

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650056

研究課題名(和文) 自閉症の病態解明を目指した核酸結合タンパク質に対する一分子力学計測法の開発と応用

研究課題名(英文) Single molecule force measurement of nucleic acid binding proteins for understanding autism

研究代表者

田中 元雅 (Tanaka, Motomasa)

国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・チームリーダー

研究者番号：40321781

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)：タンパク質は溶液中で不均一な構造を取っているが、その不均一さの実測定は技術的に難しいため、タンパク質のコンフォメーション空間には不明な点が多い。本研究では、一分子力学計測法を核酸結合タンパク質へは適用するため、一分子を捕捉する取っ手として通常用いられるDNAではなくポリエチレングリコールを用いて、光ピンセットを用いた核酸結合タンパク質に対する一分子力学計測を可能にする実験系を新規に構築した。

研究成果の概要(英文)：Protein dynamically fluctuates in solution and adopts various distinct conformations. However, the measurement of such conformational heterogeneity of protein is technically difficult and the determination of a conformational space of protein is challenging. So far, single molecule force measurement with optical tweezers is a promising technique to address it, but it is not easily applied to nucleic acid proteins because the single protein molecule is tethered by a DNA handle linker which may alter a conformational space of the captured nucleic acid protein. In this study we developed a novel method of single molecule force measurement, using polyethylene glycol as a handle for single molecule of nucleic acid proteins.

研究分野：構造生物学

キーワード：一分子 タンパク質構造 力学計測

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の構造は、X線結晶解析を行うことで原子レベルという高分解能で得ることができる。しかし、それは静的なタンパク質構造であり、実際は、タンパク質は溶液中で不均一な構造を取っており、様々な構造は随時、揺らいでいる。そのタンパク質が取り得る、様々なコンフォメーションの広がり、コンフォメーション空間は、リガンドなどの結合タンパク質との相互作用に重要な役割を果たすと考えられる。

しかし、タンパク質の構造解析の手法は、様々な不均一な構造の平均構造を測定する手法が多く、技術的な難しさから、タンパク質のコンフォメーション空間や、それが、リガンドなどの結合タンパク質との相互作用に与える影響はほとんど理解されていない (Wright *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2009; Kaiser *et al.*, *Science*, 2011; Bustamante *et al.*, *Annu Rev Biophys.*, 2014)。申請者はこれまでに、タンパク質の構造空間やエネルギーマップの実計測を目指し、タンパク質一分子の両側を約 500 塩基対の二本鎖 DNA のハンドルで繋げた DNA-タンパク質-DNA 複合体を、光ピンセットで引き伸ばし、それに伴う力学計測を行う実験系を構築してきた。

この一分子力学計測法はコンフォメーション空間を実計測できる点で画期的である。しかしながら、タンパク質を操作するための取っ手に DNA ハンドルを用いている。そのため、その DNA ハンドルが意図せずに相互作用してしまう可能性のある核酸結合タンパク質へは適用できないという欠点があり、それは光ピンセットを用いたタンパク質一分子力学計測法の課題であった。

2. 研究の目的

本研究では、一分子力学計測法が核酸結合タンパク質へは適用できないという制限を克

服するため、光ピンセットを用いた核酸結合タンパク質の一分子力学計測を可能にする実験系を新規に開発し、その手法を、発達障害で治療法がない自閉症に関連する RNA 結合タンパク質および DNA 結合タンパク質へ応用する。まずは、一分子力学計測を行うことができるという実績のある酵母由来のタンパク質である Sup35NM を用いて、一分子タンパク質試料作成法の最適化を行い、その後、本手法によって自閉症に関連するタンパク質のコンフォメーション空間を明らかにするとともに、タンパク質内のドメイン間の協調性の存在を明らかにすることを目指す。さらには、RNA や DNA との結合に伴う一分子の構造変化をモニターできる測定回路系を構築し、その結合に伴うタンパク質の揺らぎや自由エネルギーの変化を実計測することを目指す。

以上から、“タンパク質の揺らぎや構造の不均一さ”という新しい観点からの自閉症の発症機構の解明を目的とする。

3. 研究の方法

タンパク質一分子に結合させるリンカーとその修飾がまずは必要となる。そこで最初に、システインとビオチンまたはジゴキシゲニンを片端もしくは両端にもつポリエチレングリコール(PEG)鎖を調製した。このとき、どの長さのPEGが一分子力学計測に最も適しているかについて検討を行うために、異なる長さをもつPEG鎖を用いて調製を行った。次に、PEGと、遺伝子変異が自閉症に関与することが知られているDNAまたはRNA結合タンパク質に対して、アミノ末端とカルボキシル末端に新たに遺伝子操作で導入したシステイン残基を介して結合させる。そのため、まずはモデルタンパク質として、これまで当研究室で一分子力学計測を行うことができるという実績のある、酵母由来のプリオンタンパク質である Sup35NMを用いて、一分子力学計測に資するタ

ンパク質-PEG複合体の調製の最適化を行うこととした。

まずはアミノ末端とカルボキシル末端にシステムを持つSup35NM変異体が大腸菌で発現させ、イオン交換カラムクロマトグラフィーなどで高度に精製を行った。そこで、そのSup35NM変異体を使用し、PEG鎖に結合させたビオチンを介してポリスチレンビーズに結合させ、そのビーズをマイクロピペットで固定した。もう片方もジゴキシゲニン/ジゴキシゲニン抗体を介してビーズと結合させ、このビーズをレーザー光ピンセットによってトラップした。タンパク質一分子を光ピンセットによって引っ張り、その後、自発的に元に戻すという操作を行い、タンパク質のコンフォメーション空間の解明を試みた。

4. 研究成果

タンパク質一分子を引っ張る際には通常、二本鎖DNAをタンパク質に結合させ、取っ手として用いるため、DNAおよびRNA結合タンパク質に対しては本手法を用いることができない。そこで、本研究ではハンドルとして、安定で比較的柔軟性の高いポリエチレングリコール(PEG)鎖に着目し、複数の異なるPEG鎖を用いて、まずはモデルタンパク質である酵母由来のSup35NMの両端にシステムを介して結合させた。それによって、二本鎖DNAを含まずに、PEGを取ってとして、Sup35NMタンパク質を引っ張ることができるSup35NM一分子-PEG複合体を調製し、そのSup35NMタンパク質一分子に対して、光ピンセットを用いて力学計測を行った。その結果、光ピンセットで効率的に捕捉するために、また、その後の一分子力学計測のために、PEGに共有結合している方のビーズの性質が極めて重要であることが示唆された。

次に、これらの知見から、異なる性質をもつビーズや、さらに長さの異なる複数のPEGをモデルタンパク質の両端に結合させる一分子を

新たに設計した。まず、タンパク質の片側を、PEGを共有結合してあるビーズに結合させ、もう片方を、ビオチンを介してビーズに結合させた複数のPEG-Sup35NM一分子複合体を構築し、力学計測を行った。様々な反応条件や力学計測の条件を検討し、また、原子間力顕微鏡によるその複合体の詳細な観察なども行った結果、PEGに共有結合している方のビーズの形状や性質に問題があるために、光ピンセットによる捕捉が不安定になってしまい測定が難しいことが明らかになった。

そこで、タンパク質の両端にPEGをもつ一分子の構築のため、ビーズに既に共有結合しているPEGを用いる代わりに、PEGの末端に結合させたジゴキシゲニンを介して、そのPEGと抗ジゴキシゲニンをもつ球状のビーズを結合させて、PEGを取っ手としたPEG-Sup35NM一分子を新たに設計し、合成を行った。その結果、両端にPEGをハンドルとした新たな一分子実験系を構築することができた。

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔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〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 元雅 (Motomasa Tanaka)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・チームリーダー

研究者番号：
40321781

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：

(4) 研究協力者

小見 悠介 (Komi Yusuke)
国立研究開発法人理化学研究所・脳科学総合
研究センター・研究員
20565999

志田 俊信 (Shida Toshinobu)
東京工業大学大学院・生命理工学研究科・大
大学院生