

令和元年6月4日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14669

研究課題名(和文)低コスト・高効率な新規ナノ開口基板作製法の開発とDNA結合蛋白質研究への応用

研究課題名(英文) Development of construction for Zero Mode Waveguides with low cost and high efficiency and application to analysis of DNA-binding proteins

研究代表者

韓 龍雲 (HAN, YONG-WOON)

国立研究開発法人理化学研究所・生命医科学研究センター・研究員

研究者番号：50566297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：高濃度蛍光標識生体分子の蛍光1分子イメージングを可能とするナノ開口基板は解離定数の高い蛋白質-蛋白質間や蛋白質-DNA間の結合解離の様子を詳細に解析することが可能である。これまでに私も自身でナノ開口基板作製手法を確立し、DNA結合蛋白質の機能解析を行ってきた。しかしながら、ナノ開口基板を用いた研究手法を汎用性の高い研究手法とするためには、ナノ開口基板を安価で効率よく作製する必要があり、本研究では、Character Projection法と呼ばれる電子線描画法を利用して、これまでの自身の手法に比べて、作製コストを1/5に、作製効率を10倍にすることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生体内の多くの反応は複数種の生体分子が多段階に結合解離を行う一連の過程を経て、進行し、蛍光1分子イメージング技術により、そのような過程をリアルタイムに観察することが可能となった。そして、高濃度で蛍光1分子イメージング観察を可能とするナノ開口基板により、様々な生体分子複合体の結合解離の様子を解析することが可能となった。しかしながら、分子生物学の今後の研究にこの手法を取り入れて行くためには、ナノ開口基板をより安価で効率よく作製する手法を開発する必要があったが、本研究結果により、今後、他の研究者もより簡単にナノ開口基板を利用する研究を開始する点で大きな学術的意義があったと考えている。

研究成果の概要(英文)：The Zero Mode Waveguides (ZMWs) enables us to visualize a single fluorescent molecule under high concentration of the molecules and characterize the protein-protein or protein-DNA complex formation process. I have already established the method for construction of ZMWs and characterized some of DNA-binding proteins using the ZMWs. However, research technique using ZMWs was not still common technique. For availability of ZMWs, in this study, I developed the method for construction of ZMWs using Character Projection electron beam lithography. The cost of ZMWs decreased to 1/5 and the production efficiency was increased to 10-fold compared with my previous construction method for ZMWs.

研究分野：生物物理学

キーワード：1分子イメージング DNA結合蛋白質

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

本研究で解析対象とする DNA 結合蛋白質は DNA 複製、修復、組換えやゲノム DNA の分配等のゲノム構造の維持に重要な働きを示すだけでなく、ヒストン蛋白質や DNA メチル化酵素等のクロマチン構造を制御し、組織特異的な遺伝子発現を制御することで、個体の恒常性維持にも重要な働きを示す。このような蛋白質の中で、DNA 相同組換えの中間体で十字型構造をした Holliday 構造 DNA の分岐点移動反応に関与する RuvA-RuvB 蛋白質複合体を中心に研究を進めていた。RuvA 蛋白質が Holliday 構造 DNA 特異的 DNA 結合蛋白質で、RuvB 蛋白質がモーター蛋白質として機能し、RuvA と相互作用し、Holliday 構造 DNA 上で RuvA-RuvB-Holliday 構造 DNA 複合体を形成する。RuvA-RuvB 蛋白質複合体が RuvB による ATP の加水分解によるエネルギーを利用して、Holliday 構造 DNA の分岐点移動を促進させる。そして、研究開始当初は特に RuvA-RuvB-Holliday 構造 DNA 複合体形成過程に注目して、研究を開始した。このような研究を進めていく上で、蛍光標識した生体分子の挙動を直接、実時間で観察、計測できる一分子解析法は強力な解析方法の一つである。しかしながら、本研究計画で注目している RuvB-DNA 複合体の解離定数は数百 nM 以上と一分子解析を行う上では非常に相互作用の弱い蛋白質であった。これまでの一分子計測に用いられている全反射照明を用いた解析では、蛍光標識分子の濃度が 50 nM 以上だと、自由に動き回っている蛍光標識分子からの背景光がノイズとなり注目する分子の観察に大きな影響を与えていた

(図 1)。従って、RuvB と RuvA-Holliday 構造 DNA の相互作用を一分子計測で解析するにはこのような問題を克服が必要であった。

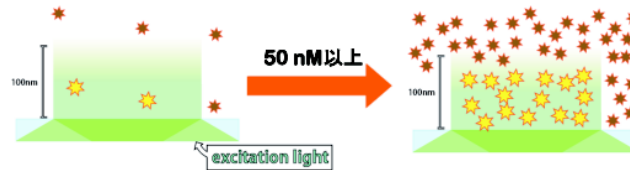


図 1 全反射照明による蛍光 1 分子イメージングの概略図

このような状況の中、2003 年に W. W. Webb らは数 μm でも 1 分子観察が可能な近接場光を利用したナノ開口 (zero-mode waveguides) と呼ばれる新しい蛍光 1 分子イメージング法を開発した (Levene M. et al, Science 299, 682-686, 2003) (図 2)。私もこれまでにナノ開口基板を自作することに成功し、作製したナノ開口基板を用いて、RuvB 蛋白質の機能解析を行った。RuvB は AAA+ ATPase ファミリーに属し、DNA 上で 6 量体リング構造を形成し、このリング構造を活性型とすることが知られている。しかしながら、RuvB の DNA 上での 6 量体リング構造形成過程にはまだ不明な点も多く、蛍光色素で標識した RuvB が Holliday 構造 DNA 上で複合体を形成する様子を観察することに成功した。そして、RuvA と RuvB が Holliday 構造 DNA と結合する際において、RuvB の ATP との結合だけでなく、ATP 加水分解が安定した RuvA-RuvB-Holliday 構造 DNA 複合体形成を促進するというを示唆する結果を得た。

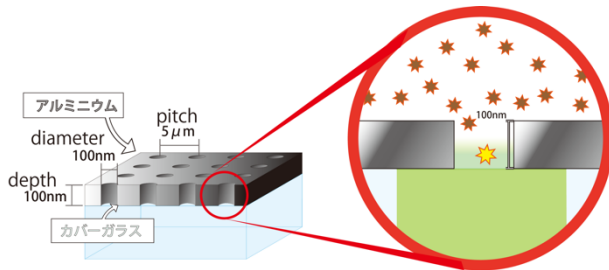


図 2 ナノ開口基板の概略図

しかしながら、ナノ開口基板を利用した研究を汎用性の高い研究にするためにはナノ開口基板をより低コストで効率よく作製する必要があったが、本研究を開始する当初ナノ開口基板 1 枚あたりのコスト 10,000 円程度で、1 日あたり 6 枚程度しか作製できず、本研究ではこの点を改善するところから研究を開始する必要があった。

2. 研究の目的

本研究では、高濃度蛍光標識生体分子の蛍光 1 分子イメージングを可能とするナノ開口基板をこれまでの手法とは異なり、低コストで効率よく作製する手法を確立し、解離定数の高い蛋白質-蛋白質間や蛋白質-DNA 間の結合解離の様子を詳細に解析することを研究の目的とする。本研究では、Character Projection 法と呼ばれる高速でナノ加工を可能とする手法を用いて、ナノ開口基板を作製する手法を確立し、DNA 結合蛋白質、特に DNA 相同組換えに関連した Holliday 構造 DNA の分岐点移動反応に関与する RuvA、RuvB 蛋白質を中心に機能解析を行う。

3. 研究の方法

(1) ナノ開口基板の作製

本研究で使用するナノ開口基板はアルミニウム上に直径が 50 から 100 nm 程度の穴がアレイ上に並んだガラス基板であり、石英ガラス上でのナノ開口作製の概要は箇条書きされた下記の通りである (図 3)。

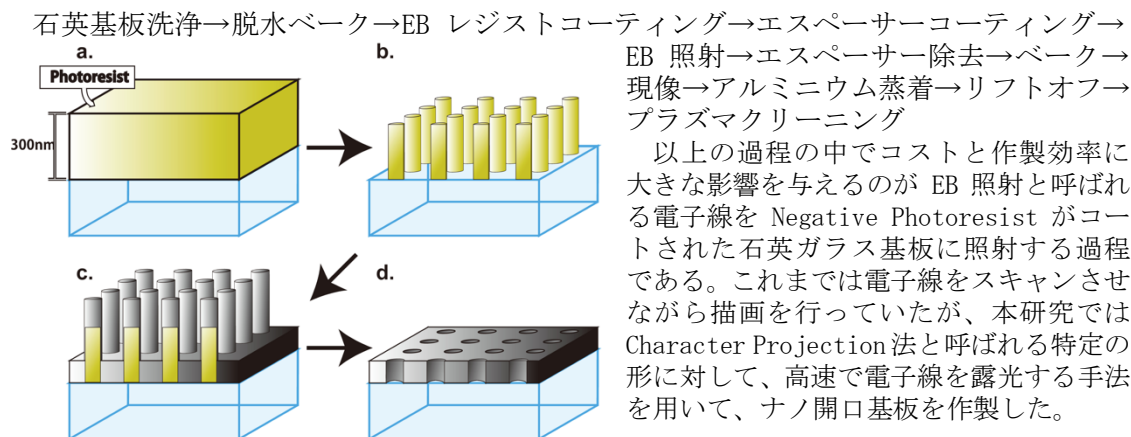


図3 ナノ開口基板作製の概要図 (a) EB レジストコーティング

(b) EB 照射と現像 (c) アルミニウム蒸着 (d) ネガ型電子線レジストの除去 (リフトオフ)

(2) DNA 及び蛋白質の準備

これまでに蛍光標識 RuvB の準備は終了したので、本研究では蛍光標識 RuvA の準備と Holliday 構造 DNA の構造変化を解析するために Holliday 構造 DNA 末端に蛍光色素で標識した Holliday 構造 DNA の準備を行った。

蛍光標識 RuvA の準備については、まず、RuvA には1つシステイン残基があるので、Cy3-マレイミドまたは Cy5-マレイミドと呼ばれる化合物を用いて、チオール基のあるシステイン残基に蛍光色素である Cy3 または Cy5 が結合した Cy3-RuvA または Cy5-RuvA 蛋白質を作製した。しかしながら、Cy3-RuvA、Cy5-RuvA の活性は共に大きく失われていたので、本研究では、RuvA のC末端にマレイミドと効率良く反応することが知られている LPSIVHRKCFLE とアミノ酸を付加した変異体を作製し、Cy3-マレイミドと Cy5-マレイミドを用いて、Cy3-RuvA と Cy5-RuvA を作製した。また、Cy3-RuvA と Cy5-RuvA の活性は野生型 RuvA と比べて、少し低いことが測定に大きな問題が無いことを生化学的解析から確認した。

4. 研究成果

ナノ開口基板作製のコストを下げ、作製効率を上げるために、ナノ開口基板作製過程において、EB 照射と呼ばれる電子線を用いた描画過程を改善する必要があり、本研究では、これまで使用していた電子線をスキャンさせながら描画を行っていた装置から新たに Character Projection 法と呼ばれる特定の形、本研究では円形のパターンをワンショットで露光することができる電子線描画装置を用いることで、1日あたりのナノ開口基板の作製枚数を60枚にまで上げることに成功した。また、コストも1枚あたり2,000円程度まで落とすことに成功した(現在、投稿論文準備中)。

また、蛍光標識 RuvA を用いた研究についてはナノ開口基板上での Holliday 構造 DNA との相互作用を観察する前に物理化学的手法により解析を行った。Holliday 構造 DNA 非存在下、存在下で RuvA と RuvB との結合解離について、調べたところ、Holliday 構造 DNA 非存在下では RuvA と RuvB の結合速度は分オーダーの非常に遅い反応であったが、Holliday 構造 DNA 存在下では、その結合速度が秒オーダーと非常に速くなる結果が得られた。また、マグネシウムイオン存在下において、RuvA-RuvB 複合体がマグネシウムイオン非存在下に比べて安定していることを示唆する結果も得られた。また、マグネシウムイオン存在下では RuvB の構造が RuvA と相互作用した後に変化していることを示唆する結果も得られ、RuvA-RuvB-Holliday 構造 DNA 複合体形成において、まず、RuvA が Holliday 構造 DNA と複合体を形成し、その後、RuvB が RuvA との相互作用を通して、Holliday 構造 DNA と複合体を形成し、その過程において、RuvB がマグネシウムイオンとの相互作用を通じた構造変化により、安定した RuvA-RuvB-Holliday 構造 DNA 複合体を形成することを示唆する結果が得られた(現在、投稿論文準備中)。

本研究で、新たに確立した作製手法で作製したナノ開口基板を用いて、蛍光標識 Holliday 構造 DNA をナノ開口基板に固定し、その構造変化を Holliday 構造 DNA 末端に付加した蛍光色素の強度変化を指標に観察することに成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Seiichiro Kizaki, Tingting Zou, Yue Li, Yong-Woon Han, Yuki Suzuki, Yoshie Harada and Hiroshi Sugiyama, Preferential 5-Methylcytosine Oxidation in the Linker Region of Reconstituted Positioned Nucleosomes by Tet1 Protein, Chemistry - A European Journal, 査読有、22 巻、2016、16598-16601
DOI:10.1002/chem.201602435

〔学会発表〕 (計 4 件)

① 韓 龍雲、Holliday 構造 DNA は RuvA-RuvB 複合体形成を促進させる、第 40 回日本分子生物学会、2017 年

② 韓 龍雲、分光学的手法によるクロマチンリモデリング因子の機能解析、第 39 回日本分子生物学会、2016 年

③ Yong-Woon Han、Characterization of RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation Using fluorescently labeled RuvA、第 54 回日本生物物理学会年会、2016 年

④ Yong-Woon Han、Spectroscopic analysis of fluorescently labeled RuvA for characterization of RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation、10th 3R Symposium、2016 年

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。