

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月20日現在

機関番号：14301
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2011年度～2012年度
 課題番号：23770204
 研究課題名（和文） 一分子計測法による複製フォーク DNA 特異的モーター蛋白質の機能解析
 研究課題名（英文） Characterization of Replication fork DNA specific motor proteins using single molecule analysis
 研究代表者
 韓 龍雲（HAN YONG-WOON）
 京都大学・物質-細胞統合システム拠点・助教
 研究者番号：50566297

研究成果の概要（和文）：高精度で蛋白質や DNA の動きを計測、制御できる一分子計測技術を用いて、大腸菌の UvrD という DNA ヘリケースや Holliday 構造 DNA の分岐点移動を促進するモーター蛋白質である RuvB の機能解析を行った。

また DNA 塩基配列特異的に DNA と相互作用する小化合物 Pyrrole-Imidazole polyamide の構造と DNA に対する結合解離速度との関連性を明らかにすることに成功しました。

研究成果の概要（英文）：Single molecule imaging techniques enable us to measure and regulate movements of proteins or DNA. Using these techniques, I characterized E. coli UvrD helicase and RuvB motor protein, which promote branch migration of Holliday junction DNA.

I also measured association and dissociation rates of Pyrrole-Imidazole polyamides and calculated their model structures to clarify the relationship between the DNA binding kinetics and Pyrrole-Imidazole polyamide structures.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA 複製

1. 研究開始当初の背景

DNA 複製、修復、組換えは生物界に普遍的な生命現象でその根本的応機構は種を超えて保存されていて、DNA 修復やゲノムの安定性に重要な働きをするだけでなく、生物に遺伝的多様性を付与し、進化の原動力となります。DNA ヘリケースは二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に巻き戻すモーター蛋白質で、細胞内ではたくさんの種類の DNA ヘリケースが存在し、様々な状況に対応して、それに応じた DNA へ

リケースが働き、細胞分裂や減数分裂における DNA の複製や組換え、紫外線や X 線などの電離放射線や様々な化学物質などで損傷を受けた DNA の修復などにかかせない蛋白質です。

本研究では DNA 複製の中間体である複製フォーク DNA をほどいて行く UvrD DNA ヘリケースと DNA 相同組換えの中間体である Holliday 構造 DNA の分岐点移動の促進に関与するモーター蛋白質である RuvB に注目して、研究を行います。

UvrD は二量体で DNA と結合し、ATP 加水分解により得られたエネルギーを用いて DNA をほどくことがこれまでの生化学的解析から明らかにされています。しかし、一分子の ATP 加水分解により、どれだけの長さの DNA がほどかれるのかは未だ答えが出ていません。

RuvB は六量体のリング構造を二本鎖 DNA 上で形成し、UvrD と同様に ATP 加水分解により得られた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ます。RuvB は DNA、ATP 非存在下では二量体を主要とするオリゴマーですが、ATP とマグネシウムイオン存在下で六量体を形成することが報告されていて、現在の所、RuvB が DNA 上で六量体リング構造を形成する時に二量体 RuvB が 3 つ DNA 上に集まって、リング構造を形成するのか、それとも溶液中の RuvB 六量体リングが DNA で開環して、DNA 上でリング構造をとるのか、現在の所明らかにされていません。このような問題を解明するために、個々の生体分子の動きを直接観察、操作できる一分子計測技術が非常に強力な研究手法であり、本研究でも後述する一分子計測技術を用いて、UvrD や RuvB の機能解析を行いました。

また、本研究では DNA メチル化維持に働くヘミメチル CpG 結合蛋白質である UHRF1 にも注目しました。ヒトにおいては約 70% の遺伝子の上位に CpG が高頻度に現れる CpG アイランドと呼ばれる領域が見られます。CpG のシトシンはしばしばメチル化修飾を受けており、メチル化修飾により、周辺部位はクロマチン構造が凝集したヘテロクロマチン構造をとり、遺伝子発現が抑制されます。従いまして、メチル化 DNA パターンの維持は発生過程における不必要な遺伝子発現の抑制やゲノムインプリンティング等に重要な役割を果たし、DNA 複製後に現れる新生鎖側がメチル化されていないヘミメチル CpG の認識とメチル化されていないシトシンのメチル化はメチル化 DNA パターンを維持する上で、非常に重要です。UHRF1 の生化学的解析や結晶構造解析により、UHRF1 中の SRA ドメインがヘミメチル CpG との相互作用に直接関与していることが明らかにされました。

2. 研究の目的

複製フォーク DNA を基質とする大腸菌の UvrD DNA ヘリケースや DNA 相同組換え中間体である Holliday 構造 DNA の分岐点移動に関与する RuvB やエピジェネティクス制御に関与するメチル化シトシン結合蛋白質である UHRF1 の機能解析を行います。具体的には蛍光標識された高濃度の蛋白質、DNA、ATP 等の一分子イメージングを可能とするナノ開口基板を用いて、解析を行います。そして、得られた結果を元にそれぞれの蛋

白質が関与する生命現象について考察して行きます。

3. 研究の方法

(1) 蛍光標識蛋白質の作製

RuvB と UHRF1 中のヘミメチル CpG 結合ドメインである SRA ドメインについて、蛍光標識蛋白質の作製を行いました。RuvB の蛍光標識においては RuvB にシステイン残基がありませんでしたので、N 末より 39 番目のアミノ酸であるセリンをシステインに置換した変異体 RuvB 蛋白質を作製しました。この変異体 RuvB 蛋白質に 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 Cy5 が結合した Cy5-RuvB 蛋白質を作製しました。また、Cy5-RuvB の活性は野生型 RuvB と大きな違いが無かったことを生化学的解析から確認しました。

SRA につきましては SRA の N 末に Halo Tag と呼ばれる大きさが約 33 kDa のタグ蛋白質を融合させた形で精製し、Halo Tag 特異的に結合する蛍光色素を用いて、Tetra Methyl Rhodamine で標識された TMR-SRA を作製しました。また、その活性は蛍光標識されていない SRA とほぼ同じような活性を持つことも生化学的解析により確認しました。

(2) DNA の作製

本研究で使用する DNA は RuvB の研究においては十字型構造をとる Holliday 構造 DNA を用い、SRA の研究においては裸の DNA と Nucleosome と、それぞれに対する親和性の違いを比較するために Nucleosome 作製において、最も用いられている 601 Sequence と呼ばれる 145 bp の長さの配列を中央部に持つ DNA を用いました。

(3) ナノ開口基板の作製

RuvB や SRA の DNA に対する結合解離を観察されるためには、それぞれの蛋白質濃度が 100 nM 以上である必要がある。これまでの蛍光一分子イメージングで頻りに用いられている全反射照明では、対象となる蛍光標識生体分子の濃度が 50 nM 以上だと溶液中を自由に動き回る蛍光色素からの蛍光がノイズとなり、目的の生体分子の動きを観察することが非常に困難です。従いまして、Cy5-RuvB や TMR-SRA の動きを光学顕微鏡下で観察するために、本研究では次世代 DNA シークエンサーの基幹技術として開発されたナノ開口基板を用いて、解析を行うことにしました。

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す。作製方法は、まず最初に石英ガラス基板上に Negative Photoresist と

呼ばれる電子線照射で固化する物質をコートしました。次に直径が 100 nm となるように電子線を Negative Photoresist がコートされた石英ガラス基板に照射します。その後、このガラス基板を現像することで直径約 100 nm の円柱上の Negative Photoresist が残ります。次のこの上にアルミニウムを蒸着させ、基板上に残った円柱上の Negative Photoresist を有機溶剤で溶かし、ガラス基板から除去することで、直径が 100 nm の穴がアレイ状に並んだナノ開口基板と呼ばれるものが出来上がります。この基板を用いると対象となる蛍光標識生体分子の濃度が数 μM 程度でも蛍光一分子イメージングが可能となります。

4. 研究成果

高精度で蛋白質や DNA の動きを計測、制御できる一分子計測技術を用いて、大腸菌の UvrD という DNA ヘリケースや Holliday 構造 DNA の分岐点移動を促進するモーター蛋白質である RuvB の機能解析を行いました。UvrD は蛍光標識された ATP を加水分解して、二本鎖 DNA をほどくことを確認しました。RuvB 蛋白質については活性を保持した蛍光標識された RuvB の作製に成功し、RuvB の六量体形成過程に関する研究を行いました。RuvB の六量体形成には高濃度の RuvB が必要で、一分子レベルでの解析には新たな一分子蛍光イメージング技術が必要となり、本研究ではナノ開口基板と呼ばれる、次世代 DNA シークエンサーに用いられる技術を応用して、Holliday 構造 DNA 上での RuvB の複合体が形成している様子を観察することに成功しました。また、ADP や ATP γ S 等の様々なヌクレオチドを用いることで、RuvB がどのような状況で、より六量体形成を促進するのかを明らかにすることができました。

また、本研究において、DNA 塩基配列特異的に DNA と相互作用する小化合物 Pyrrole-Imidazole (PI) polyamide を用いた研究を行いました。蛍光標識した PI polyamide を Nucleosome に加えることで部位特異的に Nucleosome を蛍光標識することが可能となり、このような部位特異的に蛍光標識された Nucleosome を用いて、Nucleosome の動的变化を蛍光エネルギー移動効率を指標に解析することに成功しました。また、この研究過程で PI polyamide の構造と DNA に対する結合解離の Kinetics の関連性を明らかにすることに成功しました。

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 3 件)

(1) Ling-Chin Hwang、Anthony G. Vecchiarelli、Yong-Woon Han、Michiyo Mizuuchi、Yoshie Harada、Barbara E. Funnell and Kiyoshi Mizuuchi、ParA-mediated plasmid partition driven by protein pattern self-organization、The EMBO Journal、査読有、32 巻、2013、1238-1249 doi:10.1038/emboj.2013.34

(2) Yong-Woon Han、Tomoko Matsumoto、Hiroaki Yokota、Gengo Kashiwazaki、Hironobu Morinaga、Kaori Hashiya、Toshikazu Bando、Yoshie Harada、Hiroshi Sugiyama、Binding of hairpin pyrrole and imidazole polyamides to DNA: relationship between torsion angle and association rate constants、Nucleic Acids Research、査読有、40 巻、2013、11510-11517 doi:10.1093/nar/gks897

(3) 韓 龍雲、環状ピロロールイミダゾールポリアミドの合成と DNA 認識能、ファルマシア、査読無、48 巻、2012、795

[学会発表] (計 8 件)

(1) Yong-Woon Han、Hiroaki Yokota、Mariko Ariyoshi、Yasuo Tsunaka、Takuma Iwasa、Ryuji Yokokawa、Ryo Hiramatsu、Daichi Chiba、Teruo Ono、Yoshie Harada、Characterization of SRA-mediated DNA complexes dynamics related to chromatin structure regulation、The 2013 Biophysical Society 57th Annual Meeting、2013 年 02 月 01 日～06 日、フィラデルフィア、米国

(2) 韓 龍雲、横田浩章、有吉真理子、津中康央、岩佐拓磨、平松亮、千葉大地、小野輝男、横川隆司、原田慶恵、ナノ開口基板を用いた SRA ドメインのヘミメチル CpG 認識機構の解析、2013 年生体運動研究合同班会議、2013 年 01 月 12 日～14 日、広島大学

(3) 韓 龍雲、横田浩章、松本朋子、森永浩伸、柏崎玄伍、橋谷かおり、坂東俊和、原田慶恵、杉山 弘、GCGC 配列を認識するヘアピン型ピロロールイミダゾールポリアミドの DNA に対する親和性はピロロールを β -アラニンに置換することで向上する、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日～14 日、福岡国際会議場

(4) Mizuuchi Kiyoshi, Anthony G. Vecchiarelli, Ling-Chin Hwang, Keir Neumann, Yong-Woon Han, Arianna Biesso, Vassili Ivanov, Yoshie Harada, Barbara E. Funnell, Plasmid partition and cell division control via ATP-driven protein distribution pattern self-organization on bacterial intracellular surfaces、第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11日～14日、福岡国際会議場

(5) Yong-Woon Han, Yoshie Harada, Characterization of protein-DNA complexes dynamics related to chromatin structure regulation using single-molecule techniques、第50回日本生物物理学会年会、2012年09月22日～24日、名古屋大学

(6) 韓 龍雲、松本朋子、横田浩章、柏崎玄伍、森永浩伸、橋谷かおり、坂東俊和、杉山弘、原田慶恵、DNA 塩基配列特異的に結合する小化合物 Pyrrole-Imidazole Polyamide における Pyrrole と Imidazole の構造学的特徴、2012年生体運動研究合同班会議、2012年01月06日～08日、筑波大学

(7) Yong-Woon Han, Ling-Chin Hwang, Anthony G. Vecchiarelli, Michiyo Mizuuchi, Barbara E. Funnell, Yoshie Harada, Kiyoshi Mizuuchi, Direct observation of P1 plasmid movement on an optical microscope、第49回日本生物物理学会年会、2011年09月16日～18日、兵庫県立大学

(8) Takuma Iwasa, Yong-Woon Han, Hiroaki Yokota, Ryuji Yokokawa, Yoshie Harada, Single-molecule visualization of a AAA+ DNA recombination ATPase with zero-mode waveguides toward elucidation of its hexamer formation、第49回日本生物物理学会年会、2011年09月16日～18日、兵庫県立大学

[その他]

ホームページ等

http://www.harada.icems.kyoto-u.ac.jp/member/mem03_han.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

韓 龍雲 (HAN YONG-WOON)

研究者番号：50566297

(2) 研究協力者

岩佐 拓磨 (IWASA TAKUMA)