

機関番号：82401
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2008～2012
課題番号：20579004
研究課題名(和文)電子顕微鏡法によるテロメア超構造の解析
研究課題名(英文) Three-dimensional super structures of *Saccharomyces cerevisiae* Rap1-telomeres complex analyzed by electron microscopy
研究代表者
眞木 さおり (MAKI SAORI)
独立行政法人理化学研究所・タンパク質結晶構造解析研究グループ・研究員
研究者番号：20513386

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物物理学

キーワード： 核酸 蛋白質 老化 ガン

1. 研究計画の概要

真核生物の染色体末端は、テロメアとよばれる特徴的な繰り返し配列をもつ DNA と様々なタンパク質から構成される。テロメアは染色体の正常な分配に必須であり、テロメアを欠いた DNA 末端どうしの異常な融合による染色体の不安定化は細胞死や発ガンの原因となる。

正常な体細胞では、種や細胞ごとにある一定の範囲内にテロメア長が保たれている。この制御機構については、テロメア DNA と関連タンパク質から構成される複合体の超構造がテロメア長制御に重要な役割を担っているというモデルが提案されている。

本研究では、モデル生物として研究がもっとも進んでいる出芽酵母のテロメア DNA と関連蛋白質 Rap1、Rif1、Rif2 との複合体の再構成および電子顕微鏡法等によるテロメア超構造の解析を行う。同時に Rap1 分子の単粒子像解析を進め、DNA に結合時と非結合時の Rap1 の構造の違いからテロメア長調節機構に関わる Rap1 の機能を明らかにし、テロメア長制御機構の解明を目指す。

2. 研究の進捗状況

(1) Rap1 タンパク質の精製

Rap1 タンパク質は、精製初期段階において非常に分解しやすい。これまで精製法の改良を進め、純度の高い Rap1 を精製することが可能になった。特にヒスチジンタグを利用した精製では、COSMOGEL His-Accept(ナカライ社製)が効果的であった。

(2) Rap1 とテロメア DNA の結合実験

精製した Rap1 と Rap1 結合部位を 4 つもつテロメア DNA を様々な条件下で結合させ、電子顕微鏡による観察を行った。Rap1 とテロメア DNA の結合は、ゲルシフトアッセイで確認されているが、電子顕微鏡下で複合体は観察されなかった。

(3) 繊維状の Rap1 複合体

純度の高い Rap1 画分を電子顕微鏡で観察するとわずかではあるが繊維状の複合体が存在していた。この繊維状複合体の *in vitro* における再構成実験を進めているが、現在までに成功していない。また、テロメア DNA と Rap1 を結合させても同様な繊維状複合体は形成されなかった。

(4) GFP 融合 Rap1 の大量発現、精製

電子顕微鏡で観察された繊維状複合体が Rap1 から形成されていることを確かめるために Rap1 の C 末端側に GFP を融合させた rap1-gfp プラスミドを作製、発現系を構築し、精製を行った。この試料を電子顕微鏡観察したところ繊維状複合体が多く観察された。同時に蛍光顕微鏡観察も行ったが、この繊維(長さ 80 nm 程度)に相当する構造を確認するに至らなかった。

(5) 電子顕微鏡法、電子線トモグラフィー法

新たに導入した電子顕微鏡 JEM-2100(日本電子)のセットアップと、電子線トモグラフィー法を行うための自動撮影システムのセットアップを進めている。

3. 現在までの達成度

③やや遅れている。

Rap1 タンパク質の高純度精製法の確立にか

なり時間を要したため。また精製した Rap1 画分にわずかに含まれる繊維状複合体の再構成実験および Rap1 とテロメア DNA の結合条件検討に時間を要している。この研究に必須の電子顕微鏡システムおよび電子線トモグラフィ法のための画像収集システムのセットアップが生化学実験と同時に進めているために時間を要している。

4. 今後の研究の推進方策

(1)テロメア DNA の作製、Rap1 との結合実験
これまで、共同研究者の Elizabeth H. Blackburn 教授から提供された DNA フラグメントを使用してきたが、この DNA フラグメントは粗精製したものであり、純度が十分でない可能性がある。また、濃度もさまざまな結合条件を試すには十分ではない。今後はテロメア DNA の作製を行う。これまでの DNA フラグメントは比較的長さが短いため、電子顕微鏡観察には適していなかった。そこで、5.5 kb 程度のプラスミドに Rap1 結合部位を 10 個以上もつテロメア DNA 配列を組み込み、これを制限酵素部位で切断、アガロースゲルによる精製を行い純度の高いテロメア DNA を mM オーダーに濃縮し、タンパク質-DNA 複合体形成実験を行う。また Rap1-DNA 複合体の単粒子像解析を行うために、Rap1 結合部位 1 個もつ DNA (~30 bp) を調製し、Rap1-DNA 結合実験を進める。

(2)高分解能蛍光顕微鏡による GFP 融合 Rap1 の観察

Rap1-GFP 融合タンパク質が形成する繊維状複合体は、長さが 80 nm 程度であり、通常の蛍光顕微鏡では、繊維状複合体に相当する大きさを観察することができない。近年、光学顕微鏡で超解像画像を得るために PALM(photoactivation localization microscopy)が導入されている。PALM を使った蛍光顕微鏡観察には、GFP の変異体である EGFP(enhanced GFP)を利用する。そこで、すでに作製した rap1-gfp プラスミドに点変異を導入し、rap1-egfp プラスミドの構築、大量発現、融合タンパク質の精製を進め、PALM 観察を行う。

(3)電子線トモグラフィ法による Rap1 繊維状複合体の構造解析

電子線トモグラフィ法のための自動データ収集システムのセットアップがほぼ完了したので、この手法を使った Rap1 繊維状複合体および Rap1-GFP 繊維状複合体の構造解析を進める。

(4)Rap1 単粒子像解析

電子顕微鏡 JEM-2100 (日本電子)を使って単分散した Rap1 の単粒子像解析を進める。Rap1 と短いテロメア DNA を結合させた複合体も同様に単粒子像解析を行い、DNA 結合状態と DNA 非結合状態の Rap1 の構造を比較する。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

Tanya L. William, Daniel L. Levy, Saori Maki-Yonekura, Koji Yonekura, and Elizabeth H. Blackburn Characterization of the yeast telomere nucleoprotein core. Rap1 binds independently to each recognition site. Journal of Biological Chemistry Vol. 285, No. 46, 35814-35824, (2010) 査読有り

[学会発表] (計 2 件)

① 眞木さおり (代表)、Cryo-electron microscopy and helical reconstruction of biological materials、日本顕微鏡学会、2010 年 5 月 23 日、名古屋国際会議場

② 眞木さおり (代表)、電子顕微鏡法による出芽酵母 Rap1 とテロメア DNA 複合体の構造解析、日本生物物理学会、2008 年 12 月 3-5 日、福岡国際会議場

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]