

平成 21 年 6 月 8 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）
 研究期間：2007 - 2008
 課題番号：19870029
 研究課題名（和文） DNA複製チェックポイント応答の視覚化によるリアルタイム検出系の構築

研究課題名（英文） A construction of real-time detection probe for intracellular DNA checkpoint activation

研究代表者

古谷 寛治 (FURUYA KANJI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：90455204

研究成果の概要：細胞は紫外線などで遺伝情報である DNA が傷つくと細胞分裂を停止して、それを修復する。この機能を DNA チェックポイント機能と呼び、それがおかしくなると癌を多発する。チェックポイント機能が働いている様子をリアルタイムで検出し得るツールを作製した。これをさらに改良する事で生きたままチェックポイント機能の活性化の様子を追うことができる様になると考えている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：バイオイメーjing、細胞内情報伝達、細胞周期

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究分野の背景：細胞は紫外線などで遺伝情報である DNA が傷つくと細胞分裂を停止して修復する。この機能を DNA チェックポイント機能と呼ぶ。DNA チェックポイントが欠損すると損傷した DNA が修復されないまま次の細胞周期へと進行し、それが発がん等の原因となる。DNA チェックポイントに関わるタンパク質群は既に酵母の遺伝学等の解析から同定されており、リン酸化によるシグナル伝達経路である事が分かっていた。

(2) 本研究の背景：DNA チェックポイント

タンパク質の分子メカニズムは様々な解析により明らかになって来ている。しかしながらそれらの解析は個々の分子の生化学的解析や、固定細胞における観察にとどまっており、生体内での動的な挙動に関する知見が欠落していた。

(3) 本研究の動機：DNA チェックポイントの活性化の動的な挙動の観察を可能にするためリアルタイムでその活性化を視覚的に検出する事のできるツールの作製を計画した。このツールの作製に私がこれまで解析して来た Rad9 と Cut5 タンパク質に注目した。

Rad9 と Cut5 はチェックポイントが活性化するとリン酸化依存的に結合する。これを一分子 FRET 法に応用し、Rad9-Cut5 が結合すると発光するツール作製を試みた（研究の方法、図 1 参照）。

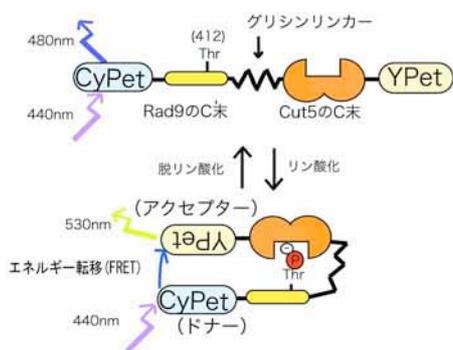
2. 研究の目的

DNA チェックポイントの活性化を視覚的に検出するツールを構築する事で生きた細胞内での DNA チェックポイントの活性化の様子を観察できるようにする。DNA チェックポイントの活性化の動的な様子がリアルタイムで検出できるようになると考えた。さらに細胞内での DNA チェックポイント活性化の時空間的な解析を行い、チェックポイント信号がどのように発生し、どのように細胞内へと広がっていくかを観察する。

3. 研究の方法

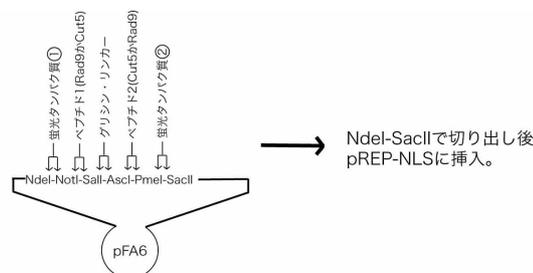
(1) 概要：これまでに私が解析して来たタンパク質間相互作用の知見を利用する。Rad9-Cut5 はチェックポイント活性化時のみに Rad9 のリン酸化を介して複合体を形成する事を私は見いだして来た。本研究に置いては Rad9-Cut5 が相互作用する時のみ発光する一分子 FRET と呼ばれる技術を利用する。高いエネルギーで励起された蛍光タンパク質（ドナー）は、近傍にある低いエネルギーで励起される蛍光タンパク質（アクセプター）に自らのエネルギーを転移させることができる。すなわちドナーを励起させる事で近くに位置するアクセプターを発光させる事が出来る。FRET 法ではその現象を利用する事で 2 つの蛍光標識されたタンパク質の相互作用を見る。

Rad9 と Cut5 の部分断片を融合し、さらに二つの蛍光タンパク質をその両端に付加した融合タンパク質を作製し、細胞内で発現させる（図 1）。チェックポイントが活性化した細胞内でのみ融合タンパク質は構造を変化させ、発光すると考えた。これにより細胞内のチェックポイント活性化状態を生きた細胞内にて検出する（図 1）。



(図 1) 1 分子 FRET 法によるリン酸化ペプチドの検出
リン酸化された Rad9 を Cut5 が認識する。エネルギーのドナーである CyPet がアクセプター YPet の近くにある場合は FRET により YPet を励起する。蛍光タンパク質 CyPet、YPet は CFP、YFP の改良型である

(2) プラスミドの作製：まず図 2 の様に 8-base cutter の制限酵素部位で構成されたマルチクローニング部位をもつプラスミドを構築した。図 2 の様にそれぞれ蛍光タンパク質および Rad9/Cut5 ペプチド断片を挿入し、酵母用発現ベクターに構築した。このモジュールは蛍光タンパク質/ペプチドを自由に入れ替えることができるのが利点である。

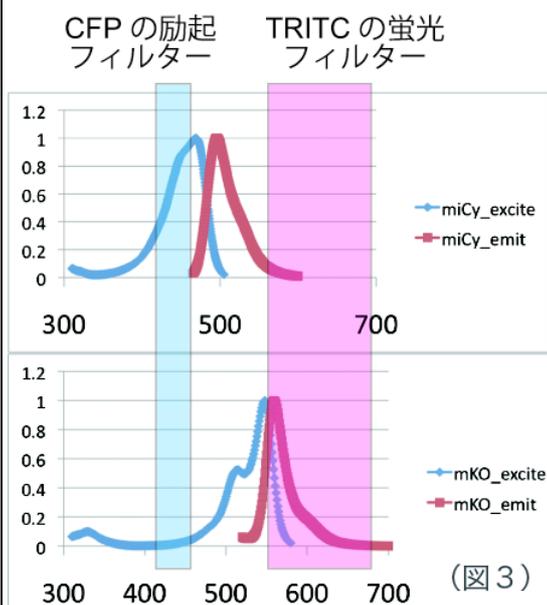


(図 2) 1 分子 FRET 用プラスミドの構築

おのおののペプチドを挿入後 NdeI-SacII で切り出し核移行シグナルおよび polyA を付加した酵母発現ベクターに移植する。

(3) CyPet, YPet を用いた方法：当初用いた CyPet、YPet 蛍光タンパク質は単体では酵母中で発光したもの、融合タンパク質中では十分な明るさの蛍光を得ることができなかった。一つの理由として融合タンパク質になると不安定化する事が考えられる。そこで蛍光タンパク質を別のコンビネーション (mKO, miCy) に付け替えた。

(4) mKO, miCY を用いた方法：本研究期間中に、より FRET 効率が良いと思われる蛍光タンパク質の報告がなされた。それら (miCy: ミドリイシシアン、mKO: 単体クサビラオレンジ) を入手し、試用した。それぞれの励起、蛍光波長、は図 3 の通りである。ま



(図 3)

た、本解析においては図3にあるようなCFP用の励起フィルター、TRITC用の蛍光フィルターを用いて解析した。融合タンパク質モジュールはチアミンの枯渇により誘導されるプロモータの支配下に在る。チアミンの濃度を振り、また、DNA損傷(ヒドロキシウレア、あるいはカンプトテシン)を培地中に添加する事で融合タンパク質量やチェックポイントの活性化状態を変えて解析する。

(5) あらたなFRETコンビネーションの探索: Rad9-Cut5 以外にFRETに用いる事のできるタンパク質間相互作用を探索するためRad9の複合体精製をTAP (proteinA+CBP) タグを用いてRad9とリン酸化依存的に相互作用を変化させるタンパク質の取得を行った。その後ツーハイブリッド法にて直接相互作用を検証した。

4. 研究成果

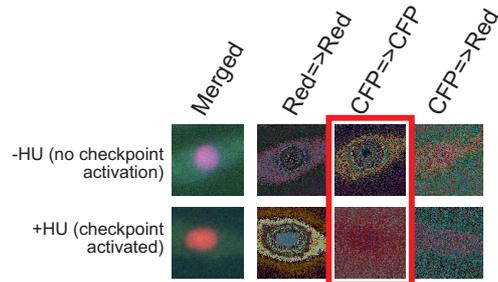
(1) 概要/背景: これまでに類似のツールが作製された報告は一報しかなく、新規性が高い技術である。本研究においては、計画していた一分子FRET用のモジュールを全て作製した。当初予定していたCyPet, YPet 蛍光タンパク質では融合タンパク質の発現効率が悪い事、また、研究期間中に報告のあった、miCyとmKOが、よりFRET効率が良さそうであったので、それを用いて、モジュールを作製した。

(2) 結果1: FRETの結果:

①FRETすなわち蛍光共鳴エネルギー転移が起こると励起させた蛍光タンパク質のエネルギーが隣接する蛍光タンパク質の励起エネルギーとして吸収され、その励起エネルギーとなる。従ってこの場合ではFRETモジュールをCFPフィルターを用いてmiCyを励起する。その際にmiCyの蛍光(CFP=>CFP)強度とmKO(CFP=>Red)の比較をチェックポイントが活性化していない状態(-HU: 3時間)と活性化した状態(-HU)で行う。

②FRETモジュールの発現はチアミンの枯渇によって誘導がかかるプロモータの支配下にある。チアミンを枯渇させてからの時間によって発現量が変わる。検討した結果、チアミンを完全に枯渇させてから10時間が最も効率のよい事が分かった。

③予想としてはチェックポイントが活性化した状態ではmiCyの蛍光が弱まり、mKOの蛍光が強まると思われる。図4に見られる様にmiCyの蛍光が予想通りチェックポイント活性化時において弱くなる事が観察された。残念ながらmKOの蛍光シグナルに変化は見られなかったがこれはFRETによって移動するエネルギーが弱く、mKOを強く活性化させる事ができない為と考えられる。ちなみにFRETモジュールの個々の細胞内に



(図4) ミドリイシジアン(酵母)の蛍光発光(CFP=>CFP)がチェックポイントが活性化した場合、抑制された。これはFRET効果によりキサピラオレンジへとエネルギーが転移し、吸収されたためと思われる。

おける発現量の検定はmKOを直接活性化(Red=>Red)の蛍光量によっておこなった。

④本研究によりチェックポイント活性化をリアルタイムで視覚的に検出するFRETモジュールを作成する事に成功した。今回研究に用いた分裂酵母は遺伝学と細胞生物学の両方の容易なモデル生物である。チェックポイント変異株のコレクションが豊富であり、それらにおけるチェックポイントの活性化状態の推移を追う事でより詳細な解析が可能となる。また、分裂酵母は細胞形態と細胞周期の関連の解析が非常に進んでいる。チェックポイント活性化と細胞形態との関連をより定量的に観察する事ができると考えている。

(3) 結果2: 新規FRETコンビネーションの探索: TAPタグを用いた解析からRad9と相互作用する因子としてRPA

(Replication Protein A)を取得した。ツーハイブリッド法の解析からRad9のカルボキシル末端にRPAが結合する事が分かった。並行して行って来た解析からRad9はチェックポイントキナーゼATRだけでなく複製キナーゼであるDDKによってもリン酸化を受ける事は私は見いだして来た。DDKによるリン酸化部位がRPA結合配列の希望にあること、又他の生化学的解析からRad9はDDKのリン酸化を受けるとRPAから解離する、とのモデルを立てている。DNA損傷に反応して起こるリン酸化であり、この相互作用はDNA損傷応答が起こると発色が失われるコンビネーションに用いることができるかもしれない。

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 2件)

- ① Furuva K, Niki H. Isolation of heterothallic haploid and auxotrophic mutants of *Schizosaccharomyces japonicus*.

Yeast, 26, 221-233, 2009, 査読あり

- ② Mihoko Kai, Kanji Furuya, Francesca Paderi, Antony M. Carr & Teresa S.F. Wang Rad3-dependent phosphorylation of the checkpoint clamp regulates repair-pathway choice
Nature Cell Biology, 9, 691-697, 2007, 査読あり

〔学会発表〕（計 9 件）

- ① 古谷寛治 仁木宏典
Multistep activation of genomic stability pathway 分子生物学会年会, December 12th, 2008, 神戸ポートピアアイランド
- ② Kanji Furuya, Hironori Niki,
Multistep activation of genomic stability pathway, The 6th 3R symposium, October 27th-30th, 2008, 孀恋リゾート
- ③ Kanji Furuya, Hironori, Niki
Multistep activation of genomic stability pathway, Asia-Pacific Regional Fission Yeast Meeting, July 25-27, 2008, Singapore
- ④ 古谷寛治, 仁木宏典
Chromosome Dynamics in alternative Fission Yeast system, 細胞生物学会年会, June 29th -July 1st, 2008, パシフィコ横浜
- ⑤ Kanji Furuya, Hironori, Niki
Multistep activation of genomic stability pathway, International Chromosome Dynamics Symposium in Ise, May 28th, 2008, アクアヴィラ伊勢志摩
- ⑥ Kanji Furuya, Hironori, Niki
Multistep activation of genomic stability pathway, 遺伝研国際シンポジウム May 26th, 2008, 国立遺伝学研究所
- ⑦ Kanji Furuya, Hironori, Niki
Multistep activation of genomic stability pathway, 蛋白研セミナー, March 14th, 2008, 大阪大学蛋白質研究所
- ⑧ 古谷寛治 仁木宏典
Multistep activation of genomic stability pathway 染色体ワークショップ January 30th, 2008, ウエルシテイ湯河原
- ⑨ 古谷寛治 仁木宏典
Multistep activation of genomic stability pathway 分子生物学会年会 December 14th, 2007, パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 寛治 (FURUYA KANJI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・

助教

研究者番号：90455204