

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20770131
 研究課題名(和文) DNA修復における損傷・ミスマッチ部位認識機構の1分子イメージング
 研究課題名(英文) Single-molecule imaging of DNA—protein interactions in DNA repair
 研究代表者
 横田 浩章(YOKOTA HIROAKI)
 京都大学・物質—細胞統合システム拠点・講師
 研究者番号：90415547

研究成果の概要(和文)：DNA修復機構の素過程を1分子レベルで解明することを目的とし、大腸菌のヌクレオチド除去修復、ミスマッチ修復でDNA損傷除去に重要な役割を果たしているヘリケースを中心に、修復タンパク質群の遺伝子のクローニング、発現、精製を行い、蛍光標識、基質DNAの作製、1分子観察系の確立を行った。これらをもとに、DNA—タンパク質間、タンパク質—タンパク質間相互作用の1分子イメージングを行い、ヘリケースのDNAへの結合モード、会合状態を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate fundamental processes of DNA-protein interactions in DNA repair, we have performed single-molecule imaging of DNA-protein and protein-protein interactions using fluorescently labeled proteins involved in nucleotide excision repair and mismatch repair in *Escherichia coli*. The single-molecule observation in this study reveals DNA binding modes of a helicase and the number of the helicase bound to DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子計測(SMD)、超精密計測、ナノバイオ、分子認識、核酸

1. 研究開始当初の背景

(1)DNA複製・修復・組み換えは、種の遺伝的連続性を保証する最も重要な機構である。DNA複製が驚くほど複雑なのは、世代を通じてゲノムを保全するため、きわめて正確で

なければならないことによると考えられている。現時点では、さまざまなタンパク質分子が実際にどのように相互作用しつつ、非常に複雑な反応を速やかに、そして絶妙の精度で触媒するのかについてのダイナミクスは

わかっていない。そのダイナミックなプロセスの理解には、直接タンパク質が機能している現場を可視化することが鍵となる。

(2)近年登場した1分子計測技術は、タンパク質の機能をDNAの力学変化でモニターするDNA1分子操作技術や、1分子FRETを用いたDNA構造変化をモニターする1分子蛍光イメージングとしてDNAと相互作用するタンパク質の研究に応用された。しかし、現在までに蛍光標識したタンパク質を用いて、直接DNA上でのタンパク質の相互作用の様子を観察した例は、数例のみである。また、蛍光標識したタンパク質を用いて、直接DNA上でのタンパク質-タンパク質1分子間相互作用を観察した報告はなかった。

2. 研究の目的

そこで、本研究では、大腸菌のヌクレオチド除去修復、ミスマッチ修復でDNA損傷除去に重要な役割を果たしているDNAヘリケースUvrDを中心に、基質DNAの作製、1分子イメージング観察系の確立を通して、DNA修復タンパク質を蛍光標識し、DNA上でのタンパク質間の相互作用を1分子イメージング測定することにより、DNA修復機構の素過程を1分子レベルで解明することを目的とした。これらの修復機構は原核生物から真核生物まで広く保存されており、その欠損は発がん、神経変性、早期老化など、様々な病態の発現につながるということがわかっている。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子のクローニング、タンパク質の発現・精製と蛍光標識

ヌクレオチド除去修復、ミスマッチ修復に関係しているタンパク質群の遺伝子をクローニングし、発現条件を検討した上、高純度で大量精製できる系を構築し、蛍光標識を試みた。

(2) 基質DNAの設計と作製

タンパク質間相互作用を測定するために必要なDNAを設計・作製した。

(3) 1分子イメージング観察系の確立

光学系は、すでに組みあがっている多色同時蛍光1分子イメージング顕微鏡を用いた。また、タンパク質のガラス基板への非特異吸着を抑制するために、独自に改良したポリエチレングリコール(PEG)でコーティングしたガラス基板上にDNAを固定して1分子イメージングを行った。

(4) DNA上のタンパク質間相互作用の1分子計測

①ヘリケースのDNA結合モードの1分子イ

メージング

②ヘリケースのDNA結合分子数の定量

4. 研究成果

(1) 遺伝子のクローニング、タンパク質の発現・精製と蛍光標識

①遺伝子のクローニング、タンパク質の発現、精製

ヌクレオチド除去修復に関係するUvrA、UvrB、UvrC、ミスマッチ修復に関係しているMutS、MutH、MutLの遺伝子をクローニングし、発現条件を検討した上、高純度で大量精製できる系を構築した。

②タンパク質の蛍光標識

①で精製したタンパク質の蛍光標識を試みた。また、UvrDを部位特異的に蛍光標識した。

(2) 基質DNAの設計と作製

タンパク質間相互作用を測定するために必要なDNAを設計・作製した。DNA損傷部位や、ミスマッチ部位の挿入を行った。ガラス基板や μm サイズのビーズに固定するためにDNA末端の修飾(ビオチン、dioxigenin)などを行った。

(3) 1分子イメージング観察系の確立

①タンパク質のガラス基板への非特異吸着を抑制する表面コーティング法の開発

現在1分子計測の分野で、タンパク質のガラス基板への非特異吸着を抑制するために標準的に用いられているポリエチレングリコール(PEG)コーティングは、ガラス表面にシラン化によって修飾されたアミノ基にアミノ基反応性の官能基をもつPEGを反応させて行う。本研究をすすめていくうちに、この方法でPEG化した珪酸カーガラス上では、十分なタンパク質非特異吸着抑制能がないことを見いだした。そのため、PEGコーティングの反応条件に検討を加え、試行錯誤の上、非特異吸着抑制能を改良することに成功した。具体的には、PEG化の溶液条件を、従来法の0.1 M NaHCO₃ (pH 8.3)から50 mM MOPS (pH 7.5)に変えることによって、Cy5-UvrDについて10倍の非特異吸着能の向上があった(図1)。石英ガラス表面上でも1.8倍の非特異吸着能の向上があった。また、この方法でPEG化したガラス表面上ではQdot-UvrDの非特異吸着も効率的に抑制することがわかった。

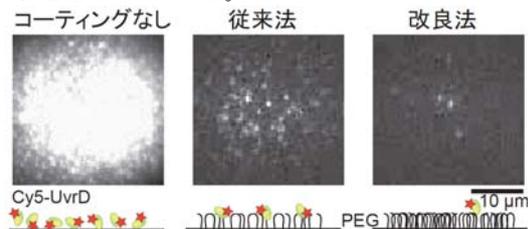


図1 1分子イメージングの障害となるタンパク質の非特異吸着抑制能の向上

(4) DNA 上のタンパク質間相互作用の 1 分子計測 (図 2、3)

①ヘリケースの DNA 結合モードの 1 分子イメージング

(3)で述べた表面コーティング法の改良によって、DNA への UvrD の結合モードの違いを、非特異吸着に邪魔されずにクリアに 1 分子レベルで観察することに成功した (図 2、3)。

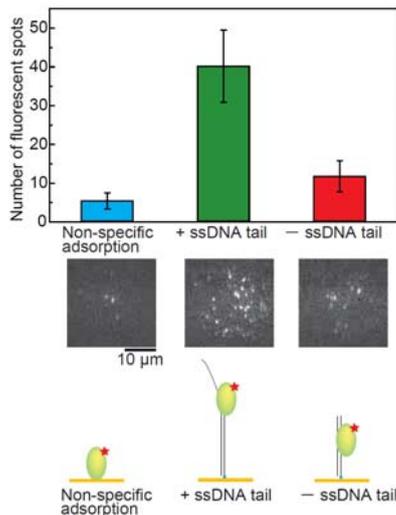


図 2 ヘリケース UvrD の DNA 結合モードの蛍光 1 分子イメージング① 視野内の輝点数をヒストグラムにした。ss/dsDNA junction に結合しやすいことがわかる。

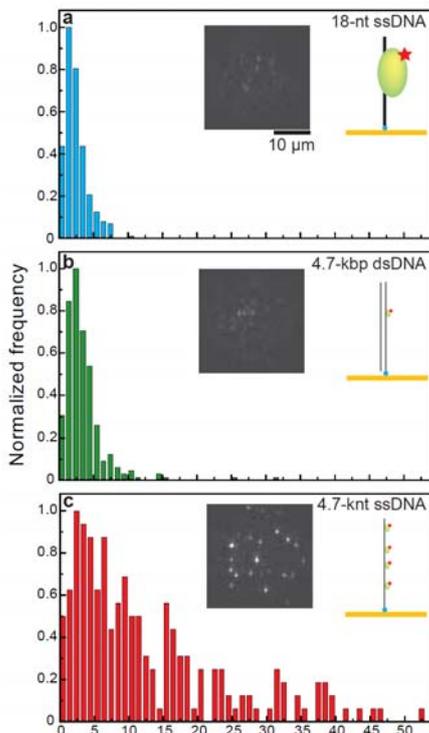


図 3 ヘリケース UvrD の DNA 結合モードの蛍光 1 分子イメージング② 短い ssDNA(a)や長い dsDNA(b)には高々 1 分子しか結合しないが、長い ssDNA(c)には複数分子結合していることがわかる。

②ヘリケースの DNA 結合分子数の定量

UvrD の DNA への結合分子数を明らかにするため、Cy5 で高特異的に標識したものを用いて、一本鎖突出 (dT₁₂、dT₂₀ 及び dT₄₀) をもつ二本鎖 DNA (18 bp) に結合する UvrD の分子数を Cy5 の 1 分子褪色の段階数で定量し、UvrD の DNA への結合分子数が、2 分子あるいは 3 分子であることを明らかにした。これは、蛍光標識したタンパク質を用いて、DNA 結合分子数を蛍光 1 分子イメージングで直接定量化した初めての研究である。

今後、本研究で蛍光標識した修復タンパク質を用いて、DNA 上でのタンパク質間の相互作用を 1 分子イメージング測定することにより、DNA 修復機構の素過程を明らかにしていきたい。

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 1 件)

① Yokota, H., Han Y. W., Allemand J.-F., Xi, X. G., Bensimon, D., Croquette, V., Ito, Y. and Harada, Y.

Single-molecule visualization of binding modes of helicase to DNA on PEGylated surfaces.

Chem. Lett. **38**, 308-309 (2009). 査読有

[学会発表] (計 9 件)

① Yokota H.

Single-Molecule Visualization of the Oligomeric form of *Escherichia coli* UvrD helicase *in vitro*

International Symposium on Hydration and ATP Energy

Hotel Iwanumaya, Akiu, Sendai, Japan

2010 年 3 月 9 日

② Yokota H.

Single-molecule visualization of the oligomeric form of *Escherichia coli* UvrD helicase *in vitro*

Biophysical Society 54th Annual Meeting

Moscone Center (サンフランシスコ) 2010 年 2 月 22 日

③ Yokota, H.

Single-molecule observation of DNA/helicase interactions.

The 13th Membrane Research Forum & The 6th iCeMS International Symposium

Featuring Nan-Meso Membrane Mechanisms

ホテルフジタ京都 (京都市) 2010 年 1 月 28 日

④ Yokota, H.

Single-molecule observation of DNA-helicase interactions.

第 47 回日本生物物理学会年会 アステイ徳島 (徳島市) 2009 年 11 月 1 日

⑤ Yokota, H.

Single-molecule imaging of DNA-protein interactions

第 5 回阪大ナノサイエンス・ナノテクノロジー国際シンポジウム 大阪大学銀杏会館 (吹田市) 2009 年 9 月 2 日

⑥ 横田浩章

マイクロビーズとマイクロ流路を組み合わせた新規プロテインアレイの開発」科研費・特定領域研究・「マルチスケール操作によるシステム細胞工学 (バイオ操作)」第 7 回公開シンポジウム 東京エレクトロンホール宮城 2009 年 3 月 6 日

⑦ 横田浩章

DNA ヘリカーゼ UvrD の機能単位の 1 分子解析

2009 年生体運動研究合同班会議、東京大学・数理科学研究科棟・大講義室 (目黒区)、2009 年 1 月 11 日

⑧ Yokota, H.

同時計測顕微鏡による DNA-ヘリカーゼ相互作用の 1 分子観察

日本生物物理学会第 46 回年会、福岡国際会議場 (福岡市)、2008 年 12 月 4 日

⑨ Yokota, H.

Single-molecule observation of DNA/helicase interaction.

The GRC on Single Molecule Approaches to Biology Colby-Sawyer College (NH, USA) 2008 年 8 月 21 日

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：蛍光顕微鏡装置

発明者：白川昌宏、原田慶恵、横田浩章、吉成洋祐、辻成悟

権利者：国立大学法人京都大学、日本電子株式会社

種類：特願

番号：2010-021619

出願年月日：平成 22 年 2 月 2 日

国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 浩章 (YOKOTA HIROAKI)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・講師

研究者番号：90415547