

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26810084

研究課題名(和文) DNA修復酵素による傷害部位の効率的な認識機構の解明

研究課題名(英文) Efficient reaction mechanism to detect lesion sites in DNA by repair enzymes

研究代表者

矢澤 健二郎 (Yazawa, Kenjiro)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号：70726596

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)：DNAのハイブリダイゼーションは生命の根本に関わる重要な反応であり、これまでその平均挙動が観察されてきたが、一分子レベルでの知見は少なかった。本研究では、8 mer, 12 mer, PolyA-PolyTの3種類のDNAのハイブリダイゼーションを全反射蛍光顕微鏡で一分子観察した。その結果、8 merのDNAのハイブリダイゼーションは単一段階を経て進行する一方、12 merとPolyA-PolyTについては3つの段階が存在することが分かった。12 merについては末端がほぐれた形で相互作用し、PolyA-PolyTについては掛け違い過程が存在し、これらは平均挙動観察では得られない知見である。

研究成果の概要(英文)：DNA hybridization is a fundamental reaction for our lives. To date, ensemble measurement is the major stream to detect a hybridization reaction and little is known about the hybridization at a single-molecule level. In this study, we monitored the hybridization of DNAs, including 8 mer, 12 mer, and PolyA-PolyT, at a single-molecule level by using total internal reflection microscopy. As a result, we found that the hybridization of 8 mer proceeded through a single step, whereas the hybridization of 12 mer and PolyA-PolyT proceeded through three multiple steps. In the case of 12 mer, the hybridization initialized with its end suspended. On the other hand, the hybridization of Poly-PolyT showed the dangling behavior and continued to attach or detach to each other. Therefore, single-molecule measurement in this study contributed to understand the details of the DNA hybridization, which will be of great use for the DNA-related reactions such as DNA repairing.

研究分野：生体関連化学

キーワード：全反射蛍光顕微鏡 DNAハイブリダイゼーション 一分子観察 水晶発振子マイクロバランス アンサンブル

1. 研究開始当初の背景

DNA は酸化ストレスなどによって損傷が引き起こされ、通常は DNA 修復酵素による速やかな修復が行われるが、まれに修復が起こらない場合は疾病の原因となる。そのため DNA 修復酵素は多くの種で保存され生命維持に必須であるが、細胞内での存在数が非常に少ないことが注目されている。細胞内のゲノム遺伝子に存在する膨大な数の塩基対の中で傷害部位のみを認識するためには高効率な認識機構が存在すると予測され、その認識機構には DNA 鎖の塩基の  $\pi$  電子系の電荷移動現象と DNA 修復酵素に存在する [Fe-S] クラスターが関与していると考えられ、図 1 のような DNA 修復酵素の傷害部位認識モデルが提案されている。

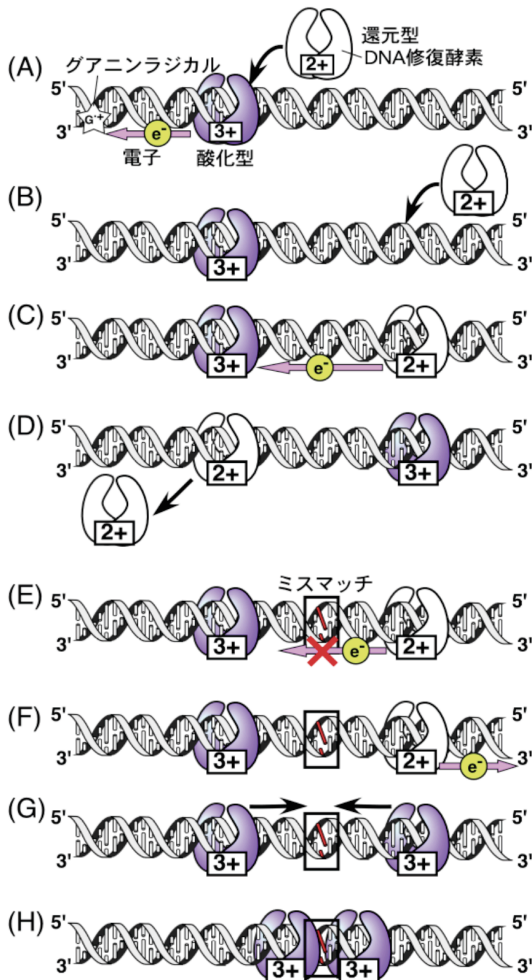


図 1 : DNA 修復酵素の傷害認識モデル

その詳細は、(A)酸化ストレスにより生じたグアニンラジカルは DNA 修復酵素によって還元される。酸化型となった酵素は DNA との結合性が向上する。(B)他の酵素が DNA 鎖に近づき、(C)酵素間で電荷移動が起こる。(D)元の酵素は還元され DNA から遊離する。(E~G)ミスマッチが存在する場合、酵素間の電荷移動が進行せず、(H)ミスマッチ傷害部位近傍に酵素が集積し DNA の修復を開始する。

しかし、このモデルは証明されておらず、DNA 修復酵素による傷害部位の認識過程をリアルタイムで観察することが重要である。

2. 研究の目的

そのため図 2(A)の基板表面近傍の蛍光分子の挙動を一分子観察できる全反射蛍光顕微鏡を利用して、DNA 鎖と DNA 修復酵素を蛍光分子で標識し、図 2(B)のように DNA 修復酵素が傷害部位を認識し、DNA 鎖上を移動する過程をリアルタイムで観察できると考えられる。

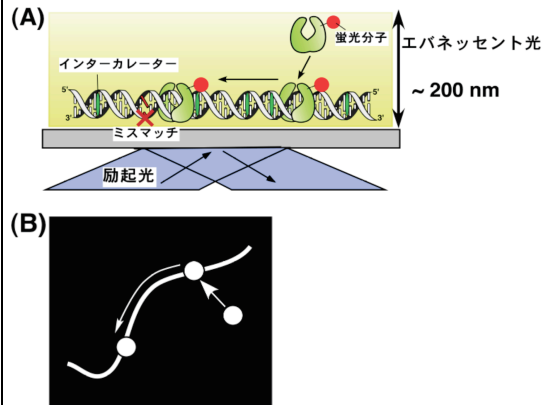


図 2 : (A)全反射蛍光顕微鏡を用いた実験系の構築、(B)予想される観察画像

さらに図 3(A)に示した基板上でのレセプターとリガンドの結合を振動数変化としてリアルタイム検出可能な水晶発振子質量センサを用いて、DNA 修復酵素の DNA 傷害部位の結合動力学を明らかにできると考えた。図 3(B)のように DNA 修復酵素の酸化状態による DNA との結合性の差を評価したい。

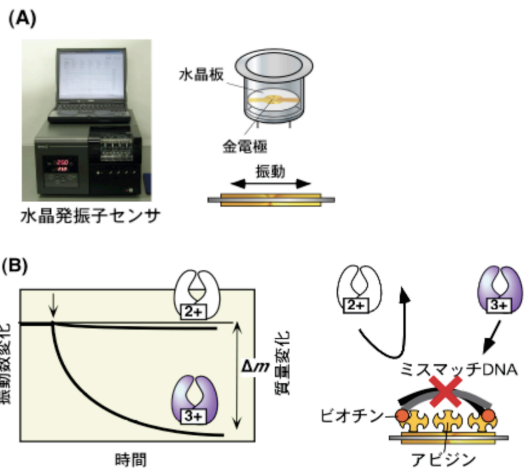


図 3 : (A)水晶発振子質量センサ(B)酸化型の DNA 修復酵素と DNA 鎖の結合

3. 研究の方法

DNA 修復酵素の認識の前段階として、全反射蛍光顕微鏡のガラス基板上への DNA の固定化方法の検討を行った。ガラス基板をアビジン

で修飾し、ビオチン化 DNA を添加することで、アビジン-ビオチン相互作用で基板上に固定化させる (図 4)。

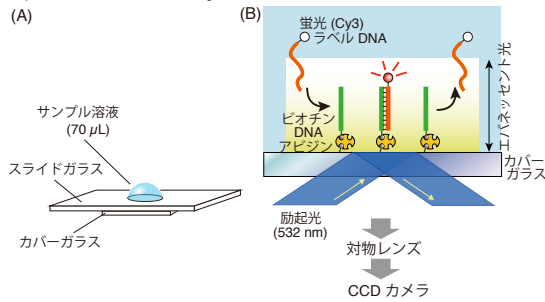


図 4：全反射顕微鏡を利用した DNA ハイブリダイゼーションの観察系

具体的には図 5 に示したように、基板を洗浄後、APTES で基板表面にアミノ基を提示させ、NHS-PEG ビオチンを共有結合で基板に固定化する。その後、アビジンを添加し基板上に固定化後、ビオチン化 DNA をアビジン-ビオチン相互作用で固定化し、蛍光分子 Cy3 修飾 DNA を添加し、ハイブリダイゼーションに伴う輝点の発現と解離に伴う輝点の消失を全反射蛍光顕微鏡で観察した。結合時間と輝点数の関係から、結合・解離速度定数を算出した。DNA には 8 mer、12 mer、PolyA-PolyT の 3 種類を用いた。

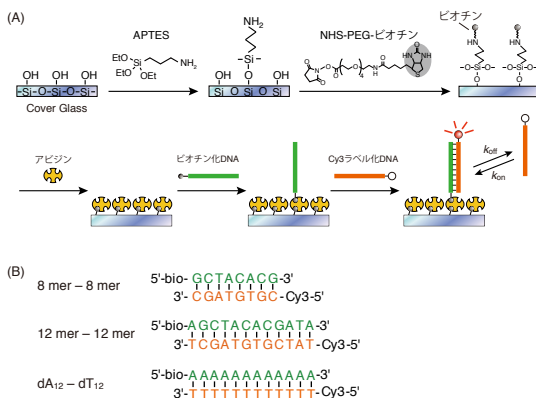


図 5：アビジン固定化ガラス基板上へのビオチン化 DNA の固定化スキーム

#### 4. 研究成果

全反射蛍光顕微鏡を用いた 8 mer, 12 mer, PolyA-PolyT のそれぞれのハイブリダイゼーションの結果を図 6 に示した。8 mer に関しては、100 秒程度の基板への結合に由来する輝点が観察され、12 mer に関しては 8mer よりも長い 2000 秒以上基板に結合している輝点も観察された。PolyA-PolyT に関しては、種々の結合時間の輝点が観察された。

DNA の結合時間と粒子数の関係を図 7 に示した。8 mer のハイブリダイゼーションについては、単一の結合解離モードに由来する解離速度定数が得られた。12 mer については、2 種類の解離速度定数、PolyA-PolyT につ

ては 3 種類の解離速度定数が得られた。12 mer と PolyA-PolyT の解離速度定数について同一のモードの中で、10 倍程度の値の異なる解離速度定数が得られた。

得られた動力学定数を基に、DNA のハイブリダイゼーション過程の考察を行った (図 8, 表 1)。8 mer-8 mer については、単一の相互作用様式でハイブリダイゼーションを行う。一方で、12 mer の場合は末端がほぐれた形でハイブリダイゼーションする。PolyA-PolyT については、掛け違い現象を経てハイブリダイゼーションする。これら得られた知見は、従来のアンサンブル測定では一分子観察法であるからこそ得られた知見であり、今後の DNA 修復酵素の DNA 認識メカニズムを調べる上で、有益となると考えられる。

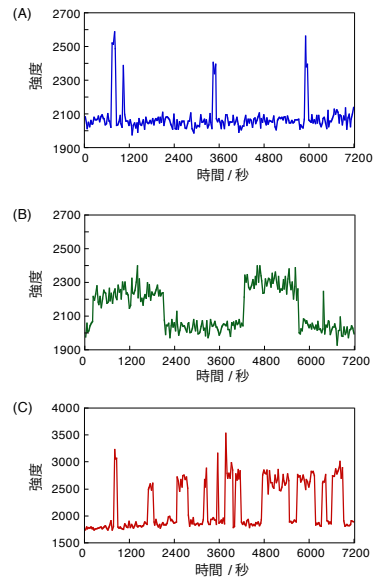


図 6：DNA ハイブリダイゼーション過程の一分子観察における蛍光強度の変化 (A) 8mer, (B) 12 mer, (C) PolyA-PolyT

表 1：本研究で得られた一分子観察における動力学パラメータと QCM で算出したアンサンブル観察におけるパラメータ

DNA	TIRFM				QCM	
	$k_{\text{off}}^{(1)}$ / $10^4 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{off}}^{(2)}$ / $10^4 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{off}}^{(3)}$ / $10^4 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{off}}^{(\text{Av})}$ / $10^4 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{off}}$ / $10^4 \text{ s}^{-1}$	$k_{\text{c}}$ / $10^2 \text{ s}^{-1}$
8 bp	111 ± 17 (100%)	—	—	111 ± 17	290 ± 86	76 ± 53
12 bp	37 ± 7 (90%)	10 ± 3 (10%)	—	18 ± 2	7 ± 4	27 ± 15
d(A·T) <sub>12</sub>	43 ± 5 (52%)	18 ± 2 (41%)	11 ± 2 (7%)	27 ± 7	520 ± 151	153 ± 48
Control DNA	—	—	—	—	—	52 ± 2

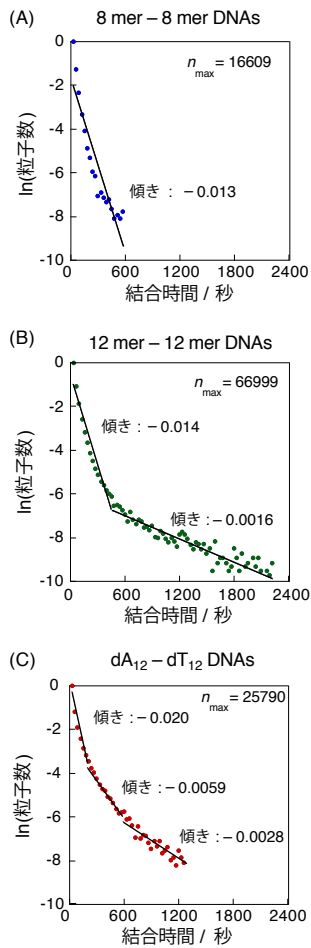


図 7: DNA の結合時間と粒子数の関係。タイムラプスは 30 秒で測定した。

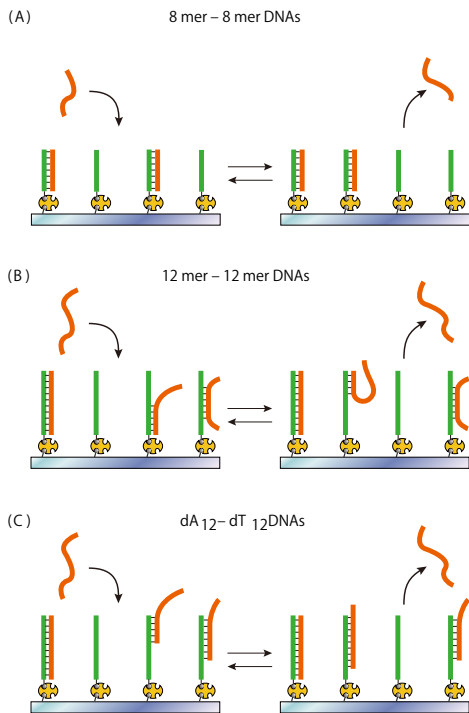


図 8: 本研究で得られた結果から考察される DNA ハイブリダイゼーション挙動

## 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 1 件)

○古澤 宏幸・矢澤 健二郎・岡畑 恵雄, 全反射蛍光顕微鏡を用いた DNA 二重鎖形成の分子動力学, 第 24 回バイオ・高分子シンポジウム, 東京工業大学大岡山キャンパス(東京都目黒区), 2014 年 7 月 25 日

[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

矢澤 健二郎 (YAZAWA, Kenjiro)

理化学研究所・環境資源科学研究センター・特別研究員

研究者番号: 70726596

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: