

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24年5月25日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21550164

研究課題名（和文） DNA-タンパク質相互作用検出のための新規なクロスリンカーの開発

研究課題名（英文） Development of new cross-linkers to detect DNA-protein interaction

研究代表者

渡邊 総一郎 (WATANABE SOICHIRO)

東邦大学・理学部・准教授

研究者番号：10287550

研究成果の概要（和文）：両末端に DNA 結合部位とタンパク質結合部位を有する新しい架橋分子を設計し、その合成法を確立した。また、架橋分子と選択的に結合を形成させるための、タグつきタンパク質の発現系を構築した。架橋分子とタグつきタンパク質の結合実験、および架橋分子と 2 本鎖 DNA との結合実験をおこない、電気泳動により評価したところ、両者ともゲル上に新たなバンドが検出された。これらの結果は、架橋分子と生体分子間の結合の形成を示唆している。

研究成果の概要（英文）：Design and synthesis of new cross-linkers having both DNA and protein binding moieties have been developed. Expression vectors for fusion protein with SNAP tag were also established. Binding experiment of new cross-linkers with fusion proteins as well as a DNA duplex was carried out. In both cases, a new band was observed after gel electrophoresis, suggesting that cross-linkers can make a covalent bond with biomolecules of our interest.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・生体関連化学

キーワード：生体機能関連化学、転写因子機能解析

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノムが解読された今、生命科学が新たに解明すべき大きな問題の一つは、ゲノム情報がいつ、どのように転写・翻訳され、生命体を形作り、維持していくかという点である。特に転写はゲノム情報の発現を制御する機構（遺伝子のスイッチ）として、とりわけ重要である。現在、生細胞内で転写因子が結合している DNA 配列を解析できる最も一般

的な実験法は、クロマチン免疫沈降法（ChIP 法）（*Frontiers in Bioscience*, 2008, 13, 929-943.）であるが、ホルマリンによる非特異的固定法を用いるため、バックグラウンドノイズが多いという問題点を抱えている。

この分野のほとんどの研究者が利用している ChIP 法にこのような大きな問題点が残されている原因は、実際に利用する生命科学分野の研究者は「利用者」であり、既存の方

法しか利用できないためである。利用者の立場を如実に表す例として、タンパク-タンパク相互作用を前提として、DNA には直接結合しないタンパク質の抗体で、標的となる DNA を検出している報告 (GMPS 遺伝子、E2F 転写因子、RB タンパク質、anti-RB 抗体の系) (*Oncogene*, 2003, 22, 1445-1460.) などがある。このような現状がある一方で、ツール開発を担うべき化学者は、研究分野の違いから「利用者のニーズ」を知る機会がほとんどない。

本研究の研究代表者は有機合成化学を専門としており、分担者は分子生物学やゲノム科学を専門としている。両者は同一の機関・部署に所属しているため、各自の専門分野を活かし、密なコンタクトをとりながら研究に取り組めるため、こうした分野間の壁を容易に乗り越えることができる。こうした利点を十分に活かして、先に述べた問題点の解決を目指す研究に取り組んだ。

2. 研究の目的

ChIP 法では、細胞をホルマリン固定 (細胞内で相互作用している DNA と転写因子を共有結合させる) したのち、DNA を断片化し、転写因子の抗体で免疫沈降して得られる DNA の配列を決定する。ここで、ホルマリンを用いて固定していることから種々の問題点が生じる。最大の問題は、転写因子がさらに他のタンパクと相互作用している時、どのタンパク質が DNA に直接結合しているのかを区別して検出する方法がないため、得られる結果に多量のバックグラウンドノイズが入り込むことである (図 1)。ここで、検出の際のノイズを大幅に減らすことができれば、ChIP 法の精度は格段に向上し、ポストゲノム研究を加速することができる。本申請の研究では、非特異的なホルマリン固定を、選択的なクロスリンカーによる架橋に置き換えることで、ChIP 法の精度を飛躍的に向上させることを目的とした (図 2)。

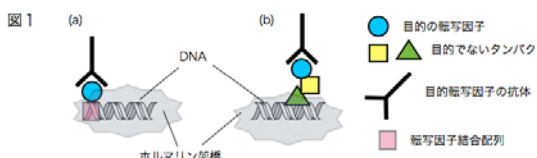


図 1. (a)ChIP 法での転写因子結合部位の検出の模式図。(b)ChIP 法でノイズをもたらすタンパク複合体。

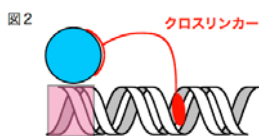


図 2. 新規クロスリンカーにより選択的架橋をおこなった場合の模式図。タンパク複合体の影響を受けない。

3. 研究の方法

ChIP 法改良のための新規クロスリンカーの開発のために、研究代表者が化学実験を担当し、分担者が分子生物学実験を担当する。

(1) 新規クロスリンカーの合成法の確立
クロスリンカー分子は DNA 結合部位 (psoralen; Ps) と SNAP-tag 融合タンパク質結合部位 (O⁶-benzylguanine; BG) の両者を分子内に持ち、これらをスペーサーでつないだ構造とした。最近になって 3-cyanovinylcarbazole が光照射によって DNA と結合することが報告された (*Org. Lett.*, 2009, 10, 3227-3230.) ことを受け、Ps に代わって 3-cyanovinylcarbazole をもつ化合物の合成も検討した。

(2) クロスリンカーの水溶性評価
合成したクロスリンカーの Ps および BG 部位は疎水性の高い構造であるが、スペーサー部位に水溶性の高い PEG 構造を有する。クロスリンカーの飽和水溶液を調製し、紫外可視吸収スペクトルの測定により、水溶性の評価をおこなった。

(3) 融合タンパク発現系の確立
標的タンパク質とクロスリンカー間の結合は、SNAP-tag と BG 間の選択的結合形成反応を利用する。そのため、SNAP-tag を含む複数のタグをタンパク質に付加できる発現ベクターを構築し、タグ付きの転写因子を発現させ、その性質を検証した。

(4) タンパクとクロスリンカーとの架橋反応の検討
SNAP-tag とエストロゲン受容体 (ER) との融合タンパク質の DNA 結合の検証のために、ER 結合配列をもつ DNA と混合した後、ゲルシフトアッセイをおこなった。また、SNAP-tag が付加したことにより、転写活性化能が損なわれていないか検証するために、SNAP-tag とグルココルチコイド受容体 (GR) との融合タンパク質の機能を、ルシフェラーゼアッセイにより調べた。

(5) 二本鎖 DNA とクロスリンカーとの架橋反応の検討
紫外線照射によりクロスリンカー中の Ps と二本鎖 DNA が結合を形成することを検証するために、クロスリンカーと二本鎖 DNA を混合し種々の条件で光照射したのち、PAGE により分析した。また、HPLC による分析も試みた。

4. 研究成果

(1) 新規クロスリンカーの合成法の確立

二本鎖DNA結合部位 (psoralen; Ps) と SNAP-tag融合タンパク質結合部位

(O⁶-benzylguanine; BG) の両者を分子内に持つクロスリンカー分子 (図3) の合成法を確立した。

Ps を含む部分は 4,5',8'-Trimethylpsoralen を原料とし 4 段階の反応で、末端がカルボン酸である誘導体を得た。BG を含む部分は methyl *p*-cyanobenzoate と 2-amino-6-chloropurine を原料とし、5 段階の反応で、末端がアミンである誘導体を得た。スペーサーはこれらを両末端に結合できる官能基をもつ市販の PEG spacer を利用した。この試薬は、長さの異なる一連のものが入手できるため、クロスリンカーの鎖長の最適化に大変有効であり、これまでに $n=3, 5, 11$ の 3 種類の化合物を得た。また、これとはスペーサー部分の結合様式が異なる、2 種類の化合物も合成した。

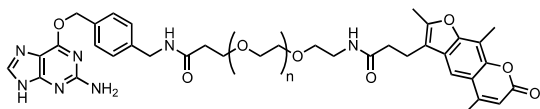


図3. 新規クロスリンカーの構造式 ($n=3, 5, 11$) .

架橋剤としての機能最適化のためには、種々の候補化合物をそろえて比較することが重要となる。そこで、DNA 結合部位として Ps の代わりに 3-cyanovinylcarbazole を用いたクロスリンカー (図4) も同様な方法を用いて合成した。

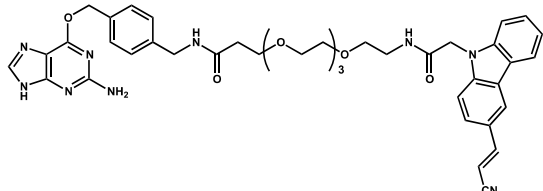


図4. 3-cyanovinylcarbazole を有する新規クロスリンカーの構造式

(2) クロスリンカーの水溶性評価

合成したクロスリンカーは、DNA やタンパク質と反応させるので、架橋反応は緩衝液中でおこなう必要がある。そのためには、クロスリンカーにも、ある程度の水溶性が求められる。合成したクロスリンカーの飽和水溶液を調製し、紫外可視吸収スペクトルを測定することで水溶性を評価したところ、クロスリンカー-PEG3 (図3の $n=3$) では $60 \mu\text{M}$ 程度だったのに対して、クロスリンカー-PEG11 (図3の $n=11$) では 1mM 程度と、大きく水溶性が増加した。この性質は、スペーサー部分の構造と長さが分子全体の水溶性に大きな影響を及ぼすことを示しており、クロスリンカー-PEG11 が有望な候補化合物であることが明らかとなった。

(3) 融合タンパク発現系の確立

標的タンパク質とクロスリンカー間の結合形成や、単離精製を容易にするために、SNAP-tag、His-tag、FLAG-tag など複数のタグをタンパク質に付加できる発現ベクターを新規に構築した。このベクターから得られる融合タンパク質が本来の機能を保持しているか確かめるために、タグ付きエストロゲン受容体の DNA 結合能をゲルシフト法により検証した。エストロゲン受容体結合配列をもつ DNA を混合すると、タグの有無にかかわらず DNA とタンパクの結合が観察された。また、この結合は競合阻害剤による阻害が観測されたことから、基質特異的であることが明らかとなった。また、タグ付き転写因子が野生型と同じ転写活性能を持つか調べるために、タグ付きグルココルチコイド受容体を用いたルシフェラーゼアッセイをおこなった。その結果、転写活性能を保持していることが確認された。以上の結果より、ここで構築したベクターから産生されるタグ付きタンパク質は、野生型と同様な機能を備えていることが確認された。

(4) 融合タンパクとクロスリンカーとの架橋反応の検討

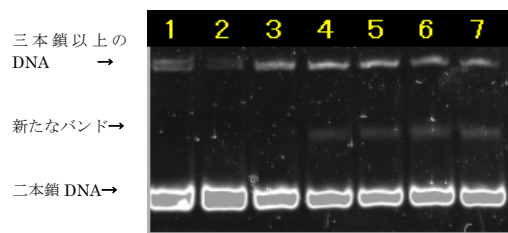
SNAP-tag とグルココルチコイド受容体

(GR) との融合タンパク質とクロスリンカーとの結合の検証のために、これらを混合し反応させた後にウエスタンブロッティングをおこなった。クロスリンカーの濃度上昇に伴い、高分子量側に新たなバンドが観測された。この結果は、融合タンパク質とクロスリンカー間の結合形成を示唆するものである。

(5) 二本鎖 DNA とクロスリンカーとの架橋反応の検討

蛍光色素で標識した二本鎖 DNA (15 bp) とクロスリンカーを混合し種々の条件で照射したのち、PAGE により分析した。二本鎖 DNA に対して、Ps を DNA 結合部位としてもつクロスリンカーを 1,000 倍量加え、365 nm の紫外線を照射したところ、高分子量側に新たなバンドが確認できた (図5)。このバンドは、クロスリンカーを除いた対照実験では観測されないため、Ps と二本鎖 DNA との結合形成に由来するものと考えられる。

一方、3-cyanovinylcarbazole をもつクロスリンカーでも同様の実験をおこなったが、新たなバンドは確認できなかった。これらの結果から、DNA 結合部位として Ps が優れていることが明らかとなった。また、クロスリンカー中の BG 部分は、光照射によって DNA と結合しないことが示唆された。



レーン	1	2	3	4	5	6	7
クロスリンカー	-	-	+	+	+	+	+
光照射 (分)	0	60	0	15	30	45	60

図5. 二本鎖 DNA と、Ps を DNA 結合部位としてもつクロスリンカー (1,000 倍量) との光反応後の PAGE による分析結果。光照射により新たなバンドが出現している。

(6) 今後の検討課題

クロスリンカーが二本鎖 DNA とタグ付きタンパク質の両者を架橋することを検証する実験を継続中である。まずは、クロスリンカーと二本鎖 DNA を試験管中で反応させ、生成物を HPLC により分離・精製する。これをタグ付きタンパク質と混合して反応させ、PAGE や蛍光分子の並進拡散速度の測定などにより、DNA とタンパク質間が架橋されていることを確認する検討をおこなっていく。

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 4 件)

- Ito K., Higai K., Sakurai M., Shinoda C., Yanai K., Azuma Y., Matsumoto K., Binding of natural cytotoxicity receptor NKp46 to sulfate- and α 2,3-NeuAc-containing glycans and its mutagenesis, *Biochem Biophys Res Commun.* **2011**, *406*, 377-82. 査読有。DOI: 10.1016/j.bbrc.2011.02.050
- S. Watanabe, A. Komori, M. Saito, A. Uchida, Preparation and reaction of uracil substituted cyclen and cyclam: formation of tricyclic guanidinium and dihydroimidazolium salts, *Tetrahedron*, **2010**, *66*, 1196-1201. 査読有。DOI: 10.1016/j.tet.2009.12.038
- Taniguchi-Yanai K., Koike Y., Hasegawa T., Furuta Y., Serizawa M., Ohshima N., Kato N., Yanai K., Identification and characterization of glucocorticoid receptor-binding sites in the human genome, *J Recept Signal Transduct Res.*, **2010**, *30*, 88-105. 査読有。

DOI: 10.3109/10799891003614816

- Tsuchihashi-Makaya M., Serizawa M., Yanai K., Katsuya T., Takeuchi T., Fujioka A., Yamori Y., Ogiwara T. and Kato N., Gene-environmental interaction regarding alcohol-metabolizing enzymes in the Japanese general population, *Hypertens Res.* **2009**, *32*, 207-13. 査読有。DOI: 10.1038/hr.2009.3

[学会発表] (計 26 件)

- 山内翔偉・渡邊総一郎、二環系シクロブタノン誘導体のフッ素化反応、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 27 日、慶應義塾大学日吉・矢上キャンパス (横浜)
- 豊島拓也・吉田諭史・渡邊総一郎、1, 3-ジスチリルベンゼンの酸化的光環化反応における置換基のブロッキング効果、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 25 日、慶應義塾大学日吉・矢上キャンパス (横浜)
- 高橋俊樹・岸本利彦・渡邊総一郎、光分解基を介した末端アルキルで表面を修飾した機能性ビーズの合成、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 25 日、慶應義塾大学日吉・矢上キャンパス (横浜)
- 上村康裕・渡邊総一郎、クロスカップリング反応により吸収極大が超波長シフトするクマリン誘導体の合成、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 25 日、慶應義塾大学日吉・矢上キャンパス (横浜)
- 鈴木文仁・石原奈穂子・長谷川理沙・渡邊総一郎・岸本利彦、グリシン抱合酵素ファミリー遺伝子 GATF-C は細胞の毒物耐性に関与する、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜 (横浜)
- Takatsugu Kosugi, Keiko Yanai, and Kazuyuki Yanai, Identification and Characterization of Human Genomic Binding Sites for Retinoic Acid Receptor/Retinoid X Receptor Heterodimers, 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜 (横浜)
- 今井友理香・柳内圭子・柳内和幸、厳密な遺伝子発現誘導ベクターとそれを利用した再生医療関連遺伝子導入ラットの作成、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜 (横浜)

8. 中山美佳・柳内圭子・村崎亜起子、渡邊未知也・長谷川貴士・柳内和幸、ヒトゲノムからのHepatocyte Nuclear Factor 4 結合配列の系統的な同定と解析、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜 (横浜)
9. Michiya Watanabe, Tatsuro Nemoto, Midori Katsumata, and Kazuyuki Yanai, Efficient Multicistronic Expression of Transgenes in Yeast, 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜 (横浜)
10. Soichiro Watanabe, Takuya Toyoshima, Shoi Yamauchi, Keiko Yanai, Takashi Hasegawa, and Kazuyuki Yanai, Design, Synthesis and Properties of New Crosslinking Reagents to Detect DNA-Protein Interaction, 8th AFMC International Medicinal Chemistry Symposium (AIMECS 11), 2011 年 12 月 1 日、京王プラザホテル (東京)
11. 大野浩平・岸本利彦・小宅綾菜・四方哲也・渡邊総一郎、大腸菌耐熱進化時に現れる相互作用を仲介する分子の探索、日本進化学会第 13 回大会、2011 年 7 月 31 日、京都大学百周年時計台記念館 (京都)
12. 上村康裕・田林沙織・山口祥一・田原太平・細井晴子・渡邊総一郎、ペプチドヘリックスの配向を決定するためのクロスリンカー色素の合成と評価、日本化学会第 9 1 春季年会、2011 年 3 月 11 日、講演予稿集
13. 大野浩平・岸本利彦・四方哲也・渡邊総一郎、大腸菌高温適応過程で機能する相互作用分子の探索、日本化学会第 9 1 春季年会、2011 年 3 月 11 日、講演予稿集
14. 鈴木文仁・渡邊総一郎・岸本利彦、rat GATF-C の基質候補物質の合成と酵素活性解析による機能解析、日本化学会第 9 1 春季年会、2011 年 3 月 11 日、講演予稿集
15. 伊豆本幸恵・渡邊総一郎・三上真一・太虎林・長友重紀・山本泰彦、軸配位子 Met を含むループ領域の構造変化がシトクロム c の機能と熱安定性に与える影響、日本化学会第 9 1 春季年会、2011 年 3 月 11 日、講演予稿集
16. 柳内圭子、村崎亜起子、長谷川貴士、渡邊未知也、中山美佳、柳内和幸、ヒトゲノムからのHepatocyte Nuclear Factor 4 結合配列の系統的な同定と解析、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会・合同年会)、2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (兵庫)
17. 鶴岡孝祥、柳内圭子、古田裕一、渡邊未知也、池嶋真奈、今井友里香、中山美佳、伊藤真弓、高橋磨理子、柳内和幸、レチノイドX受容体ホモダイマーのヒトゲノムにおける結合配列の系統的な同定とその解析、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会・合同年会)、2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (兵庫)
18. 古田裕一、柳内圭子、柳内和幸、ヒト・レチノイドX受容体 β のスプライシング・バリエーションの解析、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会・合同年会)、2010 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド (兵庫)
19. 細井晴子・山口祥一・田林沙織・双木泰斗・上村康裕・渡邊総一郎・清水啓史・田原太平、ヘテロダイナー電子和周波発生分光法を用いたタンパク質トポロジー決定法の開発、第 4 回分子科学討論会、2010 年 9 月 14 日、大阪大学豊中キャンパス (大阪)
20. 山内翔偉・山岸英明・豊島拓也・柳内圭子・長谷川貴士・柳内和幸・渡邊総一郎、DNA-タンパク相互作用検出を目指した新しい架橋剤の合成と性質、日本化学会第 9 0 春季年会、2010 年 3 月 28 日、近畿大学 本部キャンパス (大阪)
21. 上村康裕・山下めぐみ・山口祥一・田原太平・細井晴子・渡邊総一郎、ペプチドヘリックスの配向を調べるための新しい架橋型色素の合成と性質、日本化学会第 9 0 春季年会、2010 年 3 月 28 日、近畿大学 本部キャンパス (大阪)
22. 柳内圭子、高橋磨理子、古田裕一、長谷川貴士、大島範子、柳内和幸、エストロゲン応答性の違いを生むヒトゲノム上の SNP の同定、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜 (横浜)
23. 古田裕一、柳内圭子、池嶋真奈、渡邊未知也、今井友理香、中山美佳、伊藤真弓、高橋磨理子、大島範子、柳内和幸、ヒトゲノムからのレチノイドX受容体結合配列の系統的な同定とその解析、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 12 日、パシフィコ横浜 (横浜)
24. 長谷川貴士、柳内圭子、渡邊未知也、今井友理香、中山美佳、伊藤真弓、大島

範子、柳内和幸、ヒトゲノムからの
Hepatocyte Nuclear Factor 4 結合配列
の系統的な同定、第 32 回日本分子生物
学会年会、2009 年 12 月 12 日、パシフ
ィコ横浜（横浜）

25. Takuya Toyoshima, Keiko Yanai,
Takashi Hasegawa, Kazuyuki Yanai,
and Soichiro Watanabe, Synthesis of
a new cross-linker to detect
DNA-protein interaction,
International Symposium on
Multifunctional Organic Materials
and Devices、2009 年 12 月 11 日、東
邦大学 習志野キャンパス（船橋）
26. Soichiro Watanabe, Ayako Komori,
Masayuki Saito, and Akira Uchida,
Preparation and reactions of
uracil-substituted azamacrocycles,
International Symposium on
Multifunctional Organic Materials
and Devices、2009 年 12 月 11 日、東
邦大学 習志野キャンパス（船橋）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 総一郎 (WATANABE SOICHIRO)
東邦大学・理学部・准教授
研究者番号：10287550

(2) 研究分担者

柳内 和幸 (YANAI KAZUYUKI)
東邦大学・理学部・准教授
研究者番号：30360704

(3) 連携研究者

なし