

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 7 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24651151

研究課題名(和文)電子顕微鏡による超分子複合体の構造解析用新規ラベル技術の開発

研究課題名(英文)Development of novel labeling technique for macro molecule structure analysis

研究代表者

真柳 浩太(Mayanagi, Kouta)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：50418571

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：超分子複合体の構造を電子顕微鏡による単粒子解析によって解析し、各構成因子の位置を同定する際、分子標識技術が大変重要となる。本研究課題においては、生物学的に大変に重要な、DNA結合蛋白質から構成される超分子複合体に着目し、特に複合体中のDNA末端の位置を可視化する新規標識の開発を行った。DNAの高次構造が容易に設計可能である性質を利用し、その形状から精度良く位置を同定する方法と、微小な、しかし電子顕微鏡で識別可能な高次構造を利用することで可視化する方法を試みた。両者の場合において標識本体の可視化に成功し、特に実用性が認められた後者に関しては、実際に複合体を用いた可視化実験にも成功した。

研究成果の概要(英文)：Molecular labeling is a key technique for mapping individual components in the 3D map of supermolecules, obtained by single particle analysis. We developed novel methods of labeling DNA in the DNA-protein complexes, which are biologically very important. We used streptavidin in our previous work, which was too large (about 60k for tetramer) for more detailed analysis. In this project we tried mainly two methods. The first uses the nano structures of DNA for labeling. Using the pinpoint shape of the nano-structure, we could develop a label, which could point the DNA terminal more precisely. Another label is a small bulky structure, the size of which is comparable to the resolution of the single particle analysis. As the second method seemed to be more promising, we applied the later method to the protein-DNA complexes labeling experiment, and could successfully visualize the label in the total map of the complex.

研究分野：複合新領域

キーワード：電子顕微鏡 ナノバイオ 可視化 生物物理 蛋白質 DNA 分子標識 画像解析

1. 研究開始当初の背景

DNA 結合蛋白質は多数集まることで巨大な複合体を形成し、DNA の複製や修復、転写など様々な重要な生命現象に関わる。電子顕微鏡はこのような超分子複合体の解析に大変適している。これまで、解析によって得られた複合体全体の構造中に個々の因子の原子モデルを当てはめる際、それぞれの因子にラベル(標識)を導入することで、その位置を特定する手法が度々用いられてきた。特に DNA の位置は DNA 代謝の機構を考察する際、特に重要となる。

我々は過去に DNA の複製を行う複合体中で、一般的に可視化が難しい一本鎖 DNA の末端をピオチン化し、そこにストレプトアビジンを付加することで、標識することに成功した(Mayanagi *et al*, *PNAS*, 2011)。しかしながら分子量 60k 近くにもなるストレプトアビジン 4 量体は必要以上に大きく、より高い精度で位置決定が可能な新規標識技術の必要性も実感した。またストレプトアビジンは 4 量体であるため、複数の結合部位があるため、アグリゲーションの生成等の問題も生じ易い。その他、蛋白質よりもコントラストが得られる標識として、金クラスター等が用いられてきており、最近では量子ドットの応用なども注目されている。しかしながらこれらの標識等もリンカーも含めたサイズが単粒子の目指す分解能に比して大きいという、画像解析において蛋白質とのコントラストの差が大きく、特に負染色の場合は反転してしまう等の問題もある。このように、研究開始当初、より適切な標識法の開発が望まれる状況にあった。

2. 研究の目的

電子顕微鏡は、結晶構造解析のみでは解析が困難な、巨大な超分子複合体の立体構造を解析する手段として大変に有効である。しかしながら対象とする複合体が複雑になるにつれ、各々の構成因子の複合体中における位置を同定することが困難になってくる。その際、適当なラベル(標識)を付加することで対象とする因子を可視化することができる。本研究では、生物学研究の上で非常に重要な DNA 結合蛋白質から構成される複合体中の、DNA の新規標識技術の開発を行う。

2 通りの方法を検討する。第 1 はこれまで申請者等が用いていたものより小さい標識物で位置精度を向上させる方法である。第 2 の方法はこれまでより逆に大きい標識を用いるが、標識の形状を先鋭化させることで、標識部位をピンポイントで同定する。共に DNA の自己組織の性質を利用したものであり、設計がし易いので、形状を変えることで標識としての最適化を図る。このように、超分子複合体を解析する上で、簡便で応用範囲の広い、新規標識技術を開発することが本実験の目的である。

3. 研究の方法

(1) 標識の選定

2 通りの方法を検討する。第 1 はこれまで申請者等が用いていたものより小さい標識物で位置精度を向上させる方法である。第 2 の方法はこれまでより逆に大きい標識を用いるが、標識の形状を先鋭化させることで、標識部位をピンポイントで同定する。両者とも単粒子解析で得られる 1nm から 2nm 程度の分解能を想定して形状を選定する。

(2) 標識の作成・精製

両者とも、先ず標識として用いる構造体を形成させ、電気泳動法やゲル濾過法などで目的物の形成を確認し、電子顕微鏡によって構造を確認する。

(3) 標識の単粒子解析

標識の形成が確認されたものについては実際に複合体の標識に使用し、電子顕微鏡によって標識を導入した複合体を観察、単粒子解析に必要な像を多数記録する。得られた標識単独、あるいは標識化複合体を単粒子解析法により解析し、平均像及び立体構造を計算し、標識の可視化を試み、標識としての有効性を検討した。

4. 研究成果

これまで利用していたストレプトアビジンによる標識は、ストレプトアビジンが 4 量体を形成し、全体で分子量 6 万近くにもなり、必要以上に大きいため、より小さい標識物を検討した。単粒子解析の分解能を考慮した上で最適なサイズの高次構造体を形成する配列の DNA を末端に付加することで、より精密に位置を同定できる標識の開発を試みた。NMR によって球状の DNA 高次構造を形成することが確かめられている DNA トリプレット繰り返し配列を標識として選定した。

(1) アレイ状構造体の解析

先ずは電子顕微鏡で直視した際の標識物単体の視認性を考慮して、上記構造体を 10bp の DNA 2 重鎖の両端につなげたアレイ状 DNA を作成し電子顕微鏡にて観察した。その結果、予想されるアレイ状構造を明確に確認することができた。この際、視認性を向上させるため、ポジティブ染色になるように染色条件を選んだ。構造データバンクに登録されているこの DNA トリプレット繰り返し配列が作る高次構造体の原子モデルから、計算機によって 2 次元投影像を計算し、上記の構造体の電子顕微鏡像と比較したところ、アレイの球状部分の大きさと極めて良く一致し、また球状部分の間の直線状部分も 10bp の DNA の長さと同様に良く一致した。

以上のことから、電子顕微鏡の観察下の溶液条件で確かに予想どおりの構造体が形成していること、且つそれが電子顕微鏡で十分可視化可能であることが明らかになった。

(2) 蛋白質-DNA複合体への応用

本構造体をDNA 2重鎖の片側に付加したものをDNAの回りに3量体リングを形成する蛋白質PCNAと混合して観察した結果、リングの片側のみに高次構造に相当する密度が確認できた。このことにより、本標識が複合体の解析に際して有効に活用できることを示すことができた。

(3) DNAナノ構造体の応用

一方で、上記の微小DNA構造体程には小さくはないものの、形状を利用して、従来の標識よりもピンポイントで位置を同定できる標識法にも取り組んだ。正四面体状の高次構造を形成する合成オリゴDNAを混合、再構成した構造体をゲル濾過によって精製して電子顕微鏡を用いて観察した。その結果、単に混合及びアニーリングを行っただけでは、凝集体などの混合物の混在が甚だしく、ゲル濾過の過程は必須であることが分かった。単粒子解析法を用い、この構造体の電顕画像より立体構造を解析したところ、配列から予想される正四面体状の構造体の形成を確認できた。この構造体を標識として用いる際には、DNAのニックの位置を変更する必要がある。この変更により、構造体と同様に形成されるか否かは自明ではないため、確認する必要がある。単粒子解析の結果、ニックの位置を変更した後も、同一の構造体の形成を確認することができた。更に構造体から、目的蛋白質の基質となる形状をもつDNAを伸展させて単粒子解析で解析した結果、設計どおりに平均像において構造体から伸展させたDNA 2重鎖を可視化することに成功した。

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 1 件)

Kozo Takeuchi, Tatsuya Nishino, Kouta Mayanagi, Naoki Horikoshi, Akihisa Osakabe, Hiroaki Tachiwana, Testuya Hori, Hitoshi Kurumizaka, Tatsuo Fukagawa. The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA. *Nucleic Acids Research* 42(3):1644-1655. (2014). DOI: 10.1093/nar/gkt1124

[学会発表](計 10 件)

真柳 浩太 DNA複製フォーク複合体の分子構築及び切換え機構の研究、タンパク質研究所セミナー、(2014, 2/7-8)大阪.

Hiromi Ogino, Sonoko Ishino, Kouta Mayanagi, Takuji Oyama, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa, Gyri Teien Haugland,

Nils-Kåre Birkeland, Daisuke Kohda, Yoshizumi Ishino. Divergently evolved activation mechanism of the replicative helicase in the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. 第36回日本分子生物学会、(2013, 12/3-6)神戸

真柳 浩太 DNA複製に關与する超分子複合体の単粒子解析、日本顕微鏡学会第57回シンポジウム、(2013, 11/15-16)名古屋.

尾木野 弘実, 石野 園子, 真柳 浩太, 大山 拓次, 白井 剛, 森川 耿右, Haugland Gyri Teien, Birkeland Nils-Kare, 神田 大輔, 石野 良純, 好熱性アーキア *Thermoplasma acidophilum* における複製ヘリカーゼ活性化機構の分岐進化. 第14回極限環境生物学会、(2013, 10/26-27)川崎.

Hiromi Ogino, Sonoko Ishino, Kouta Mayanagi, Takuji Oyama, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa, Gyri Teien Haugland, Nils-Kare Birkeland, Daisuke Kohda, Yoshizumi Ishino. Activation mechanism of the replicative helicase in the thermophilic archaeon, *Thermoplasma acidophilum*. *Thermophiles* 2013, (2013. 9/8-13) Regensburg, Germany.

Kouta Mayanagi, Electron microscopic structure analysis of protein-DNA complexes. The 3rd International conference on New Frontier of the Research on RecA-family recombinases and their accessory proteins, (2013, 10/3-5) Nantes, France

Kouta Mayanagi, Shinichi Kiyonari, Hirokazu Nishida, Sonoko Ishino, Mihoko Saito, Daisuke Kohda, Yoshizumi Ishino, Tsuyoshi Shirai, Kosuke Morikawa, Electron microscopic analysis of molecular architecture and switching mechanism of DNA replication fork complex. ICSG2013-SLS, (2013, 7/30-8/1) Sapporo.

Kouta Mayanagi, Molecular architecture and switching mechanism of DNA replication fork complex. Gordon Research Conference, Three Dimensional Electron Microscopy, (2013, 6/23-28) Colby-Sawyer College, USA.

尾木野 弘実, 石野 園子, 真柳 浩太, 大山 拓次, 白井 剛, 森川 耿右, Gyri Teien Haugland, Nils-Kare Birkeland, 石野 良純, *Thermoplasma acidophilum*

由来 Cdc6/Orc1 とホモ 4 量体の GINS による MCM との相乗的な活性化. 第 35 回日本分子生物学会年会, (2012, 12/11-14) 福岡

真柳 浩太, 単粒子解析による複製関連複合体の制御機構の研究. 遺伝研研究集会, (2012, 10/3-4),

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

真柳 浩太 (MAYANAGI, Kota)
九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号：50418571

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

石野 良純 (ISHINO, Yoshizumi)
九州大学・農学研究院・教授
研究者番号：30346837