

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 22 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510286

研究課題名(和文)光化学的新技术を用いたDNA結合タンパク質の網羅的クローニング法の開発

研究課題名(英文)Development of photochemical cloning for DNA-binding proteins

研究代表者

定金 豊 (Sadakane, Yutaka)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：60293304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：転写調節などの様々な機能を担うDNA結合タンパク質の効率的な解析法とクローニング法について、光を照射するだけで共有結合をつくる性質をもつ光反応基を利用して開発研究を実施した。従来法では不可能であった複数のDNA結合タンパク質の同時解析を可能とした光化学的ゲルシフトアッセイ法を開発し、核抽出液を用いた実験でその解析能力の高さを実証した。光反応性DNAを分子生物学的手法であるパニング法や機器分析法である質量分析法と組み合わせることで光化学的クローニングを実施するための基礎的な実験を実施した。さらに、本解析法のターゲットとなる脳神経疾患の基礎的な知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：We developed the new method for analysis of DNA-binding proteins, which play the various physiological roles such as transcriptional regulation, using photo-reactive compound, which is able to form the covalent bond by light irradiation. Our photochemical gel-shift assay reveals that octamer DNA binds several proteins of nuclear extract. We further examined the photochemical cloning methods combining with molecular biological technique, phage panning or instrumental analysis of mass spectrometry. We also analyzed expression pattern and fibrillation of cranial nerve disease, which is a target disease for photochemical methods in this study.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子化学・ケミカルバイオロジー

キーワード：光反応 分析化学 コンフォメーション病 DNA結合タンパク質 ゲルシフトアッセイ

## 1. 研究開始当初の背景

DNA 結合タンパク質は転写調節を始め様々な生理的機能を担っており、重要なターゲット高分子である。特異的な DNA に結合するタンパク質があるかどうかを調べる方法として、ラベルした DNA を利用したゲルシフトアッセイが一般的である。また、目的の DNA 結合タンパク質をクローニングする手段として DNA アフィニティークラムを利用する方法や酵母細胞内で結合実験を行う Yeast One Hybrid 法がよく知られている。

我々は光反応基を利用した Chemical Biology の新技術の創製を目指している。光反応基は光照射をすると近くの分子と共有結合する性質をもち、光を照射するだけで2つの分子の弱い結合を強い結合に変化させることができ、2つの分子の相互作用解析に威力を発揮する。分析感度を飛躍的に高めるとともにこれまで不可能であった分析を可能にする潜在能力を秘めている。

光反応基ジアジリンは生命現象の解明に最も適した化学的性質をもつものの、合成の難しさから、なかなか生化学者に利用してもらうことが難しい。我々は、ジアジリンを利用しやすいツールとすることを目的に、最もシンプルなジアジリン化合物に足掛かりとなる官能基を位置特異的に直接導入する効率的で簡便な合成技術を確認して、光反応性の生体リガンドを創製する基礎的技術「光反応ユニット化技術」を構築した。特に、DNA にジアジリンを導入する方法は簡便で再現性の高い方法である。DNA の特定位置に光反応基を導入することができる優れた方法である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、上述の DNA にジアジリンを導入する光反応ユニットを利用し、DNA 結合タンパク質の網羅的な解析法およびクローニング法を開発すること、さらには、アルツハイマー病やプリオン病などのコンフォメーション病に着目し、未だ明らかでない発症時の DNA 結合タンパク質の質的および量的な変化を、開発した技術で解析することである。

具体的な目標として、①DNA 結合タンパク質の網羅的解析法の開発、②光化学的パニング法を利用した DNA 結合タンパク質のクローニング法の開発、③切断性光反応ユニット

の開発と質量分析法を用いた DNA 結合タンパク質のクローニング法の開発、④コンフォメーション病であるプリオン病やアルツハイマー病の基礎的解析と本研究で確立した解析技術の応用の4つを掲げた。

## 3. 研究の方法

①～③ (DNA 結合タンパク質の網羅的解析法の開発、光化学的パニング法を利用した DNA 結合タンパク質のクローニング法の開発、切断性光反応ユニットの開発と質量分析法を用いた DNA 結合タンパク質のクローニング法の開発) について、DNA 結合タンパク質と DNA との組合せのモデルとして、POU タンパク質と octamer DNA 配列 (ATGCAAAT) との組合せを利用した。

④ (コンフォメーション病であるプリオン病やアルツハイマー病の基礎的解析) について、プリオンタンパク質の断片を化学合成し、それらペプチドのコンフォメーション変化と線維化の様子を調べた。また、重要な脳疾患である脳血管性認知症に繋がる亜鉛の影響について発現解析を実施した。

## 4. 研究成果

【① DNA 結合タンパク質の網羅的解析法の開発】

octamer DNA 配列 (ATGCAAAT) を持つ DNA 鎖の末端にビオチンを導入して可視化できるタグとして利用した。また、チオリン酸基の位置を変えた DNA 鎖を複数合成し、光反応ユニットを導入する位置を変化させた。光反応基としてジアジリンとベンゾフェノンを使用して、発現した POU タンパク質への結合実験を行った。

光反応基を導入する位置については調べた限りにおいて、ラベル効率に大きな影響を与えなかったが、光反応基としてベンゾフェノンに比べてジアジリンの方が短時間でラベルが可能であることが明らかになった。試料となるタンパク質、リガンドの DNA への影響を考えると短時間の照射で実験できることは望ましいといえ、光反応基としてジアジリンが優れているといえる。

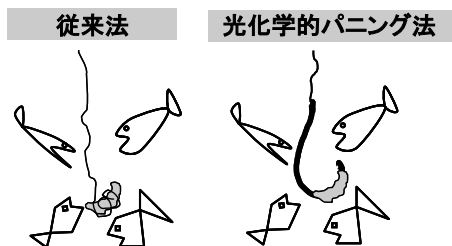
ジアジリンを持つ DNA 鎖をリガンドとして、核抽出液を利用して DNA 結合タンパク質の解析実験を行った。その結果、octamer DNA 配列 (ATGCAAAT) に結合するタンパク質が複数ラベルされ、1枚ゲル上で識別す

ることができた。

現行のゲルシフトアッセイでは、DNA とタンパク質との結合を保つためにネイティブゲルでの電気泳動で解析する必要があり、解析能力は結合タンパク質の有無が分かる程度であった。本研究で開発した光化学的ゲルシフトアッセイは、光反応基により両者が共有結合で結ばれるため、変性ゲルでの解析が可能で、解析能力も高く、複数の DNA 結合タンパク質を同時に解析することが可能になった。

## 【② 光化学的パニング法を利用した DNA 結合タンパク質のクローニング法の開発】

我々が光反応性ペプチドで構築した光化学的パニング法を利用して、DNA 結合タンパク質のクローニング法の開発を行った。光化学的パニング法は、従来のパニング法に比べて 1000 倍もの選択効率をもつ。それは、例えば従来法が糸に餌をつけて釣りをするようなものであったのに比べ、光化学的パニング法はきちんと針の付いている釣りであるといえる。光反応基が針の役目をして、狙ったタンパク質を離さない役目をしている（下図）。



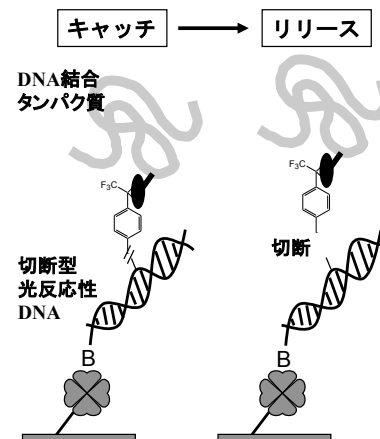
①で成果のあったビオチンをもつ光反応性 DNA を利用して、POU タンパク質を発現したファージをどの程度の効率で回収できるかを調べた。

POU タンパク質を提示した“ポジティブ”ファージを野生株ファージ中に混合した疑似ライブラリーで選択効率を検討した結果、選択効率が数倍と非常に低い選択効率であった。DNA への光反応基の導入位置、POU タンパク質の発現する部分、アッセイ方法などを、様々に変えて実験を行ったが、選択効率は思ったほど向上しなかった。ファージへ提示したタンパク質の機能に問題があると考えられた。そのため、ヒト cDNA 発現提示ライブラリーを利用した実験には至らなかった。

## 【③ 切断性光反応ユニットの開発と質量分析法を用いた DNA 結合タンパク質のクローニング法の開発】

## クローニング法の開発】

質量分析法はタンパク質やペプチドを高感度で分析できる方法であり、光反応基を利用すれば、ラベルされたアミノ酸残基を MS/MS 解析で決定することができ、DNA 結合部位の構造情報も得ることができる。タンパク質にラベルされたときに DNA が残っていると質量分析で邪魔になるため、DNA を切断し、小さなダグだけを残すような方法を確立する必要がある。



我々は acrylsulfonamide 切断系を用いて、切断型光反応実験で成果を得ているが、光反応ユニットとして簡便なジスルフィド結合をもつユニットを利用することとした。合成した光反応ユニットを利用して、DNA 鎖への導入を試みたが、再現性良く導入できる方法を見つけることができなかった。

## 【④ コンフォメーション病であるプリオン病やアルツハイマー病の基礎的解析と本研究で確立した解析技術の応用】

プリオンタンパク質の断片であるペプチドを利用して、構造変化に伴う線維化の様子を調べた。長さの異なるペプチド鎖を利用して調べた結果、長さが 1 個違うだけで、線維化が大きく異なることを見出した。アルツハイマー病に関連するアルツハイマー  $\beta$  タンパク質についても、末端構造の変化が線維化に大きく影響することも見出した。

また、脳血管性認知症で重要なキー物質である亜鉛を加えたときに発現量が変化する mRNA を解析した結果、転写調節因子を含む様々なタンパク質の変動を見出すことができた。

## 5. 主な発表論文等

(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 7 件)

1. M. Kawahara, D. Mizuno, H. Koyama, K. Konoha, S. Ohkawara, Y. Sadakane (2014) Disruption of zinc homeostasis and the pathogenesis of senile dementia. *Metallomics* 6, 209-219.
2. Y. Sadakane, M. Yamazi, I. Otsuka, (2012) Experimental conditions for analyzing carbohydrate-binding protein using photoreactive lactose ligand prepared with AffiLight CHO, *Photomedicine and Photobiology* 34, 37-38
3. Y. Sadakane, N. Fujii, K. Nakagomi (2011) Determination of rate constants for beta-linkage isomerization of three specific aspartyl residues in recombinant human alpha A-crystallin protein by reversed-phase HPLC, *J Chromatogr. B.* 879, 3240-3246.
4. M. Kawahara, H. Koyama, Y. Sadakane (2011) Effects of trace metals on the conformational changes of amyloidogenic proteins and their neurotoxicity, *Biomed. Res. Trace Elements* 22, 7-14
5. I. Ohtsuka, Y. Sadakane, M. Higuchi, N. Hada, J. Hada, N. Kakiuchi, A. Sakushima (2011) The effect of the structural differences in the reducing terminus of sugars on the binding affinity of carbohydrates and proteins analyzed using photoaffinity labeling. *Bioorg Med. Chem.* 19, 894-899

[学会発表] (計 18 件)

1. 定金 豊, 松下 秀峰, 山路 充宏, 大塚 功: 光反応性糖鎖ミメティックペプチドの合成とレクチン解析への応用 日本薬学会第 134 年会, 2014 年 3 月 28 日~30 日, 熊本
2. 宇佐美亜由子, 山本理香子, 定金 豊: プリオンタンパク質ペプチド断片の N 末アミノ酸の構造変化と線維化速度への影響 第 59 回日本薬学会東海支部大会 2013 年 7 月 6 日 名古屋
3. 定金 豊, 宇佐美亜由子, 山本理香子: プリオンタンパク質ペプチド断片の N 末構造変化と線維化速度への影響 日本薬学会第 133 年会, 2013 年 3 月 28 日~30 日, 横浜
4. 定金 豊, 山路充宏, 大塚功: 光反応性糖鎖リガンドを用いた結合解析法の効率化 日本病院薬剤師会東海ブロック・日本薬学会東海支部 合同学術大会 2012 2012 年 11 月 18 日 岐阜
5. 定金 豊, 宇佐美亜由子, 山本理香子: プリオンタンパク質断片ペプチド(106-126)

の N 末およびアスパラギン残基の構造変化によるアミロイド線維化速度への影響 第 8 回 D アミノ酸研究会 2012 年 9 月 7 日、8 日、滋賀

6. 定金 豊, 大塚功, 山路充宏, 畑中保丸: 還元末端が閉環した構造をもつ光反応性糖鎖リガンドの合成と結合解析法の確立 第 34 回日本光医学・光生物学会 2012 年 7 月 27 日、28 日 神戸
7. I. Ohtsuka, Y. Sadakane, N. Hada, M. Higuchi, N. Kakiuchi, Synthesis of new molecular tools for elucidation of carbohydrates roles by photoaffinity labeling: Carbohydrate - Carbohydrate-protein interactions are affected by different of glycosidic formations. *International Carbohydrate Symposium* (2012, 7, 22-27, Spain)
8. 定金 豊, 宇佐美亜由子, 山本理香子: アルツハイマー  $\beta$  ペプチド断片の N 末端の構造変化による線維化速度への影響 第 58 回日本薬学会東海支部大会 2012 年 7 月 7 日 静岡
9. S. OHKAWARA, H. KOYAMA, Y. SADAKANE, M. KAWAHARA: Molecular mechanism of zinc-induced neurodegeneration: involvement of calcium dyshomeostasis and carnosine. 第 22 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム 2012 年 5 月 31 日、6 月 1 日 金沢
10. 定金 豊, 小山 裕也, 川原 正博: アルツハイマー  $\beta$  ペプチドの N 末側アミノ酸の構造的変化と線維化への影響 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 28 日~31 日, 札幌
11. 小山 裕也, 坂口 哲陸, 定金 豊, 川原 正博: PrP106-126 の高次構造変化に重要な配列 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 28 日~31 日, 札幌
12. 大塚 功, 定金 豊, 羽田 紀康, 羽田 純子, 新垣 達司, 樋口 真里, 垣内 信子: 光アフィニティーラベル法による新規分子ツールの開発~糖鎖結合様式が認識に及ぼす影響を検証~ 日本薬学会第 132 年会, 2012 年 3 月 28 日~31 日, 札幌
13. 定金 豊 2011 年 11 月 11 日 (招待講演) 神経疾患に関わるペプチド断片の機能とアミノ酸レベルの構造変化: アミロイド線維化と細胞毒性への影響 京都大学原子炉実験所・専門研究会 「第 4 回 タンパク質の異常凝集とその防御・修復機構に関する研究会」 (大阪)
14. 定金 豊, 畑中保丸: 部位特異的カルベン発生型 DNA, ペプチド, タンパク質の作製ツールの開発 第 33 回 日本光医学・光生物学会 (2011 年 7 月 23 日, 大阪)
15. 定金 豊, 小山 裕也, 川原 正博: 脳疾

患に関連するペプチド中のアスパラギン  
およびアスパラギン酸残基の構造変化と  
生理活性 第57回日本薬学会東海支部大  
会 2012年7月9日 名古屋

〔図書〕(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.d4.dion.ne.jp/~sadafami/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

定金 豊 (SADAKANE, Yutaka)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：60293304

### (2) 研究分担者

大塚 功 (OHTSUKA, Isao)

九州保健福祉大学・薬学部・准教授

研究者番号：20389589

(2011-2012年)