

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440008

研究課題名(和文) 新規一分子計測のためのガラス基板の作製とDNA結合蛋白質研究への応用

研究課題名(英文) Development of novel method of Zero Mode Waveguides for characterization of DNA binding proteins

研究代表者

韓 龍雲 (HAN, YONG-WOON)

京都大学・物質 - 細胞統合システム拠点・助教

研究者番号：50566297

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：高濃度蛍光標識生体分子を1分子レベルで結合解離の様子を観察・解析可能なナノ開口基板を用いて、大腸菌のHolliday構造DNAの分岐点移動を促進するモーター蛋白質であるRuvBの機能解析やエピジェネティック制御、特にメチル化DNA維持機構に大きく関与するヘミメチルCpG結合ドメインであるSRAの機能解析を中心に研究を進めました。RuvB蛋白質についてはADPやATP S等の様々なヌクレオチド存在下でRuvBとRuvA-Holliday構造DNAとの相互作用を解析した結果、RuvBの6量体形成は、ATPとの結合だけでなく、ATP加水分解により促進することを示唆する結果を得ました。

研究成果の概要(英文)：Zero Mode Waveguides (ZMWs) consist of nanosized holes in an aluminum film. Thus, ZMWs enable us the visualization of a single fluorescent molecule under micromolar order of the molecules. We characterized E. coli RuvB motor protein, which promotes Holliday junction DNA branch migration, and SRA, hemi-methyl CpG binding domain. We observed fluorescently labeled RuvBs binding to a RuvA-Holliday junction under various nucleotide conditions and our data suggested that not only ATP binding to RuvB but also ATP hydrolysis by RuvB facilitates a stable RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation

研究分野：生物学

キーワード：蛍光1分子イメージング

1. 研究開始当初の背景

DNA 結合蛋白質は DNA 複製、修復、組換えやゲノム DNA の分配等のゲノム構造の維持に重要な働きを示すだけでなく、ヒストン蛋白質や DNA メチル化酵素等のクロマチン構造を制御し、組織特異的な遺伝子発現を制御することで、個体の恒常性の維持にも重要な働きを示します。このような蛋白質の中で、現在メチル化 DNA 維持に関与するヒト UHRF1 蛋白質と DNA 複製、組換えや修復において、重要な働きをする大腸菌 RuvB や UvrD 蛋白質に注目して研究を行っています。

ヒトの約 70% の遺伝子のプロモーター領域には CpG dinucleotide が密集した CpG island と呼ばれる領域が存在します。CpG のシトシンのメチル化は転写抑制に大きな役割を果たし、メチル化 DNA のパターンは組織特異的で、組織の恒常性を保つ上でメチル化 DNA パターンの維持は非常に重要です。UHRF1 はヘミメチル CpG 結合蛋白質で、メチル化 DNA 維持に重要な役割を果たします。UHRF1 中の SRA ドメインがヘミメチル CpG との相互作用に直接関わるドメイン (Arita et.al. Nature 2008 年 巻 455 頁 818-821) で本研究では SRA に注目し、研究を行います。

本研究では、ゲノム構造維持に関与する蛋白質にも注目しています。また、研究開始においては DNA 相同組換えの中間体で十字型構造をした Holliday 構造 DNA の分岐点移動反応に於いてモーター蛋白質として機能する RuvB 蛋白質に注目し、研究を進めています。RuvB 蛋白質は Holliday 構造 DNA 特異的 DNA 結合蛋白質である RuvA と相互作用し、Holliday 構造 DNA 上で RuvA-RuvB-Holliday 構造 DNA 複合体を形成します。RuvB がモーター蛋白質としての機能があり、ATP の加水分解によるエネルギーを利用して、Holliday 構造 DNA の分岐点移動を促進させます。また、RuvB は AAA+ ATPase ファミリーに属し、DNA 上で 6 量体リング構造を形成し、このリング構造を活性型とすることが知られています。しかしながら、RuvB の DNA 上での 6 量体リング構造形成過程にはまだ不明な点も多く、本研究では RuvB の DNA 上で複合体形成過程を詳細に解析することも研究目的の一つとします。

以上の研究を進めていく上で、蛍光標識した生体分子の挙動を直接、実時間で観察、計測できる一分子解析法は強力な解析方法の一つです。応募者もこれまでいくつかの DNA 結合蛋白質の機能解析を一分子解析法により行ってきました (Han et.al. Molecular Cell 2010 年 巻 39 頁 48-58、PNAS 2006 年 巻 103 頁 11544-11548)。しかしながら、本研究計画で注目している SRA-DNA 複合体や RuvB-DNA 複合体の解離定数は数百 nM 以上と一分子解析を行う上では非常に相互作用の弱い蛋白質であるという結果は既に応募者の予備実験より得ました。これまでの一分子

計測に用いられている全反射照明を用いた解析では、蛍光標識分子の濃度が 50 nM 以上だと、自由に動き回っている蛍光標識分子からの背景光がノイズとなり注目する分子の観察に大きな影響を与えていました。従いまして、SRA と DNA または RuvB と RuvA-Holliday 構造 DNA の相互作用を一分子計測で解析するにはこのような問題を克服が必要となります。本研究では、次世代 DNA シークエンサーに用いられているナノ開口基板に注目しました。

2. 研究の目的

本研究ではエピジェネティック制御、特にメチル化 DNA 維持機構に大きく関与するヘミメチル CpG 結合蛋白質であるヒト UHRF1 とゲノム構造維持に重要な働きを示す大腸菌 RuvB 蛋白質のそれぞれの機能を一分子計測技術により詳細に解析します。UHRF1 についてはヘミメチル CpG の探索過程を明らかにできるように、RuvB については RuvA-Holliday 構造 DNA との複合体形成過程を様々な条件下で計測し、RuvB の RuvA や Holliday 構造 DNA との複合体形成過程を明らかにできるような研究を行います。しかしながら、UHRF1 と DNA または RuvB と DNA の解離定数は数百 nM 以上と非常に高く、従来の一分子解析法では解析が非常に困難でした。本研究では、このような解離定数の非常に高いサンプルでも一分子レベルでの解析が可能となるナノ開口基板を用い UHRF1 および RuvB の機能解析を行うことを研究目的とします。

3. 研究の方法

(1) ナノ開口基板の作製

RuvB や SRA の DNA に対する結合解離の様子を観察するには、それぞれの蛋白質濃度が 100 nM 以上である必要があります。従来蛍光 1 分子イメージングで頻りに用いられている全反射照明では、対象となる蛍光標識生体分子の濃度が 50 nM 以上だと溶液中を自由に動き回る蛍光色素からの蛍光がノイズとなり、目的の生体分子の動きを観察することが非常に困難でした。従いまして、蛍光標識 RuvB や SRA の動きを光学顕微鏡下で観察するために、新たな手法が必要となり、本研究では次世代 DNA シークエンサーの基幹技術として開発されたナノ開口基板を用いて、解析を行うことにしました。

ナノ開口基板はアルミニウム上に直径が 50 から 100 nm 程度の穴がアレイ上に並んだガラス基板です。石英ガラス上でのナノ開口作製の概要は箇条書きされた下記の通りです。

石英基板洗浄 脱水ベーク EB レジストコーティング エスパーサーコーティング EB 照射 エスパーサー除去 ベーク 現像 アルミニウム蒸着 リフトオフ

プラズマクリーニング

まず最初に石英ガラス基板に Negative Photoresist と呼ばれる電子線照射で固化する物質をコートします。次に直径が 100 nm となるように電子線を Negative Photoresist がコートされた石英ガラス基板に照射します。その後、このガラス基板を現像することで直径約 100 nm の円柱上の Negative Photoresist が残ります。次のこの上にアルミニウムを蒸着させ、基板に残った円柱上の Negative Photoresist を有機溶剤で溶かし、ガラス基板から除去することで、直径が 100 nm の穴がアレイ状に並んだナノ開口基板と呼ばれるものが出来上がります。この基板を用いると対象となる蛍光標識生体分子の濃度が数 μM 程度でも蛍光一分子イメージングが可能となります。

(2) DNA 及び蛋白質の準備

RuvB と UHRF1 の中のヘミメチル CpG 結合ドメインである SRA ドメインについて、蛍光標識蛋白質の作製を行いました。RuvB の蛍光標識においては RuvB にシステイン残基がありませんでしたので、N 末より 39 番目のアミノ酸であるセリンをシステインに置換した変異体 RuvB 蛋白質を作製しました。この変異体 RuvB 蛋白質に Cy5-マレイミドと呼ばれる化合物を用いて、チオール基のあるシステイン残基に蛍光色素である Cy5 が結合した Cy5-RuvB 蛋白質を作製しました。また、Cy5-RuvB の活性は野生型 RuvB と大きな違いが無かったことを生化学的解析から確認しました。

SRA につきましては SRA の N 末に Halo Tag と呼ばれる大きさが約 33 kDa のタグ蛋白質を融合させた形で精製し、Halo Tag 特異的に結合する蛍光色素を用いて、Tetra Methyl Rhodamine で標識された TMR-SRA を作製しました。また、その活性は蛍光標識されていない SRA とほぼ同じような活性を持つことも生化学的解析により確認しました。

本研究で使用する DNA は RuvB の研究においては十字型構造をとる Holliday 構造 DNA を用い、SRA の研究においては裸の DNA と Nucleosome と、それぞれに対する親和性の違いを比較するために Nucleosome 作製において、最も用いられている 601 Sequence と呼ばれる 145 bp の長さの配列を中央部に持つ DNA を用いました。

4. 研究成果

高精度で蛋白質や DNA の動きを計測、制御できる一分子計測技術を用いて、大腸菌の Holliday 構造 DNA の分岐点移動を促進するモーター蛋白質である RuvB の機能解析やエピジェネティック制御、特にメチル化 DNA 維持機構に大きく関与するヘミメチル CpG 結合ドメインである SRA の機能解析を中心に研究を進めました。RuvB 蛋白質については活性を保

持した蛍光標識された RuvB の作製に成功し、RuvB の六量体形成過程に関する研究を行いました。RuvB の 6 量体形成には高濃度の RuvB が必要で、一分子レベルでの解析には新たな一分子蛍光イメージング技術が必要となり、本研究ではナノ開口基板と呼ばれる、次世代 DNA シークエンサーに用いられる技術を応用して、Holliday 構造 DNA 上での RuvB の複合体が形成している様子を観察することに成功しました。また、ADP や ATP S 等の様々なヌクレオチドを用いることで、RuvB がどのような状況で、より六量体形成を促進するのかを明らかにすることができました。その結果、RuvB の 6 量体形成は、ATP との結合だけでなく、ATP 加水分解により促進することを示唆する結果を得ました。

SRA ドメインにつきましては、ナノ開口基板中に DNA のみ、又は Nucleosome を固定し、その上に TMR-SRA を加え、DNA または Nucleosome 1 分子に結合している TMR-SRA の個数を計測しました。その結果、SRA は Nucleosome より DNA に対して、高い親和性を持つことを示唆する結果を得ることが出来ました。

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 8 件)

Yong-Woon Han, Hiroshi Sugiyama, Yoshie Harada, The application of fluorescence-conjugated pyrrole/imidazole polyamides in the characterization of protein-DNA complex formation, *Biomaterials Science*, 査読有、4 巻、2016、391 - 399
DOI:10.1039/c5bm00214a

Takuma Iwasa, Yong-Woon Han, Ryo Hiramatsu, Hiroaki Yokota, Kimiko Nakao, Ryuji Yokokawa, Teruo Ono, Yoshie Harada, Synergistic effect of ATP for RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation, *Scientific Reports*, 査読有、5 巻、2015、e18177
DOI:10.1038/srep18177

Ikumi Oomoto, Asuka Suzuki-Hirano, Hiroki Umeshima, Yong-Woon Han, Hiroyuki Yanagisawa, Peter Carlton, Yoshie Harada, Mineko Kengaku, Akimitsu Okamoto, Tomomi Shimogori, Dan Ohtan Wang, ECHO-liveFISH: in vivo RNA labeling reveals dynamic regulation of nuclear RNA foci in living tissues, *Nucleic Acids Research*, 査読有、43 巻、2015、e126
DOI:10.1093/nar/gkv614

Yong-Woon Han, Yasuo Tsunaka, Hiroaki

Yokota, Tomoko, Matsumoto, Gengo, Kashiwazaki, Hironobu, Morinaga, Kaori, Hashiya, Tosikazu, Bando, Hiroshi, Sugiyama, Yoshie, Harada, Construction and characterization of Cy3- or Cy5-conjugated hairpin pyrrole-imidazole polyamides binding to DNA in the nucleosome, *Biomaterials Science*, 査読有, 2巻, 2014, 297 - 307
DOI:10.1039/c5bm60202h

Yong-Woon Han, Gengo Kashiwazaki, Hironobu Morinaga, Tomoko Matsumoto, Kaori Hashiya, Toshikazu Bando, Yoshie Harada, Hiroshi Sugiyama, Effecto of single pyrrole replacement with b-alanine on DNA binding affinity and sequence specificity of hairpin pyrrole/imidazole polyamides targeting 5'-GCCG-3', *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 査読有, 21巻, 2013, 5436 - 5441
DOI:10.1016/j.bmc.2013.06.005

Taiichi Tsuyama, Jun-ichi Kishikawa, Yong-Woon Han, Yoshie Harada, Asako Tsubouchi, Hiroyuki Noji, Akira Kakizuka, Ken Yokoyama, Tadashi Uemura, Hiromi Imamura, In vivo fluorescent ATP imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by using a genetically encoded fluorescent ATP biosensor optimized for low temperature, *Analytical Chemistry*, 査読有, 85巻, 2013, 7889 - 7896
DOI:10.1021/ac4015325

Naoko Mizuno, Marija Dramicanin, Michiyo Mizuuchi, Julia Adam, Yi Wang, Yong-Woon Han, Wei Yang, Alasdair C. Steven, Kiyoshi Mizuuchi, Santiago Ramon-Maiques, MuB is an AAA+ ATPase that forms helical filaments to control target selection for DNA transposition, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 査読有, 110巻, 2013, 2411 - 2415
DOI:10.1073/pnas.1309499110

Ling Chin Hwang, Anthony G. Vecchiarelli, Yong-Woon Han, Michiyo Mizuuchi, Yoshie Harada, Barbara E. Funnell, Kiyoshi Mizuuchi, ParA-mediated plasmid partition driven by protein pattern self-organizaion, *The EMBO Journal*, 査読有, 32巻, 2013, 1238 - 1249
DOI:10.1038/emboj.2013.34

[学会発表](計17件)

Yong-Woon Han, Biochemical analysis of

SRA, hemi-methylated CpG binding domain, 60th Annual meeting of biophysical society, 2016年2月27日~3月2日, ロスアンゼルス(米国)

韓 龍雲, RuvA-RuvB-Holliday 構造 DNA 複合体形成における ATP の影響, 2016年度生体運動研究合同班会議, 2016年1月8日~10日, キャンパスプラザ京都(京都府, 京都市)

韓 龍雲, メチル化 CpG 維持に關与する SRA ドメインの機能解析, 第38回日本分子生物学会年会, 2015年12月1日~4日, 神戸国際会議場(兵庫県, 神戸市)

Yong-Woon Han, Characterization of RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation using Zero mode waveguides, *iCeMS International Symposium, Hierarchical Dynamics in Soft Materials and Biological Matter*, 2015年9月23日~26日, 京都大学(京都府, 京都市)

Yong-Woon Han, Characterization of RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation using Zero mode waveguides, 第53回日本生物物理学会, 2015年9月13日~15日, 金沢大学(石川県, 金沢市)

Yong-Woon Han, Characterization of RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation process using single molecule fluorescence imaging technique, *The 18th iCeMS International Symposium*, 2015年3月2日~4日, 京都大学(京都府, 京都市)

Yong-Woon Han, Characterization of RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation process, 59th Annual meeting of biophysical society, 2015年2月7日~11日, ボルチモア(米国)

韓 龍雲, クロマチンリモデリング因子 Paf Complex の機能解析, 2015年度生体運動研究合同班会議, 2015年1月7日~9日, 学習院大学(東京都, 豊島区)

Yong-Woon Han, Characterization of RuvB complex formation with a RuvA-Holliday junction DNA using Zero Mode Waveguides, 3R Symposium, 2014年11月17日~21日, 御殿場高原ホテル(静岡県, 三島市)

Yong-Woon Han, Characterization of ATP-dependent chromatin remodeling complexes using fluorescently labeled nucleosome, 第52回日本生物物理学会, 2014年9月25日~27日, 札幌コンベンションセンター(北海道, 札幌市)

Yong-Woon Han、Characterization of RuvA-RuvB-Holliday junction DNA complex formation process using Zero Mode Waveguides、Graduate School of Biostudies & iCeMS Joing Symposium、2014年9月22日、京都大学（京都府、京都市）

韓 龍雲、ヌクレオソーム上の DNA に結合する Cy3-又は Cy5-標識 Pyrrole/Imidazole ポリアミドの合成と機能解析、第8回エピジェネティクス研究会年会、2014年5月25日～27日、東京大学（東京都、文京区）

Yong-Woon Han、Construction and characterization of Cy3- or Cy5-conjugated hairpin Pyrrole/Imidazole polyamides binding to DNA in the nucleosome、58th Annual meeting of biophysical society、2014年2月15日～19日、サンフランシスコ（米国）

韓 龍雲、相同組換え中間体 Holliday 構造 DNA の分岐点移動を促進する RuvB 6 量体リング構造の安定性に関する研究、2014年度生体運動研究合同班会議、2014年1月10日～12日、千葉大学（千葉県、千葉市）

韓 龍雲、ヘミメチル CpG 認識に関する SRA ドメインの機能解析、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日～6日、神戸国際会議場（兵庫県、神戸市）

Yong-Woon Han、Characterization of SRA-DNA complex using Zero Mode Waveguides、第51回日本生物物理学会、2013年10月28日～30日、京都国際会議場（京都府、京都市）

韓 龍雲、ヌクレオソーム上の DNA に結合する Cy3-又は Cy5-標識 Pyrrole/Imidazole ポリアミドの合成と機能解析、第7回エピジェネティクス研究会年会、2013年5月30日～31日、奈良県新公会堂（奈良県、奈良市）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.harada.icems.kyoto-u.ac.jp/member/mem03_han.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

韓 龍雲 (HAN, Yong-Woon)

京都大学・物質-細胞統合システム拠点・助教

研究者番号： 50566297

(2) 研究協力者

岩佐 拓磨 (IWASA, Takuma)

京都大学・大学院生命科学研究科・大学院