

令和元年5月22日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07313

研究課題名(和文) DNA結合蛋白質の機能解析のためのマイクロ秒時分割単分子計測技術の創出

研究課題名(英文) Development of micro second measurement for functional analysis of DNA binding proteins

研究代表者

鎌形 清人 (Kamagata, Kiyoto)

東北大学・多元物質科学研究所・准教授

研究者番号：90432492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNA結合蛋白質は、膨大なDNAの中から標的配列を探し出し、結合する。DNA結合蛋白質の標的配列の探索には、実験的に検証しにくい“ホッピング”や“セグメント間移動”などの探索機構が存在する可能性がある。本研究では、サブミリ秒の時間分解能の単分子蛍光装置、及びDNA整列固定法を開発し、DNA上におけるDNA結合蛋白質の動きを単分子レベルで可視化し、その標的配列探索機構を調べた。開発する装置を用いて、がん抑制の機能を持つp53がホッピングやセグメント間移動を使って、標的配列の探索を行っていることを明らかにした。さらに、標的配列の認識の正確さやDNA上の障害物を回避する仕組みを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんなどの疾患は、p53などのDNA結合蛋白質がDNAの標的配列を探索できず結合できないことに起因するため、DNA結合蛋白質の標的配列探索の仕組みの解明は重要である。本研究の特徴は、p53が標的配列を探索する過程を可視化し、従来の方法では計測が難しい、ホッピングやセグメント間移動による探索を検証することである。マイクロ秒時間分解単分子計測法は、DNA結合タンパク質の機能の解明に貢献する。さらに、開発したDNA整列固定法は、世界でもっとも簡便で単純な方法である。このDNA整列固定による単分子計測は、様々なDNA結合蛋白質の探索の仕組みの解明、薬候補のスクリーニングなどの創薬に使用できる。

研究成果の概要(英文)：DNA-binding proteins can search for and bind to the target DNA sequence among a huge non-target sequence. We hypothesized that the proteins use “hopping” and “intersegmental transfer”, which is difficult to measure, during the target search. In this study, we developed sub-millisecond time resolved single-molecule fluorescence microscopy for DNA-binding proteins and aligned DNA array “DNA garden”, and investigated the target search mechanism of the proteins by visualizing the motion at single molecule level. We found that a tumor suppressor p53 searches for the target DNA by hopping and intersegmental transfer. Furthermore, we revealed the accuracy for recognizing the target DNA and proposed the molecular mechanism for bypassing the obstacles on DNA.

研究分野：生物物理学

キーワード：がん 蛋白質 一分子計測 DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA 結合蛋白質は、膨大な長さの DNA の中から標的配列を探し出し、結合することで、細胞の機能を調整する。細胞内で短い時間で遺伝子の転写を制御できることから、DNA 結合蛋白質は“正確さ”と“速さ”を兼ね備えた探索機構を持つと考えられる。現在までに、DNA 上を滑るように標的配列を探索する“スライディング”や DNA 上で解離と再結合を繰り返し標的配列を探索する“3次元探索”の2つの探索機構が提案されている。その他の機構として、DNA 上の短い距離をぴょんぴょんと跳ぶように探索する“ホッピング”や DNA 上のある部位から別の部位へ移動する“セグメント間移動”の探索機構が理論的に提案されているが、その存在は実験的に明らかにされていない。さらに、配列探索時の“正確さ”が何に起因するのか、また DNA 上の障害物をどのように回避するのかも明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、サブミリ秒の時間分解能の単分子蛍光装置、及び DNA 整列固定法を開発し、DNA 上における DNA 結合蛋白質の動きを単分子レベルで可視化し、その標的配列探索機構を調べることを目的とした。

- (1) サブミリ秒の時間分解能の単分子蛍光装置の開発を行った。
- (2) ガラス基板上に DNA の末端を一行に揃えて固定する方法“DNA ガーデン”の開発を行った。
- (3) 開発した方法を用いて、がん抑制の機能を持つ p53 をモデル蛋白質として用いて、“ホッピング”の探索機構の有無を調べた。
- (4) “セグメント間移動”を検証するため、十字の DNA 固定法を開発した。p53 を用いてセグメント間移動の探索機構の有無を調べた。
- (5) p53 が DNA の標的配列を認識し結合する機構、およびその制御機構を調べた。
- (6) 上記の結果を踏まえて、DNA 結合タンパク質が DNA 上の障害物を回避し、標的 DNA を探索する仕組みを考察した。

3. 研究の方法

- (1) 高出力レーザーの全反射照明と高感度でマイクロ秒の分解能のラインスキャン型検出器を組み合わせた全反射蛍光顕微鏡を作製した。
- (2) MPC (2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリン) ポリマーによるガラス基板のコーティングと PDMS (ポリジメチルシロキサン) スタンプによる DNA 接着分子のスタンプを組み合わせ、DNA の末端を一直線上に揃えて固定した。
- (3) サブミリ秒の時間分解能の単分子蛍光装置を用いて、蛍光色素修飾した p53 が、DNA ガーデン法によりガラス基板上に固定された DNA 上を動く様子を撮影した。
- (4) 上記の DNA ガーデン法を改良し、ガラス基板上に十字の DNA を作成した。全反射蛍光顕微鏡を用いて、蛍光色素修飾した p53 が2本の DNA 間を移動するかどうか(セグメント間移動)を計測した。
- (5) p53 の標的を組み込んだ DNA を作成し、全反射蛍光顕微鏡を用いて、蛍光色素修飾した p53 の標的配列への結合過程を観測した。

4. 研究成果

- (1) 500 マイクロ秒の時間分解能を達成し、時間分解能を従来法の約 50 倍向上させることに成功した。
- (2) DNA の末端を一直線上に揃えて固定する方法“DNA ガーデン”の開発に成功した。開発した方法は、観測視野内の DNA 数を増やし、一度に 10,000 分子の DNA 結合蛋白質のデータの取得を可能にした。
- (3) DNA 上での p53 の時系列データには、DNA と接触した状態で移動する“スライディング”に加えて、短い距離の“ホッピング”が含まれていることが明らかとなった。従来の方法では“ホッピング”が時間平均により“スライディング”の中に埋もれ、検出することが難しいが、マイクロ秒の分解能での計測により“ホッピング”を“スライディング”から分離して検出することに成功した。
- (4) ガラス基板上に2本の DNA を十字に固定する方法の開発に成功した。蛍光色素修飾 p53 が DNA 間を移動する様子が頻繁に観察された。p53 は、プラスの電荷をもった天然変性領域を用いて、DNA 間を高速で移動することが明らかとなった。
- (5) p53 の標的配列への結合過程を観測したところ、約 10%の分子が結合に成功したが、残りの分子は結合に失敗し通り過ぎることが明らかとなった。これまで結合の成功率は 100%と考えられてきたが、p53 の場合は 10 分の 1 と低いことが分かった。さらに、標的への結合の成功率が p53 の転写活性と相関があることが明らかとなった。
- (6) 上記の結果をまとめると、p53 は DNA 上に障害物があったとしても、“ホッピング”や“セグメント間移動”を用いて、障害物を回避し、効率よく標的 DNA 配列の探索を行っていることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](10件)

Yuji Itoh, Agato Murata, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Intrinsically disordered domain of tumor suppressor p53 facilitates target search by ultrafast transfer between different DNA strands, *Nucleic Acid Research*, 査読有、46 巻、2018 年、7261-7269, DOI:10.1093/nar/gky586.

Kiyoto Kamagata, Eriko Mano, Kana Ouchi, Saori Kanbayashi, Reid C. Johnson, High free-energy barrier of 1D diffusion along DNA by architectural DNA-binding proteins, *Journal of Molecular Biology*, 査読有、430 巻、2018 年、655-667, DOI:10.1016/j.jmb.2018.01.001.

鎌形清人、伊藤優志、生物物理学的アプローチによるがん抑制蛋白質 p53 の DNA 認識・結合機構の解明、*生化学*、査読有、89 巻、2017 年、533-537, DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2017.890533.

Kiyoto Kamagata, Agato Murata, Yuji Itoh, Satoshi Takahashi, Finding the target: Characterization of the facilitated diffusion of transcriptional factor p53 along DNA using ensemble kinetic and single-molecule fluorescence measurements (invited review), *Journal of Photochemistry and Photobiology, C: Photochemistry Reviews*, 査読有、30 巻、2017 年、36-50, DOI:10.1016/j.jphotochemrev.2017.01.004.

Dwiky Rendra Graha Subekti, Agato Murata, Yuji Itoh, Satoshi Fukuchi, Hiroto Takahashi, Saori Kanbayashi, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, The disordered linker in p53 participates in nonspecific binding to and 1D sliding along DNA revealed by single-molecule fluorescence measurements, *Biochemistry*, 査読有、56 巻、2017 年、4134-4144, DOI:10.1021/acs.biochem.7b00292.

Agato Murata, Yuji Itoh, Eriko Mano, Saori Kanbayashi, Chihiro Igarashi, Hiroto Takahashi, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, One-dimensional search dynamics of tumor suppressor p53 regulated by a disordered C-terminal domain, *Biophysical Journal*, 査読有、112 巻、2017 年、2301-2314, DOI:10.1016/j.bpj.2017.04.038.

Daiki Tatsumi, Kei Nanatani, Yuto Koike, Kiyoto Kamagata, Satoshi Takahashi, Ayumu Konno, Tadaomi Furuta, Minoru Sakurai, Nobuyuki Uozumi, Probing native metal ion association sites through quenching of fluorophores in the nucleotide binding domains of the ABC transporter MsbA, *Biochemical Journal*, 査読有、474 巻、2017 年、1993-2007, DOI:10.1042/bcj20161051.

Chihiro Igarashi, Agato Murata, Yuji Itoh, Dwiky Rendra Graha Subekti, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, DNA garden: A simple method for producing arrays of stretchable DNA for single-molecule fluorescence imaging of DNA binding proteins, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 査読有、90 巻、2017 年、34-43, DOI:10.1246/bcsj.20160298.

Yuji Itoh, Agato Murata, Seiji Sakamoto, Kei Nanatani, Takehiko Wada, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Activation of p53 facilitates the target search in DNA by enhancing the target recognition probability, *Journal of Molecular Biology*, 査読有、428 巻、2016 年、DOI: 10.1016/j.jmb.2016.06.001.

村田崇人、伊藤優志、鎌形清人、DNA 結合蛋白質 p53 のスライディング探索の単分子蛍光観察、*生物物理*、査読有、56 巻、2016 年、109-111, DOI: 10.2142/biophys.56.109.

〔学会発表〕(計 26 件)

鎌形清人、単分子蛍光顕微鏡を用いた天然変性タンパク質 p53 と DNA の相互作用解析、「水と ATP エネルギー」研究会、2019 年 3 月 11 日、秋保岩沼屋(仙台市)

Kiyoto Kamagata, Single molecule dynamics and aggregation in intrinsically disordered protein p53, RIKEN Symposium "Recent Progress in Protein Conformation and Aggregation", 2019 年 1 月 24 日、理科学研究研(和光市)

鎌形清人、天然変性タンパク質を対象とした機能調整ペプチドの人工設計法の開発 -がん抑制タンパク質 p53 への応用-, 第 4 回 東北大学若手研究者アンサンブル研究会、2019 年 1 月 8 日、東北大学(仙台市)

Kiyoto Kamagata, Ecological search dynamics of DNA-binding proteins for target DNA, An Update on Molecular Motors: Open Challenges and New Perspectives, 2018 年 11 月 20 日、東北大学(仙台市)

Kana Ouchi, Reid C. Johnson, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Single-molecule investigation of the sliding dynamics of architectural DNA-binding proteins along crowded DNA using DNA garden technique, The 56th annual meeting of the biophysical society of Japan, 2018 年 9 月 15-17 日、岡山大学(岡山市)

Kiyoto Kamagata, Eriko Mano, Sridhar Mandali, Yuji Itoh, Reid C. Johnson, Single-molecule fluorescence imaging of architectural DNA-binding proteins in vitro and in vivo, The 56th annual meeting of the biophysical society of Japan, 2018 年 9 月 15-17 日、岡山大学(岡山市)

Yuji Itoh, Agato Murata, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Single-molecule

observation of the target search dynamics of a tumor suppressor p53, The 56th annual meeting of the biophysical society of Japan, 2018年9月15-17日、岡山大学(岡山市)

Kiyoto Kamagata, Single-molecule characterization of p53 on DNA using DNA array "DNA garden", 3rd international symposium on chemical communication, 2018年9月11日、東北大学(仙台市)

鎌形清人、天然変性 DNA 結合タンパク質 p53 の濃度依存的な物性の変化—LLPS との関連性—、LLPS 研究会、2018年8月31日、産業総合技術研究所(お台場)

Dwiky Rendra Graha Subekti, Agato Murata, Yuji Itoh, Reid C. Johnson, Kiyoto Kamagata, Development of the sub-millisecond resolved single-molecule fluorescence microscopy for the functional analysis of DNA-binding proteins, 第18回蛋白質科学会年会、2018年6月26-28日、朱鷺メッセ(新潟市)

鎌形清人、間野絵梨子、Sridhar Mandali、大内加奈、伊藤優志、Reid C. Johnson, DNA 結合タンパク質の単分子蛍光観察 DNA 上における障害物回避、第18回蛋白質科学会年会、2018年6月26-28日、朱鷺メッセ(新潟市)

Kiyoto Kamagata, Agato Murata, Yuji Itoh, Dwiky Rendra Graha Subekti, Single-molecule characterization of p53 on DNA using DNA array "DNA garden", 62nd annual meeting of Biophysical Society, 2018年2月17-21日、Moscone Center (California, USA)

Kiyoto Kamagata, Single-molecule characterization of DNA-binding protein using DNA arrays "DNA garden" -welcome to biophysical world-, Biological Chemistry Seminar, 2018年2月12日、UCLA (California, USA)

Kiyoto Kamagata, Agato Murata, Yuji Itoh, Single-molecule characterization of p53 on DNA using DNA array "DNA garden", The 17th International p53 Workshop, 2017年7月8-12日、Biopolis (Singapore)

Yuji Itoh, Agato Murata, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Ultrafast intersegmental transfer of a tumor suppressor p53 characterized by ensemble and single-molecule fluorescence spectroscopy, The 17th International p53 Workshop, 2017年7月8-12日、Biopolis (Singapore)

Dwiky Rendra Graha Subekti, Agato Murata, Yuji Itoh, Kiyoto Kamagata, p53-DNA Interaction: Effect of Linker Modulation on Binding and Sliding, The 17th International p53 Workshop, 2017年7月8-12日、Biopolis (Singapore)

伊藤優志、村田崇人、高橋聡、鎌形清人、多分子及び一分子蛍光分光法によるがん抑制タンパク質 p53 の超高速セグメント間移動の解明、第17回蛋白質科学会年会、2017年6月20-22日、東北大学(仙台市)

北尾彰朗、鎌形清人、高橋聡、実験と計算による p53 の標的 DNA 配列探索機能、日本化学会第97春季年会、2017年3月16-19日、慶応大学(横浜市)

鎌形清人、単分子蛍光顕微鏡を用いた DNA 結合蛋白質 p53 の単分子機能解析、Ambitious 物質科学セミナー、2016年11月30日、北海道大学(札幌市)

鎌形清人、DNA 整列固定技術を用いた DNA 結合蛋白質の単分子機能解析、第54回日本生物物理学会、2016年11月25-27日、つくば国際会議場(筑波市)

⑳ Yuji Itoh, Agato Murata, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Ultrafast intersegmental transfer of a tumor suppressor p53 investigated by ensemble and single molecule measurements, 2016年11月25-27日、つくば国際会議場(筑波市)

㉑ Dwiky Rendra Graha Subekti, Agato Murata, Yuji Itoh, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Elongation of Intrinsically Disordered Linker in p53 and the Effects on DNA Binding and Sliding Ability, 2016年11月25-27日、つくば国際会議場(筑波市)

㉒ 鎌形清人、生物物理学的な手法を用いたがん抑制蛋白質 p53 の機能解析、東北大学技術研修、2016年11月22日、東北大学(仙台市)

㉓ 高橋聡、齊藤雅嵩、鎌形清人、小井川浩之、高度化した一分子蛍光計測によるタンパク質の構造形成運動の解明、新学術領域研究「柔らかな分子系」第4回公開シンポジウム、2016年10月27-28日、名古屋工業大学(名古屋市)

㉔ 高橋聡、齊藤雅嵩、鎌形清人、小井川浩之、ライン共焦点顕微鏡によるタンパク質の構造形成運動の一分子蛍光観察、第10回分子科学討論会、2016年9月13-15日、神戸ファッションマート(神戸市)

㉕ 鎌形清人、DNA 結合蛋白質の単分子機能解析、平成28年化学系学協会東北大会、2016年9月10-11日、いわき明星大学(いわき市)

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：高橋 聡

ローマ字氏名：TAKAHASHI, SATOSHI