

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840045

研究課題名(和文)新規単分子蛍光観察法によるがん抑制因子p53のDNA探索機構の解明

研究課題名(英文)Single-molecule characterization of target DNA search of tumor suppressor p53

研究代表者

鎌形 清人(Kamagata, Kiyoto)

東北大学・多元物質科学研究所・助教

研究者番号：90432492

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)：p53はDNAのある部位(標的配列)へ結合することで、細胞のがん化を防ぐ。本研究では、p53の標的配列への結合の仕組み、及び、p53の特定の構造を持たない変性領域の役割の解明を行った。p53がDNA上を動く過程を一分子ごと計測した結果、標的DNA配列への結合の確率が低く、p53の修飾により結合確率が制御されることが明らかとなった。さらに、変性領域が長くなると、p53がDNAの配列を識別できなくなることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：p53 can prevent DNA. the cancer of a living cell by binding to a part of DNA (target). In this study, we investigated the mechanism in which p53 searches and binds to the target and the role of disordered region of p53. We measured the movement of p53 along DNA. We found that p53 has a low target recognition probability (TRP) and regulates TRP by posttransmodifications of p53. Furthermore, we found that elongation of the disordered region of p53 caused the loss of specific binding to DNA.

研究分野：蛋白質科学、生物物理学

キーワード：蛋白質 DNA 1分子計測

1. 研究開始当初の背景

がん抑制蛋白質 p53 は、特定の構造を持たない変性領域を持つ、天然変性蛋白質である。これまで、蛋白質は特定の構造に折り畳むことで機能を持つと考えられてきた。近年、p53 のような天然変性蛋白質の変性領域が特定の構造をとらないにも関わらず、機能を持つと考えられるようになってきたが、依然不明な点も多い。特に、変性領域は、複数の機能部位による高次の機能発現に関与し、がんなどの疾患にも関わっている。

2. 研究の目的

本研究では、天然変性蛋白質のモデルとして p53 を選び、以下の点に着目し、変性領域が機能を生み出す仕組みの解明を行った。

(1) p53 の機能の 1 つは膨大なヒト DNA の中から、標的配列を探し出し結合することである。正確に、しかも、素早く探索する機構が考えられる。そこで、p53 が DNA 上の標的配列に結合する“正確さ”を明らかにした。

(2) 細胞内では、p53 が探索を行う DNA 上に、他の DNA 結合蛋白質やヒストンなどの DNA 障害物が存在する。p53 はその障害物を回避し、効率的な探索を行うと考えられる。1 つの方法として、DNA 上のある部位から別の部位へ移動する“セグメント間移動”がある。そこで、単分子実験法を開発し、p53 のセグメント間移動の有無を検証した。

(3) p53 の変性領域の長さは異なる生物間で保存されている。p53 の機能における変性領域の長さの役割を調べた。

3. 研究の方法

(1) p53 の標的配列を含む DNA を作製し、基板上に固定化した。全反射蛍光顕微鏡を用いて、蛍光色素修飾した p53 が標的配列に結合する過程を観測し、その結合確率（正確さ）を定量化した。さらに、活性化変異体と不活性化変異体を作製し、p53 がその変異や翻訳後修飾によりその正確さを調整できるかどうかを調べた。

(2) フローの圧力により DNA の伸縮を制御する実験系を開発した。さらに、開発した実験系を用いて、p53 のセグメント間移動時に生じる DNA のループを計測した。

(3) 2 倍や 3 倍の変性領域を持つ変異体を作製し、蛍光偏光分光器を用いて各変異体の DNA への結合を調べた。さらに、各変異体の DNA 上での動きを調べるため、単分子計測を行った。

4. 研究成果

(1) p53 の結合確率は 10%であった。これまでの理論的な研究で仮定した 100%の結合確率と比べて、非常に低いことが明らかとなった。さらに、活性化変異体では結合確率が上がり、がん化変異体では結合確率が下がった。一方、探索運動の拡散係数は変異により変化しなかった。このように、結合確率と機能と

の相関から、p53 の標的配列への結合確率が主に機能を制御すると考えられる。

(2) 各変異体の DNA 結合に関して、野生型では明確な配列特異性があるが、長さを変えた変異体では配列特異性がないことが明らかとなった。一方、DNA 上の“動き”に関して、長さを変えた変異体は野生型とほぼ同程度の拡散運動であった。以上の結果から、変性領域の長さは、DNA 結合の配列特異性のみに影響を与えることが分かった。

(3) p53 の存在下で、DNA の曲げ伸ばしを行うと、徐々に DNA が縮んでいく様子が観測された。これは、p53 が DNA の 2 か所に同時に結合し、DNA のループ構造を作るためと解釈できる。この結果は、セグメント間移動の証拠とも考えられるが、p53 が DNA のループを形成した後でそのループを長時間保持している点がセグメント間移動と矛盾する。このように、セグメント間移動の有無に関しては更なる検証が必要である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① 村田崇人、伊藤優志、鎌形清人、DNA 結合蛋白質 p53 のスライディング探索の単分子蛍光観察、生物物理、査読有、56 巻、2016 年、109-101、DOI: 10.2142/biophys.56.109
- ② Satoshi Takahashi S、Kiyoto Kamagata、Hiroyuki Oikawa、Where the complex things are: single molecule and ensemble spectroscopic investigations of protein folding dynamics (review)、Current Opinion in Structural Biology、査読有、36 巻、2016 年、1-9、DOI: 10.1016/j.sbi.2015.11.006.
- ③ Agato Murata、Yuji Ito、Risa Kashima、Saori Kanbayashi、Kei Nanatani、Chihiro Igarashi、Masaki Okumura、Kenji Inaba、Takashi Tokino、Satoshi Takahashi、Kiyoto Kamagata、One-dimensional sliding of p53 along DNA is accelerated in the presence of Ca^{2+} or Mg^{2+} at millimolar concentrations、Journal of Molecular Biology、査読有、427 巻、2015 年、2663-2678、DOI:10.1016/10.1016/j.jmb.2015.06.016.
- ④ Hiroyuki Oikawa、Kiyoto Kamagata、Munehito Arai、Satoshi Takahashi、Complexity of the Folding Transition of the B Domain of Protein A Revealed by the High-Speed Tracking of Single-Molecule Fluorescence Time Series、The Journal of Physical Chemistry B、査読有、119 巻、2015 年、6081-6091、DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b00414.

[学会発表] (計 33 件)

- ① Yuji Itoh、Agato Murata、Seiji Sakamoto、

- Kei Nanatani、Chihiro Igarashi、Takehiko Wada、Satoshi Takahashi、Kiyoto Kamagata、Direct observation of target DNA recognition of p53 mutants by single-molecule fluorescence microscopy、日本化学会第96春季年会、2016年3月24-27日、同志社大学(京田辺市)
- ② Dwiky Rendra Graha Subekti、Agato Murata、Yuji Itoh、Chihiro Igarashi、Satoshi Takahashi、Kiyoto Kamagata、Effect of Linker Elongation in the DNA-binding of Tumor Suppressor p53、日本化学会第96春季年会、2016年3月24-27日、同志社大学(京田辺市)
- ③ Yuji Itoh、Agato Murata、Seiji Sakamoto、Kei Nanatani、Chihiro Igarashi、Takehiko Wada、Satoshi Takahashi、Kiyoto Kamagata、Direct observation of target DNA recognition of p53 mutants by single-molecule fluorescence microscopy、天然変性タンパク質計算化学研究会、2016年1月7-9日、御殿場高原 時之栖(御殿場市)
- ④ 伊藤優志、村田崇人、坂本清志、七谷圭、和田健彦、高橋聡、鎌形清人、一分子蛍光顕微鏡によるp53の標的DNA認識の直接観察、生物物理学会東北支部会、2015年12月18日、東北大学(仙台市)
- ⑤ 五十嵐千裕、村田崇人、伊藤優志、高橋聡、鎌形清人、DNA結合蛋白質の機能解析のためのDNA整列固定法「DNAガーデン」の開発、アライアンス若手交流会、(2015年11月16-17日)、九州大学(春日市)
- ⑥ 鎌形清人、DNA結合蛋白質の機能解析のためのDNA整列固定法「DNAガーデン」の開発、2015アライアンスG3分科会、2015年11月12-13日、大阪大学中之島センター(大阪市)
- ⑦ 村田崇人、伊藤優志、五十嵐千裕、Dwiky Subekti Rendra Graha、高橋聡、鎌形清人、一分子蛍光観測法によるがん抑制蛋白質p53のスライディング運動の解明、The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan、2015、9月13-15日、金沢大学(金沢市)
- ⑧ Kiyoto Kamagata、Target search process of a tumor suppressor p53 revealed by single-molecule fluorescence microscopy、The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan、2015、9月13-15日、金沢大学(金沢市)
- ⑨ Yuji Itoh、Agato Murata、Seiji Sakamoto、Kei Nanatani、Takehiko Wada、Satoshi Takahashi、Kiyoto Kamagata、Observation of the Search Dynamics of p53 Mutants for the Target DNA Sequence by Single-molecule Fluorescence Microscopy、The 53rd Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan、2015年9月13-15日、金沢大学(金沢市)
- ⑩ 鎌形清人、がん抑制蛋白質p53の標的DNA配列探索運動の単分子蛍光観測、第3回生体分子サイエンスセミナー、2015年8月31日、東京工業大学(横浜市)
- ⑪ Dwiky Rendra Graha Subekti、Agato Murata、Chihiro Igarashi、Yuji Ito、Satoshi Takahashi、Kiyoto Kamagata、Investigation of the Roles of the Intrinsically Disordered Region of a Tumor Suppressor p53 in the DNA Binding、Tohoku University's Chemistry Summer School 2015、2015年8月26-29日、東北大学(仙台市)
- ⑫ Yuji Itoh、Agato Murata、Seiji Sakamoto、Kei Nanatani、Takehiko Wada、Satoshi Takahashi、Kiyoto Kamagata、Observation of the Search Dynamics of p53 Mutants for the Target DNA Sequence by Single-molecule Fluorescence Microscopy、Tohoku University's Chemistry Summer School 2015、2015年8月26-29日、東北大学(仙台市)
- ⑬ 鎌形清人、単分子蛍光顕微鏡によるがん抑制蛋白質p53の標的DNA探索過程の観察、金沢大学理工研究域&バイオAFM先端研究センターセミナー、2015年8月20日、金沢大学(金沢市)
- ⑭ Dwiky Rendra Graha Subekti、Agato Murata、Chihiro Igarashi、Yuji Ito、Satoshi Takahashi、Kiyoto Kamagata、Investigation of the Role of Intrinsically Disordered Region in p53 Using Single Molecule Fluorescence Microscopy、第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月24-26日、あわぎんホール(徳島市)
- ⑮ 村田崇人、伊藤優志、五十嵐千裕、高橋聡、鎌形清人、一分子蛍光観測法によるがん抑制蛋白質p53のスライディング運動の解明、第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月24-26日、あわぎんホール(徳島市)
- ⑯ 伊藤優志、村田崇人、坂本清志、七谷圭、和田健彦、高橋聡、鎌形清人、一分子蛍光顕微鏡によるp53変異体の標的配列探索ダイナミクスの観察、第15回日本蛋白質科学会年会、2015年6月24-26日、あわぎんホール(徳島市)
- ⑰ 五十嵐千裕、村田崇人、高橋聡、鎌形清人、DNA結合蛋白質の単分子蛍光観察のためのDNA整列技術の開発、日本化学会第95春季年会、2015年3月26-29日、日本大学(船橋市)
- ⑱ 村田崇人、伊藤優志、五十嵐千裕、鹿島理沙、時野隆至、高橋聡、鎌形清人、一分子蛍光観測法によるがん抑制蛋白質p53のスライディング運動の解明、日

- 本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26-29 日、日本大学 (船橋市)
- ⑱ 伊藤優志、村田崇人、坂本清志、七谷圭、和田健彦、高橋聡、鎌形清人、一分子蛍光顕微鏡による p53 変異体の標的配列探索ダイナミクスの観察、日本化学会第 95 春季年会、2015 年 3 月 26-29 日、日本大学 (船橋市)
- ⑳ 鎌形清人、単分子蛍光観察によるがん抑制蛋白質の標的配列探索問題、第 3 回天然変性タンパク質計算科学セミナー、2015 年 3 月 10-12 日、御殿場高原 時之栖 (御殿場市)
- ㉑ 村田崇人、伊藤優志、Dwiky Subekti Rendra Graha、五十嵐千裕、高橋聡、鎌形清人、一分子蛍光観測法による癌抑制蛋白質 p53 の標的配列探索機構の解明、新学術研究「柔らかな分子系」第 2 回公開シンポジウム、2014 年 11 月 28-29 日、大阪大学 (豊中市)
- ㉒ 鎌形清人、単分子蛍光観察による癌抑制蛋白質 p53 の標的配列探索機構の解明、広島大学クロマチン動態数理研究拠点、2014 年 11 月 28 日、広島大学 (東広島市)
- ㉓ Yuji Itoh, Agato Murata, Seiji Sakamoto, Takehiko Wada, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Observation of the Search Dynamics of p53 for the Target DNA Sequence by Single-molecule Fluorescence Microscopy, 第 5 2 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25-27 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)
- ㉔ Agato Murata, Yuji Itoh, Dwiky Subekti Rendra Graha, Chihiro Igarashi, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Investigation of DNA search mechanism of tumor suppressor p53, 第 5 2 回日本生物物理学会年会、2014 年 9 月 25-27 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)
- ㉕ Yuji Itoh, Agato Murata, Seiji Sakamoto, Takehiko Wada, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Observation of the Search Dynamics of p53 for the Target DNA Sequence by Single-molecule Fluorescence Microscopy, 日本生物物理学会東北支部会 2014、2014 年 9 月 5 日、岩手県公会堂 (盛岡市)
- ㉖ 鎌形清人、単分子蛍光観察による癌抑制蛋白質 p53 の標的配列探索機構の解明、RNA インフォマティクス道場 in 札幌、2014 年 8 月 25-29 日、産業総合技術研究所 (札幌市)
- ㉗ Yuji Itoh, Agato Murata, Seiji Sakamoto, Takehiko Wada, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Observation of the Search Dynamics of p53 for the Target DNA Sequence by Single-molecule Fluorescence Microscopy, 東北大学化学系サマースクール 2014、2014 年 8 月 25-26 日、東北大学 (仙台市)
- ㉘ Agato Murata, Yuji Itoh, Chihiro Igarashi, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Target DNA search of a tumor suppressor p53 revealed by single-molecule fluorescence microscopy, KAKENHI International Symposium on "Studying the Function of Soft Molecular Systems", 2015 年 7 月 9-11 日、日本科学未来館 (東京)
- ㉙ 村田崇人、伊藤優志、Dwiky Subekti Rendra Graha、鹿島理沙、時野隆志、高橋聡、鎌形清人、癌抑制蛋白質 p53 の DNA 探索機構の研究、第 14 回日本蛋白質科学会年会、2014 年 6 月 25-27 日、ワークピア横浜/横浜産貿易ホール (横浜市)
- ㊀ Agato Murata, Yuji Itoh, Risa Kashima, Takashi Tokino, Satoshi Takahashi, Kiyoto Kamagata, Target Search Process of A Tumor Suppressor p53 Revealed by Single-Molecule Fluorescence Microscopy, The 16th international p53 workshop, 2014 年 6 月 15-19 日、The Waterfront Conference Center (Stockholm (Sweden))
- ㊁ 村田崇人、伊藤優志、Dwiky Subekti Rendra Graha、高橋聡、鎌形清人、一分子蛍光観測法による癌抑制蛋白質 p53 の DNA 探索機構の研究、新学術領域「柔らかな分子系」第 3 回全体会議、2014 年 6 月 3-5 日、八ヶ岳ロイヤルホテル (北杜市)
- ㊂ 鎌形清人、単分子蛍光観測で解き明かすがん抑制タンパク質 p53 のターゲット探索問題、シンポジウム「DNA 上のタンパク質の動き」、2014 年 5 月 31 日、京都産業大学 (京都市)
- ㊃ 鎌形清人、単分子蛍光計測によるがん抑制蛋白質 p53 の DNA 探索機構の解明、附置研究所間アライアンスによるナノとマクロをつなぐ物質・デバイス・システム創製戦略プロジェクト 平成 25 年度成果報告会、2014 年 5 月 30 日、大阪大学 (豊中市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鎌形 清人 (KAMAGATA, KIYOTO)

東北大学・多元物質科学研究所・助教
研究者番号：90432492

(3) 研究協力者

杉山 弘 (SUGIYAMA, HIROSHI)

京都大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：50183843

遠藤 政幸 (ENDO, MASAYUKI)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・准教授
研究者番号：70335389