

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：33811

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570182

研究課題名(和文)クロマチンDNAにおけるDNA修復機構の蛍光1分子イメージング

研究課題名(英文)Single-molecule direct visualization of DNA repair proteins on chromatin

研究代表者

横田 浩章 (Yokota, Hiroaki)

光産業創成大学院大学・光産業創成研究科・准教授

研究者番号：90415547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物(ヒト)のDNA修復において機能する修復タンパク質がDNAとどのように相互作用し、損傷部位を認識するのかを、これまで開発してきた1分子計測顕微鏡を用いて、1分子可視化した。その結果、DNA損傷認識に関わるXPC複合体(XPC-RAD23B)が損傷DNAに高いアフィニティで結合すること、DNA上で1次元拡散運動を行っていることを明らかにした。これら1次元拡散運動の拡散係数の値は広く分布しており、このことはXPC複合体が必ずしもDNAのらせんに忠実に沿って動かず、DNA上をより速く移動し、長大な非損傷DNAに存在する損傷を効率よく、かつ確実に見つけ出していることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：To elucidate how mammalian (human) DNA repair proteins recognize base lesions, we performed single-molecule direct visualization of the proteins on DNA. We found that XPC-RAD23B protein complex, which is known to be responsible for damage recognition in mammalian nucleotide excision repair, has high affinity for a lesion and performed one-dimensional bidirectional diffusion on undamaged DNA. The diffusion coefficients of the movement indicate that the protein complex does not always perform rotational tracking of the helical pitch of the DNA while moving along DNA and thus diffuses at much higher rates. The obtained results indicate that the protein complex uses these binding modes for efficient search of DNA lesions scattered throughout the genome from a vast excess of normal bases.

研究分野：生物物理学

キーワード：DNA損傷・修復 タンパク質 核酸の構造 動態 機能

1. 研究開始当初の背景

(1) 地球上の生物にとって DNA 複製・修復・組換えは、種の遺伝的連続性と多様性を保証するための根源的な分子機構である。特にゲノムの安定性を保つには、厳密な DNA 複製機構に加えて、DNA に絶え間なく生じる様々な偶発的損傷を修復する機構が必要である。DNA 二重鎖ではそれぞれの鎖が互いに相手の塩基配列のバックアップとして機能しており、特に高頻度で発生する塩基損傷を対象とする除去修復機構においては、損傷を受けた DNA 側の一部を取り除いた上で他方の鎖を鋳型にして再合成を行うことで信頼性の高い修復を実現している。除去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。これまで、除去修復機構に関与する数々のタンパク質が同定され、詳細な生化学的解析に基づいて反応機構のモデルが提唱されている。一方、様々なタンパク質分子が実際にどのように相互作用しながら、長大なゲノム DNA に発生した損傷を効率よく、かつ確実に見つけ出して修復するのか、そのダイナミクスについては不明な点が多く残されている。

(2) 近年登場した光学顕微鏡をベースとした 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、DNA の構造変化でモニターする 1 分子 FRET 技術として DNA と相互作用するタンパク質の研究に応用されている。しかしながら、これらの計測では μm サイズのビーズの変位や DNA に標識した色素間の FRET 効率の変化によって、間接的に DNA と相互作用するタンパク質の機能を見ており、タンパク質の DNA への結合状態や DNA 上での動きを直接的に見ているわけではない。最近になってやっと *in vitro*、主に溶液中で発生する剪断力により伸長した λ DNA 上で、蛍光標識した DNA 結合タンパク質と裸の DNA 上との相互作用が 1 分子レベルで観察されるようになった。しかし、その数は限られており、また直接 DNA 上でのタンパク質-タンパク質間相互作用を観察した例はきわめて少ない。DNA 修復タンパク質についても同様で、これまでの研究では、損傷部位をもたない裸の DNA を用いてタンパク質との相互作用を見ており、損傷部位をもつ DNA との 1 分子間相互作用について報告がないのが現状である。

(3) 原核細胞と真核細胞におけるゲノム DNA の大きな違いは、その存在様式にある。真核細胞では、DNA はヒストン八量体にまきついてヌクレオソーム構造を形成し、さらにその他のタンパク質とともにクロマチンと呼ばれる高次構造を形成し、核の中にコンパクトに収納される。真核細胞内ではこのクロマチン上で相互作用が進行しているわけであるが、2010 年になってようやくクロマチン

に着目したイメージングに関する報告がなされた。

2. 研究の目的

(1) 修復タンパク質が圧倒的過剰に存在する非損傷 DNA の中から損傷部位をどのように見つけ出すかという DNA 修復における最も根本的な問題に対し、DNA-タンパク質間相互作用及びタンパク質-タンパク質間相互作用の蛍光 1 分子イメージングと、DNA1 分子操作が同時に行える多色蛍光・力学 1 分子同時計測顕微鏡によってそのダイナミクスの素過程を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 蛍光 1 分子イメージングのためのタンパク質の蛍光標識：高精度 1 分子解析を達成するためには、観察される蛍光 1 分子の輝点がタンパク質 1 分子に対応していることが望ましい。このため、遺伝子工学を駆使して高標識率のタンパク質部位特異的蛍光標識を行った。

(2) DNA 基質の作製： λ DNA に紫外線照射し、損傷 λ DNA を作製した。また、損傷部位を 1 つもつ二本鎖 DNA オリゴ及び損傷部位を 1 つもつ λ ファージ DNA を作製した。

(3) DNA 修復タンパク質の蛍光 1 分子イメージング：開発してきた蛍光 1 分子イメージング計測顕微鏡を用いて、DNA での修復タンパク質を 1 分子直視した。

4. 研究成果

(1) 蛍光 1 分子イメージングのためのタンパク質の蛍光標識：このため、遺伝子工学を駆使して XPC 及び UV-DDB にビオチンタグを導入し、ビオチン化した。そして、ストレプトアビジン Qdot の標識を行った。

(2) DNA 基質の作製：損傷部位を 1 つもつ二本鎖 DNA オリゴを作製した。また、部位特異的損傷 λ ファージ DNA 基質作製の条件検討を行い作製した。さらに、 λ DNA に紫外線照射し、損傷 λ DNA を作製した。

(3) DNA 修復タンパク質の蛍光 1 分子イメージング：開発してきた蛍光 1 分子イメージング計測顕微鏡を用いて、DNA での修復タンパク質を 1 分子直視し、非損傷あるいは損傷 DNA 上での DNA 修復タンパク質 1 分子の結合・解離・1 次元拡散運動ダイナミクスの長時間イメージングを行った。

① XPC 複合体が損傷 DNA に高いアフィニティで結合することを蛍光 1 分子イメージングで可視化した (図 1、2)。

② 紫外線損傷を与えた DNA 上で、損傷 DNA への結合ダイナミクス (図 3) を可視化した。

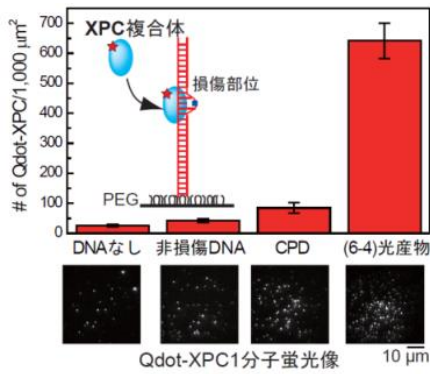


図1 XPC 複合体の損傷 DNA への結合の蛍光 1 分子イメージング

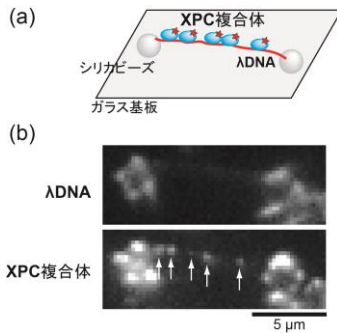


図2 修復タンパク質の紫外線損傷 DNA への結合の蛍光 1 分子イメージング (a) 実験模式図. (b) 同時観察蛍光像.

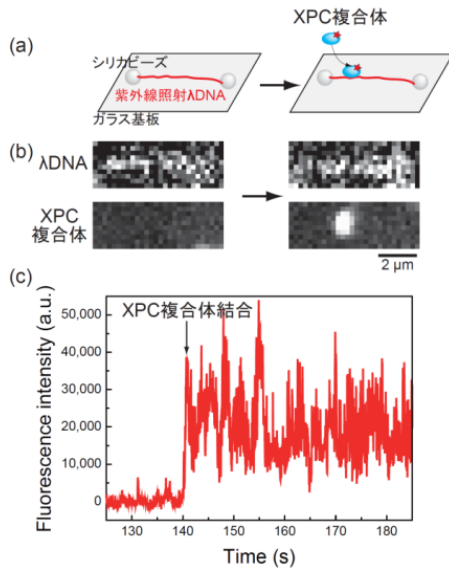


図3 修復タンパク質の紫外線損傷 DNA 上への結合ダイナミクスの 1 分子イメージング (a) 実験模式図. (b) 同時観察蛍光像. (c) 蛍光強度の時間変化.

③XPC 複合体の結合・解離のダイナミクス (図4) 及び 1 次元拡散運動をイメージングした (図5)。中には数分にわたる 1 次元拡散運動を行うものがあり (図5(a))、求めた拡散係数が広く分布していることを見いだしている (図5(c))。

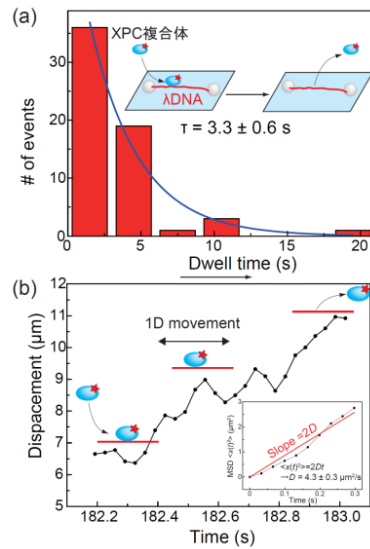


図4 XPC 複合体の非損傷 DNA 上での解離ダイナミクスの 1 分子イメージング (a) 実験 DNA との結合時間の解析. (b) DNA に結合した後、1 次元運動をして解離した例. 平均二乗変位 (MSD) から拡散係数を求めることができる。

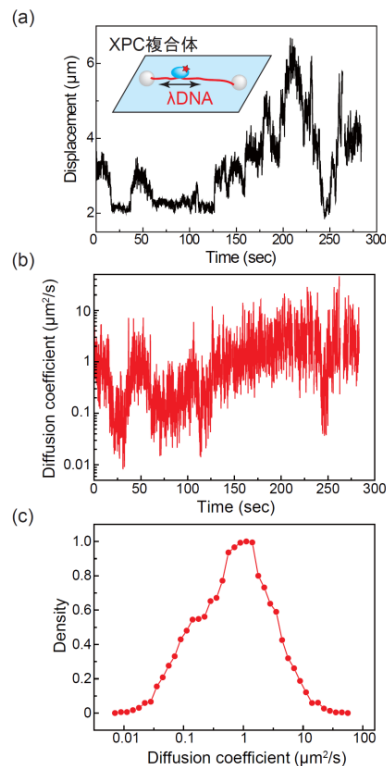


図5 XPC 複合体の非損傷 DNA 上での長時間 1 次元拡散運動. (a)変位の時間変化. (b)拡散係数の時間変化. (c)拡散係数の分布.

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 0 件)

〔学会発表〕 (計 4 件)

①横田浩章、戸根大輔、大西優貴、韓龍雲、

原田慶恵、菅澤薫、哺乳類ヌクレオチド除去修復タンパク質 XPC の DNA 結合モードの 1 分子イメージング、第 37 回日本分子生物学会、平成 26 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）

②横田浩章、戸根大輔、韓龍雲、原田慶恵、菅澤薫、哺乳類ヌクレオチド除去修復タンパク質 XPC の DNA 結合モードの 1 分子イメージング、第 52 回日本生物物理学会年会、平成 26 年 9 月 26 日、札幌コンベンションセンター（北海道・札幌市）

③横田浩章、戸根大輔、韓龍雲、原田慶恵、菅澤薫、哺乳類ヌクレオチド除去修復タンパク質 XPC の 1 分子イメージング：DNA 上での 1 次元自由拡散運動の観察、第 36 回日本分子生物学会、平成 25 年 12 月 3 日、神戸ポートアイランド（兵庫県・神戸市）

④横田浩章、戸根大輔、韓龍雲、原田慶恵、菅澤薫、哺乳類ヌクレオチド除去修復タンパク質 XPC の 1 分子イメージング、第 51 回日本生物物理学会年会、平成 25 年 10 月 29 日、国立京都国際会館（京都府・京都市）

〔図書〕（計 1 件）

Yokota, H., Protein Interactions, InTech, 2012, 195-214.

6. 研究組織

(1)研究代表者

横田 浩章（YOKOTA, Hiroaki）
光産業創成大学院大学・光産業創成研究科・准教授
研究者番号：90415547

(2)連携研究者

菅澤 薫（SUGASAWA, Kaoru）
神戸大学・自然科学系先端融合研究環バイオシグナル研究センター・教授
研究者番号：70202124

岩井 成憲（IWAI, Shigenori）
大阪大学・基礎工学研究科・教授
研究者番号：10168544