

2. 亜鉛フィンガー融合型 DNA 組換え酵素のデザイン

Design of Sequence-Specific Zinc Finger Recombinase

○増田 朱美^{1,2)}、野村 渉¹⁾、奥田 毅^{1,2)}、玉村 啓和^{1,2)}

○Akemi Mausuda^{1,2)}, Wataru Nomura¹⁾, Tsuyoshi Okuda^{1,2)}, Hirokazu Tamamura^{1,2)}

¹⁾ 東京医科歯科大学・生体材料工学研究所、²⁾ 東京医科歯科大学大学院・疾患生命科学研究部

¹⁾ Institution of Biomaterials and Bioengineering, Tokyo Medical and Dental University,

²⁾ Graduate School of Biomedical Science, Tokyo Medical and Dental University

日本ケミカルバイオロジー学会 第 5 回年会. 横浜, 2010 年 5 月 18-19 日.

亜鉛フィンガータンパク質 (ZFP) は各モジュールが約 30 アミノ酸からなる $\beta\alpha$ 構造を形成し、 α -ヘリックスのアミノ酸側鎖が DNA 3 塩基と相互作用する。この特徴を利用し、3 塩基のコード配列に対応するモジュールを組み合わせることで標的 DNA 配列に結合する ZFP を作製することができる。標的配列に対して高い特異性で結合する ZFP は多岐に渡る応用が考案されているが、その中でも DNA を修飾する酵素との融合タンパク質として用いた遺伝子治療の可能性が注目されている。DNA 組換え酵素は標的とする遺伝子配列の両端で二量体を形成し、さらに四量体として会合する際に組換え反応が起きる。この反応は能動的に起きるため標的遺伝子のノックアウト法として利用できる (図)。本研究では ZFP 融合型 DNA 組換え酵素 (RecZFP) を用いた標的 DNA 配列の切除反応について、反応効率の向上に向けた酵素デザインの検討を行った。具体的には、ZFP と酵素ドメイン間のリンカー配列及び ZFP の DNA 結合親和性のそれぞれが組換え反応効率に及ぼす影響について大腸菌内での反応について検討を行い、その結果をもとに哺乳類細胞内における反応効率についても同様に検討を行った。大腸菌内の反応では酵素の触媒ドメインが作用するスペーサー配列を介して両端に 2~6 モジュールがつながった ZFP の結合配列がある標的配列を 700 塩基程度離れた位置に置いたモデルプラスミドを用いた。作製した ZFP の結合親和性を ELISA 法により評価した後、融合型酵素 (RecZFP) として標的配列上流に遺伝子をコードしたプラスミドを大腸菌内へ導入した。導入後の反応時間を一定として組換え反応を定量した結果、ZFP モジュール数や酵素のリンカー長が反応効率に影響することが明らかになった。哺乳類細胞内での反応については、ゲノム上に標的配列の間にプロモーター配列と蛍光タンパク質のコード遺伝子を導入した安定発現細胞株を用いて蛍光タンパク質の減少比率から組換え反応を評価した。RecZFP を導入後、一定時間培養した細胞の蛍光強度を FACS で測定した結果、コントロール細胞と比較して蛍光強度が減少することが明らかになった。これらの知見に基づき、活性の高い ZFP

融合型 DNA 組換え酵素のデザインが可能になるとともに様々な遺伝子関連疾患への応用が期待される。

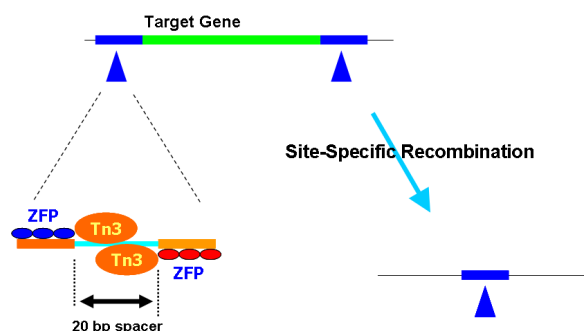


図. RecZFP による組換え反応について