

論文の内容の要旨

論文題目

部位特異的修飾法による蛋白質-DNA コンジュゲートの作製技術の開発とその応用

氏名 武田 修治

1. 緒言

タンパク質の高機能化を指向して、従来は遺伝子工学的なアプローチと化学修飾のアプローチがとられてきた。蛋白質の機能拡張という面では遺伝子工学的なアプローチでは20種類のアミノ酸の組み合わせに限られるという限界があり、また従来の化学修飾法ではさまざまな非天然分子を蛋白質に対して導入できるものの化学修飾部位を限定できないという問題点がある。

近年それらの問題点を克服すべく、拡張コドン法やタンパク質の全合成や半合成を用いて非天然分子を導入する研究が盛んになってきている。拡張コドン法では部位特異的にさまざまな非天然アミノ酸が導入されている。しかし導入できる非天然アミノ酸はその立体的な嵩高さなどにより導入効率が制限されるため高分子の直接導入は難しい。タンパク質の全合成法では非天然分子を導入したペプチド断片を縮合して連結するという手法である。しかし一般に長いペプチドの合成は合成効率が低下するため、高分子量の蛋白質の全合成による非天然分子の導入は困難であり現実的ではない。そこで半合成的手法が用いられる。半合成的手法とは大腸菌などに発現させておいたタンパク質断片に対して、非天然分子を導入した合成ペプチド断片を末端特異的に連結するという戦略である。このような遺伝子工学的なアプローチと化学的なアプローチの融合が次世代型の機能性蛋白質の作製には必要であると考えられる。

DNAは塩基配列に特異的な相補的な結合をするという独特な性質を有しており、配列の設計次第で高次構造のプログラミングが可能であるため分子配置の制御技術としてナノバイオテクノロジーの分野において注目されている。また相補的会合能のほかに、分子認識をするアプタマーと呼ばれる配列あるいは触媒活性を有する配列などが知られており、蛋白質に導入することで新しい機能性ハイブリッド分子の構築が期待される。DNAは固相における合成法が確立されており、比較的安価にさまざまな配列が入手可能である、また様々な機能性の修飾塩基の合成およびその機能が報告されているためエンジニアリングの対象として非常に興味深い。そこで、本研究では自然界に存在する機能性高分子であるDNAの蛋白質への末端特異的な導入法を確立する。さらに得られた均質な蛋白質-DNA コンジュゲートの特性を利用し分析化学分野等への応用に関する研究を行った。

2. 蛋白質への末端特異的 DNA 導入法の開発

従来の蛋白質へのDNA導入法では化学量論の制御が困難であり、修飾部位が制御された

均質なコンジュゲートを作製することは難しい。マレイミド法では表面システインがひとつに限られない場合や酵素活性にシステイン残基が必要な場合には適した戦略ではない。単純な構造と化学的安定性、汎用性を併せ持った DNA 修飾法はこれまで報告がない。そこでネイティブライゲーションを蛋白質への DNA の部位特異的導入に応用することを試みた。ネイティブケミカルライゲーションを利用し蛋白質に対して蛍光分子やビオチンなどの小分子の末端特異的な導入に関する報告がこれまでになされているが、ペプチド以外の高分子の導入の報告例は見当たらない。

N 末端システインとチオエステルの間で起こるネイティブケミカルライゲーションを蛋白質-DNA コンジュゲートの作製に応用するために、末端にアミノ基が修飾された市販の DNA に対してシステインの分子骨格とチオエステルを修飾する戦略をとることにした。水溶液系で DNA を修飾するために NHS エステル試薬 1,2 を設計し合成した (図 1)。アミノ基が修飾されたオリゴヌクレオチドへの試薬 1,2 に

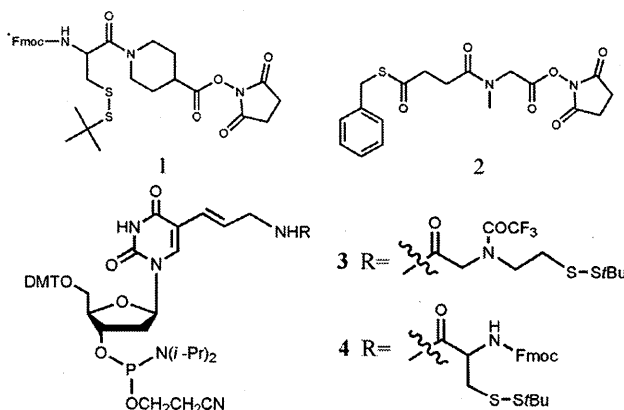


図 1.蛋白質-DNA コンジュゲート作製のための試薬 1~4 の構造

よる修飾は、HPLC と MALDI-TOF-MS により反応追跡と生成物の同定を行った。C 末端チオエステル体および N 末端システインの蛋白質はインテイン融合型蛋白質発現システムを用い発現系を構築し、キチンビーズ上でのインテイン自己切断反応を利用して精製し取得した。モデル蛋白質として緑色蛍光蛋白質 EGFP を用いて試薬 1, 2 を用いた DNA 修飾実験に用いた。SDS-PAGE と MALDI-TOF-MS の結果より部位特異的な修飾を確認した。緩衝液中で 4℃ という温和な条件でのライゲーション反応では GFP の緑色蛍光は失われなことを確認した。試薬 1, 2 を用いた DNA 修飾では DNA の鎖長 (35mer まで確認) や配列、修飾部位 (3' / 5') にかかわらず、蛋白質としてこれまでに EGFP のほかにも *Renilla* Luciferase, *Firefly* Luciferase, ProteinG C1 ドメインに関してネイティブケミカルライゲーションによる DNA の部位特異的修飾ができることを確認しており、ネイティブケミカルライゲーションを応用した本手法は蛋白質-DNA のコンジュゲート作製に応用できる汎用性のある手法であることが分かった。この新しい戦略をとることで簡便な 3' 修飾および 5' 修飾が可能になると考えられる。特に 3' 修飾に関しては通常特殊な固相担体を用いる必要があるので本手法は有効である。

固相核酸自動合成に使用可能かつ末端ではない DNA の配列の内部に蛋白質を導入するためネイティブケミカルライゲーションに適した修飾塩基としてウリジンを基本骨格として試薬 3, 4 を設計し合成した (図 1)。試薬 3, 4 は DNA 自動固相合成機を用いてオリゴヌクレオチドに導入、精製し MALDI-TOF-MS によって導入を確認した。得られたオリゴヌ

クレオチドとピオチンチオエステル、EGFP チオエステルとをネイティブケミカルライゲーションに供した。

試薬 3 および 4 を導入したオリゴヌクレオチドを用いても蛋白質-DNA コンジュゲートの作製が可能であった。ピオチンチオエステルの反応性で評価する限り、試薬 3 および 4 の反応性はほとんど同じであった。ウリジンの 5 位への化学修飾は DNA の 2 本鎖形成を不安定化しないことが知られているので、試薬 3, 4 を用いたコンジュゲート作製法は DNA をテンプレートにした分子配置に用いるのに適していると考えられる。これらの新しい手法の開発により蛋白質-DNA コンジュゲートの分子設計の自由度が高まった。

3. 蛋白質-DNA コンジュゲートの分析化学への応用

新しい戦略によって作製された蛋白質-DNA コンジュゲートは融合蛋白質と同様に末端特異的に DNA が 1 : 1 で修飾されているという特徴を持っている。この末端特異性を利用できれば、分子配向性が重要とされており従来遺伝子工学的な蛋白質改変でしか行われてこなかった手法を蛋白質-DNA コンジュゲートによっても実現できるのではないかと考えられた。そこで蛋白質-DNA コンジュゲートを用いた蛋白質フラグメント会合アッセイ (PCA) への応用を試みた。

split-firefly luciferase を用いて PCA 系を構築することにした。蛋白質断片の会合を促進するために、zinc finger と 2 本鎖 DNA の配列特異的な結合を利用することで配向性のコントロールができる系を設計した。N 末端側断片 LucN の C 末端には DNA 結合モチーフである zinc finger の Zif268 を融合させた (LucN-Zif268)。C 末端側断片 LucC の N 末端にはインテインの自己切断反応を利用してシステインが提示されるようベクターを設計し発現させ、N 末端のシステインに対し新しく開発した N 末端特異的 DNA 修飾法によって 2 本鎖 DNA を修飾した。LucC が 2 本鎖 DNA で修飾されていることは、フルオレセイン標識の DNA をハイブリダイズさせた修飾核酸をライゲーション反応に用い、反応液の SDS-PAGE ゲルの蛍光像およびクマシー染色によって確認した。ゲルシフトアッセイにより LucN-Zif268 は亜鉛の存在下で 2 本鎖 DNA への結合活性が得られ、かつ LucN の弱い残存発光活性を有していたため LucN-Zif268 は期待通りの活性を有したフォールディングをしていると考えられる。PCA では LucN-Zif268 では亜鉛を配位した LucN-Zif268 と 2 本鎖 DNA 修飾 LucC を混合したときに、発光活性の増加が見られた。したがって Zif268 と 2 本鎖 DNA の間の相互作用によって活性回復がなされたと考えられた。活性回復の度合いが非常に低いことや、非特異的な Zif268 の結合を抑えられないなどの解決すべき問題がある。しかしながら本系は、タンパク質と合成分子の間の相互作用を観測するための系のモデルとして DNA と蛋白質の相互作用を、末端特異的修飾した酵素断片を用い PCA 系で検出を行なったはじめての例であると言える。また Split-Luciferase の系は DNA 以外の合成分子とタンパク質間の分子間相互作用検出への応用が考えられる。

4. 結言

本研究ではネイティブケミカルライゲーションを利用した蛋白質の末端特異的な DNA 修

飾法の開発を行った。さらに新しい手法の特性を生かし分析化学への応用を試みた。蛋白質と DNA の機能を融合したハイブリッド分子を構築し応用するには、分子設計が重要でありまたコンジュゲートの収量の向上も必要である、本研究で開発した手法はそのための有効な方法論になりうると考えられる。