

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 1 日現在

機関番号：63801

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2012

課題番号：22657044

研究課題名（和文） 相通的組み換え蛋白質を用いた新しい核内ゲノムマッピング法の開発

研究課題名（英文） Development of a novel genome mapping method by using homologous recombination protein

## 研究代表者

前島 一博 (MAESHIMA KAZUHIRO)

国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センター・教授

研究者番号：00392118

## 研究成果の概要（英文）

従来、ゲノム DNA 上の特定配列を細胞内で標識するためには、激しい処理で二本鎖 DNA を解離させる必要があり、細胞構造のダメージが大きかった。本研究では相通的組換え蛋白質を用いて、蛍光標識した DNA 配列を温和な条件でゲノム DNA 上にターゲットさせることを試みた。組換え蛋白質である大腸菌 RecA 蛋白質・真核生物 XRad51 蛋白質と固定した培養細胞を用い、特定のゲノム DNA 配列のターゲティングをおこなったが、非特異的な結合が多く、ゲノム DNA 上の特定配列を細胞内で効率的に標識することはできなかった。一方、これに代わる手段として、特定の DNA 配列を認識できる蛍光ポリアミド化合物を合成し、固定した細胞のゲノム上のテロメア配列の効率的な標識に成功した。

## 研究成果の概要（英文）：

To label a certain genomic region in the cell, a harsh condition to denature DNA is required. In this proposal, we tried to target a fluorescently tagged DNA sequence to the genomic DNA using some homologous recombination proteins. However, with homologous recombination protein RecA or XRad51, we did not get an efficient targeting in the fixed cells. As an alternative, we designed some fluorescent polyamides, which can recognize a certain DNA sequence, and succeeded to target efficiently the telomere repeats in the fixed cells.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,300,000	0	1,300,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,000,000	510,000	3,510,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：核酸・ゲノム・生体分子

## 1. 研究開始当初の背景

全長2mにもおよぶヒトゲノムDNAは人体の設計図であり、直径10 $\mu$ mの細胞核のなかに折り畳まれている。そして細胞核は個々の細胞の機能に応じてゲノムの折り畳み構造を維持し、ゲノムの複製や遺伝子発現制御を支えていると考えられる。一般的に情報のaccessibilityは収納(折り畳み)に依存することを考えると、ゲノムDNAが細胞核内や分裂期染色体の中でどのように空間的に折り畳まれているのか?を調べることは、ゲノムの理解のためには必須である。しかしながら、既存の方法では、ゲノムの高次構造の全体像を捉えることは困難であった。例えば、FISH (Fluorescence in situ hybridization)は蛍光物質などで標識した一本鎖DNAをプローブとして用い、解離させたターゲットDNAとhybridizationさせ、蛍光顕微鏡などで検出する手法である。しかしながら、真核生物では、DNAは塩基性蛋白質ヒストンに巻かれたヌクレオソームと呼ばれる数珠つなぎの構造をとっているため、プローブとゲノムDNAのhybridizationを行うためにはこのヌクレオソーム構造を激しい処理で部分的に破壊し、二本鎖DNAを無理矢理解離させる必要がある。このため、細胞ダメージが大きく、細胞核の構造保存が困難であった。また、二本鎖DNAが解離するホルムアミド存在下でhybridizationさせるため、ヒトゲノムなどでは、数kb以上の長いプローブが必要であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ゲノムの高次構造の全体像を捉える新しい手段として、FISH (Fluorescence in situ hybridization)に代わる、相同的DNA組換え蛋白質を用いた新しい3次元ゲノムマ

ッピング法を開発し、ヒトゲノムの機能および核内構造の理解に貢献することを目的とする。具体的には、相同的組換え蛋白質を用いて、50塩基程度のプローブで核内マッピング可能なシステムを開発する。

## 3. 研究の方法

### (1)相同的組換え蛋白質の大量発現・精製系の構築

相同的DNA組換え蛋白質として大腸菌RecA蛋白質、アフリカツメガエルXRad51蛋白質を利用するため、まず、これらの蛋白質の大量発現系、精製系の構築を行った。RecAについては研究室において既に大量発現・精製系が樹立されているため、以下にXRad51について述べる。

相同的組換え蛋白質XRad51を調製するために、XRad51のC末端にHis tagを付加した蛋白質(XRad51-His)の発現ベクターを構築した。そしてレアコドンの発現効率がよい大腸菌(Rosetta2)へ導入することで大量発現系を構築した。大量培養後の大腸菌を回収し、ソニケーションによる菌体破碎後、コバルトカラムを用いてXRad51-His蛋白質を精製した。精製したXRad51-Hisの活性を、試験管内で相同的対合反応をみる為に用いられるD-loopアッセイ法で確認したのち、後述する3次元マッピングに用いた。

### (2)相同的組換え蛋白質を用いた3次元マッピング法の条件検討

相同的組換え蛋白質、RecAが一本鎖DNAにフィラメント状に結合し相同DNAと正確に結合する性質を有していることを利用し、検出したいゲノム配列のプローブを蛍光色素Cy3でラベルし、組換え蛋白質との複合体を形成させることにより核内ゲノムのマッピングができるかどうかを検討した。プロー

ブには FISH で一般的に用いられているテロメアリピート配列やセントロメアのリピート配列を使用し、細胞調製および相同性検索反応の最適条件の検討を行った。

#### 4. 研究成果

本研究では、上述の相同的組換え蛋白質の大量発現・精製系の構築を行い、活性のある RecA および XRad51 蛋白質を調製することに成功した。相同的組換え蛋白質は、一本鎖 DNA にフィラメント状に結合して DNA-組換え蛋白質複合体を形成する。この複合体は加水分解しない ATP アナログである ATP $\gamma$ S を用いると、極めて安定な複合体が得られることが知られている。そこで、ATP $\gamma$ S 存在下で、Cy3 でラベルしたテロメア、セントロメアリピート配列と複合体を形成し、プローブとして用いた。さらに、XRad51 を用いる場合、活性化因子である Swi5-Sfr1 も加えて複合体を形成した。3次元マッピング法の条件検討は HeLa 細胞を用いて行った。核内ゲノムのマッピングに一般的に用いられている FISH では核に対して塩酸処理、プロテアーゼ処理などの多くのプロセスを要することから正確な核内の立体構造を保持できているかということが懸念される。このため、なるべく生細胞に近い条件で核内のゲノムをマッピングするため、1%ホルムアルデヒド固定、0.5% Triton X-100 による透過処理のみを細胞の前処理として行った。次に、作製したプローブと細胞を 37°C で 10 分間インキュベートすることによりプローブのテロメア・セントロメアへのハイブリダイゼーションを試みた。しかしながら、この手法では、核内で数個の明るい輝点が検出されたもののバックグラウンドが高く特異的なシグナルの検出ができなかった (図 1)。用いる相同的組換え蛋白質が原核生物由来の RecA でも真核生物由来の XRad51 でもハイブリダイゼーションの結果に大きな差は見られなかった。

この問題に対し、当初の方針を変更し、プローブに N-メチルピロール・N-メチルイミダゾールポリアミドを用いることにした。N-メチルピロール・N-メチルイミダゾールポリアミドは、DNA 二重らせん構造のマイナーグループに塩基配列特異的に結合する人工ペプチド分子である。これらのポリアミド類は DNA の各塩基対と特異的な水素結合を介して結合するので、ピロール・イミダゾールの配列を変えることにより配列認識能を制御することができるかと期待できる。実際、京都大学杉山教授と共同で、テロメア配列にターゲットできるポリアミドを合成し、ヒト細胞のテロメア配列にターゲットできることを示した。

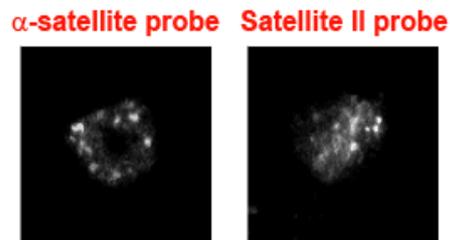


図 1. セントロメア配列 ( $\alpha$ -satellite, Satellite II) 配列と XRad51 の複合体を用いたゲノムマッピング

#### 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 3 件)

- ① 前島一博、城地保昌、西野吉則、高田英昭、鎌田福美、日原さえら  
ヒトゲノム DNA の不規則で柔軟な収納原理 生物物理 査読有、  
(2013) 53, 4-10
- ② Takata H., Matsunaga, S., Maeshima, K.  
The organisation of genomic DNA in mitotic chromosomes: a novel view.  
In Greilhuber, J., Leitch, I., Wendel, J.,

Dolezel, J.(Eds.), Plant Genome Diversity  
査読有、(2013)Volume2(pp. 33-34),  
Springer Verlag, Germany  
DOI;10.1007/987-3-7091-1160-4\_3

- ③ Joti, Y., Hikima, T., Nishino, Y., kamada, F.,  
Hihara, S., Takata, H., Ishikawa, T.,  
Maeshima, K. Chromosomes without  
a 30-nm chromatin fiber. Nucleus  
査読有、(2012) 3(5), 404-410.  
DOI;10.4161/nucl.21222

[学会発表] (計 5 件)

- ① 河本佑介 ヒトテロメア配列に特異的に  
結合するタンデム型 ピロール・イミダゾ  
ールポリアミドの合成  
日本化学会第 93 春季年会  
立命館大学びわこ・くさつキャンパス  
3/22-3/25,2013
- ② Kazuhiro Maeshima “How is a long strand  
of DNA organized in the cells?”  
Lorentz Center Workshop “Genome  
Mechanics at the Nuclear Scale”, Leiden,  
Netherlands, 12/10-12/14, 2012
- ③ Kazuhiro Maeshima “Human genome  
organization and dynamics Paradigm  
Innovation in Biology, Academia Sinica,  
Taipei, 10/16-10/19, 2012
- ④ Kazuhiro Maeshima “Human genome  
organization and dynamics”  
第 50 回日本生物物理学会年会シンポジ  
ウム 名古屋  
9/22-9/24, 2012
- ⑤ 前島一博 分裂期染色体における DNA  
の収納  
日本人類遺伝学会 第 19 回臨床細胞

遺伝学セミナー 東京慈恵会医科大学  
8/25,2012

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

前島 一博 (MAESHIMA KAZUHIRO)  
国立遺伝学研究所・構造遺伝学研究センタ  
ー・教授  
研究者番号 : 00392118

### (2)研究分担者

高田 英昭 (TAKATA HIDEAKI)  
大阪大学・工学 (系) 研究科 (研究院)・  
助教  
研究者番号 : 20455207

-