパク質）の機能同定や、それに伴う生命現象のメカニズムの解明が進められている。さらには、遺伝子の異常に由来するガンや遺伝子病などを標的とした、新たな医薬応用という観点からも、ゲノム編集技術は大きな注目を集めている。

ゲノム DNA を配列選択的に認識する改変タンパクや人工分子の開発は、その高い応用性から、これまで精力的に研究が行われてきた。しかしながら、このような改変タンパクは、DNA との相互作用を複雑な 3 次元構造を有するタンパク上で構築する必要があり、設計が非常に複雑であった。例えば、ある特定配列を認識するタンパクを構築できたとしても、配列を少しでも変更してしまえば再びからタンパクを設計する必要が出てくる。また、タンパク以外に DNA 認識に用いられる分子として、DNA へ化学修飾を施した人工核酸が挙げられる。人工核酸では、1 本鎖 DNA と Watson-Crick 塩基対形成を用いて DNA 認識を達成するため、設計が簡便かつ配列選択性が非常に高いというメリットがある。しかしながら、天然の DNA は基本的に 2 本鎖構造であるため、認識の際には 1 本鎖 DNA へと解離させる変性処理が必要不可欠であり、生体中の 2 本鎖構造を形成しているゲノム DNA を直接認識することは不可能であった。一方で、人工核酸の 1 つであるペプチド核酸（Peptide Nucleic Acid、以下 PNA）は、他の人工核酸とは一線を画す高い DNA 結合力を示すだけでなく、特徴的な 2 本鎖 DNA 認識様式を有する（図 1）。PNA は、その高い DNA 結合力から、相補的な 2 本の PNA が DNA 2 重鎖中に潜り込み、より安定な PNA/DNA の 2 本鎖を形成するインベージョンという現象が報告されている（図 2）。このインベージョンにより、他の人工核酸では達成不可能な生体内での 2 本鎖 DNA の直接的な認識が可能となる。

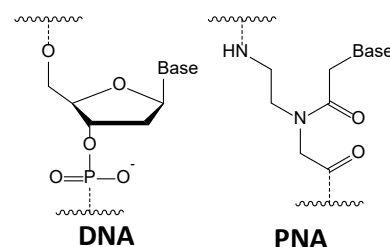


図 1. DNA と PNA の構造

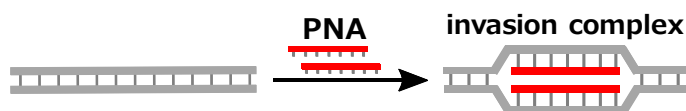


図 2. PNA によるインベージョン

### 【研究目的】

もし、ゲノム DNA を配列選択的かつ直接認識可能な新規機能性材料が構築できれば、遺伝子発現の制御や新たなゲノム編集技術の構築が可能となる。これにより、生命現象のメカニズム解明だけでなく、遺伝子病などを対象とした新たな創薬技術の創生など、非常に広範な分野での寄与が期待できる。そこで本研究では、効率的なゲノム DNA 認識に向けた「核酸とペプチドとの複合体による新規高機能性材料の開発」を目的とした。

これまで、2 本鎖 DNA（1 本鎖ではなく）の選択的認識技術に用いられた分子としては、「1. 人工核酸」、「2. 改変タンパク（Zinc Finger、TALE など）」、「3. 機能性小分子（pyrrole-imidazole polyamide など）」が挙げられる。その中で、本研究では 1 の人工核酸であるペプチド核酸（Peptide Nucleic Acid; PNA）と、2 の改変タンパクである Zinc Finger タンパク（ZF、図 3）に着目し、両者のメリットを組み合わせることで、ゲノム DNA の認識が可能な新規機能性材料の開発を目指した。PNA は、核酸塩基の相補性（A には T、G には C が対応する規則性）を利用して DNA 認識を達成しているので、高い選択性と設計の簡便さが特長として挙げられる。中でも、ある標的配列に対して必要となる PNA の配列が一意に決定することは、設計が複雑な改変型 DNA 結合タンパクとは異なり、実用性の観点で非常に重要な点であると言える。

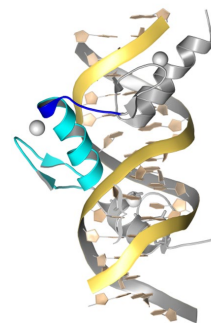


図 3. ZF による DNA 認識

一方で、PNA は生理的条件下などにおいては結合力が十分でないという問題があったので、それを ZF を用いて補うこととした。ZF は改変タンパクの中では比較的小さな分子であることと、各 DNA 配列に対応するアミノ酸構成が最適化されていることから、複合化に適していると考えた。一方で、ZF は類似配列に対する選択性が十分でないという課題があるが、これは高い配列特異性を持つ PNA と複合化することで克服できると考えた。また ZF は、ペプチド固相合成法を利用した化学合成だけでなく、大腸菌による発現系を利用して調製可能な点も、他の合成分子とは異なる大きなメリットと言える。特に、認識ドメインの複数連結による結合力の向上や認識配列の変更は、複数のドメインを連結するように遺伝子配列を設計し、用いる発現ベクターを適宜構築することで達成可能である。

### 【結果と考察】

PNA とタンパクとの連結手法としては、ネイティブケミカルライゲーション (Native Chemical Ligation, NCL) によ

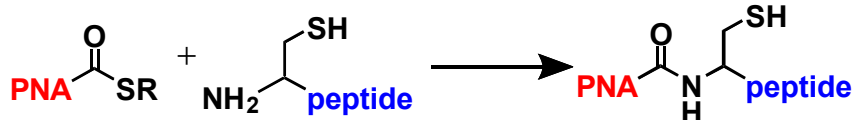


図 4. NCL を用いた PNA とペプチドとの連結

って連結することとした。NCL は、1994 年に Kent らによって報告された反応であり、生理的条件下 (pH7, 37°C) で C 末端にチオエステルを持つペプチドと N 末端にシステインを持つペプチドを連結することが可能である (図 4)。PNA は基本骨格にペプチド結合を有しているため、NCL の応用が容易である。さらに、この反応は側鎖の保護基を必要とせず、水中、室温の条件で選択的に反応が進行するため、大腸菌で発現させたタンパク質にも変性させることなく応用が可能である。さらに、NCL を利用することで、PNA と ZF をそれぞれ独立に調製することができ、複合体を繋ぐリンカー長や ZF の認識配列の網羅的な検討が可能となる。

<モデルペプチドとの複合化による連結手法の検証> まず、PNA への NCL の適応について確認するために、タンパクよりも短鎖のペプチドと PNA の連結について確認を行った。モデルペプチドとしては、過去に PNA への導入によりインベーション効率の向上が報告されている核移行シグナルペプチド (NLS) を選択した。PNA は通常通りに Boc 法によるペプチド固相合成で合成した。ここで、C 末端をチオエステル化した PNA を調製するために、Boc-Leu-OH と 3,3'-dithiopropionic acid を順に resin に導入後、目的配列の PNA の伸長を行った。また、NLS は同様に Fmoc 法のペプチド固相合成法を用いて合成し、N 末端に Cys を導入した。それぞれ HPLC で精製後、MALDI-TOF MS により同定を行った。精製後の PNA と NLS ペプチドを NCL によって連結し、インベーション複合体の形成効率をゲル電気泳動によって評価した (図 5)。連結前の PNA と比べ、NLS を連結した

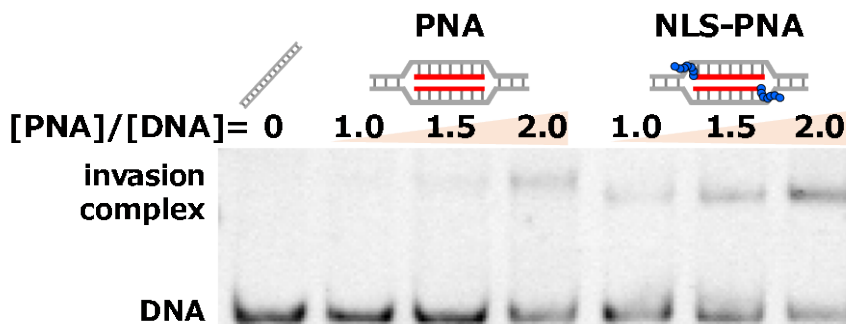


図 5. NCL により調製した NLS 連結 PNA によるインベーション実験

NLS-PNA では、DNA の上流に確認できるインベーション複合体のバンドが濃くなっており、インベーション効率が向上していることがわかる。以上から、NCL による連結手法が PNA の高機能化に有効であることを見出した。

<ZF の合成と機能確認> モデルペプチドでの検討に成功したので、ZF の調製に着手した。ZF はサイズの小さなタンパクであるため、1 ドメインのものであれば化学合成が可能である (約 30 アミノ酸)。そこで、まずは、大腸菌を用いたタンパク発現系ではなく化学合成による調製を検討した。先ほどの NLS 同様に、一般的な Fmoc ペプチド固相合成法を用いて ZF を合成し、HPLC による精製、MALDI-TOF MS により同定を行った。その後、合成した ZF がきちんと機能するかを確認する

ために、その二次構造について CD (円偏光二色性) スペクトルを測定した。ZF はその名前の通り、亜鉛イオンが中心に配位し、図 2 で示したような特徴的な二次構造を形成することが知られている。また、DNA 結合にはこの二次構造形成が必須となっているため、亜鉛イオン添加前後の CD スペクトルについて比較を行った (図 6)。その結果、亜鉛イオン添加後に、 $\alpha$ ヘリックスに特徴的な 210 nm 付近、220 nm 付近の負の吸収が観測された。これは、過去の報告にある ZF と同様スペクトル形状であるため、きちんと二次構造を形成すると判断した。

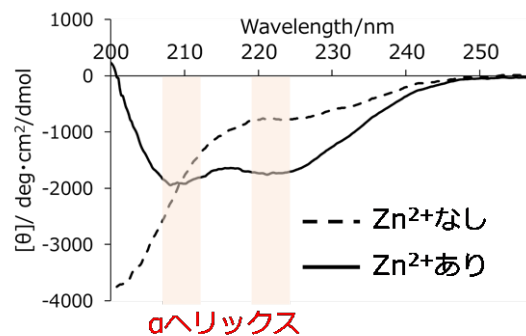


図 6. ZF の二次構造の確認

<NCL による ZF と PNA の複合化およびインベージョン実験> NLS ペプチド同様、NCL を用いて ZF と PNA との連結を行った。ここで、ZF には Gly を導入することで PNA 間のリンカーとした。その後、亜鉛イオン共存化にて DNA と混合し、インベージョン複合体の形成効率をゲル電気泳動によって評価した (図 7)。まず ZF と連結前の PNA では、図 5 よりも高濃度の PNA を用いることで、インベージョン複合体が効率的に形成していることが確認できる。一方 ZF と PNA を連結した ZF-PNA を見ると、同様に高い効率でインベージョン複合体が形成されている。さらに着目すべき点として、インベージョン複合体の泳動度 (バンドの位置) が PNA と ZF-PNA では異なっている。一般に、インベージョン複合体の泳動度が変化する理由としては、インベージョン複合体形成時に DNA が折れ曲がることで、その泳動度に影響を及ぼしていると言われている。今回の ZF-PNA では、PNA のインベージョンに加え近傍の DNA を ZF が認識することで、そのインベージョン複合体の構造が変化し、泳動度がより上流にシフトしたものと考えられる。以上から、NCL による ZF と PNA の複合化および ZF-PNA による DNA 認識に成功した。

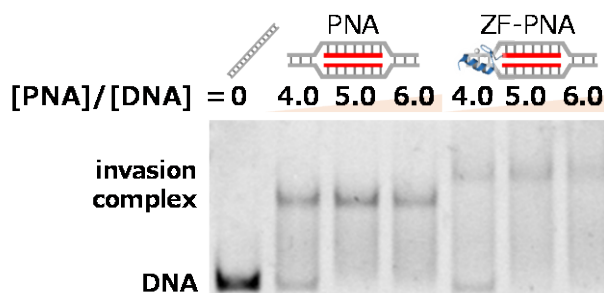


図 7. ZF-PNA 複合体によるインベージョン実験

#### 【まとめと今後の展望】

本研究では、PNA と ZF を複合化することで、ゲノム DNA を認識する新規高機能性材料の開発を目指し検討を行った。まず、PNA とペプチドやタンパクを複合化させる手法について、NCL を用いることで NLS ペプチドや ZF タンパクとの連結に成功した。これまで、PNA に単純にタンパクを連結したような研究はあったが、今回のようにタンパクを連結した PNA を用いて、そのインベージョンという機能を確認したのは、PNA 研究において初めての報告である。

現在は、よりサイズの大きな複数のドメインからなる ZF を標的タンパクとし、大腸菌発現系を利用した調製と、PNA との複合化について検討を進めている。今後は、PNA と ZF との間に付与するリンカーの長さや、ZF 自体のアミノ酸配列の設計についてより詳細に検討を進め、DNA 結合力および配列選択性という観点から、本新機構機能性材料の特性についてさらなる知見を集めつつ、最適化した複合体を構築する。このように、2 本鎖構造を有するゲノム DNA を配列選択的かつ直接認識可能な新規機能性材料が構築されれば、生命現象のメカニズム解明だけでなく、遺伝子病などを対象とした新規創薬技術など、広範な応用が期待される。また本手法は、機能を維持したままタンパク質と PNA との複合化が可能であるため、DNA 切断を行う制限酵素やメチル化酵素といった DNA 修飾酵素など、ZF 以外の様々な機能を持つタンパク質への適応拡大が期待出来る。

今回は、公益財団法人泉科学技術振興財団様よりこのような研究助成を賜り、このように研究を大きく推進させることが出来ました。心より御礼申し上げます。