

研究課題別評価書

1. 研究課題名

DNA/タンパク質間相互作用の高精度 1 分子多次元解析

2. 氏名

横田 浩章

3. 研究のねらい

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。これらの機構において、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。DNA 修復装置が破綻すると突然変異が蓄積しやすくなり、細胞の癌化の原因となる。これらの過程では多くの酵素が構造タンパク質と多数のサブユニットからなる複合体として機能するが、3 次元構造を解くのが困難なこともあり、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。そこで本研究では、蛍光 1 分子イメージング技術と DNA 1 分子操作技術(磁気ピンセット)を組み合わせた同時計測顕微鏡を開発することにより、DNA/タンパク質間、タンパク質/タンパク質間の蛍光 1 分子イメージングと相互作用している DNA 1 分子の力学測定を同時計測を通して、DNA 複製・修復・組み換えの機構の素過程を 1 分子レベルで空間的・時間的に解明することを目指した。

4. 研究成果

1 分子同時計測(図 1)を達成するために、タンパク質と ATP の蛍光標識、観察ガラス基板上のタンパク質の非特異吸着を抑制する基板表面コーティング法の開発、1 分子同時計測システムの構築を行った(図 2)。本研究で主に扱った大腸菌の DNA 修復(ヌクレオチド除去修復・ミスマッチ修復)で、損傷(ミスマッチ)DNA を除去するヘリカース UvrD に関する成果について報告する。

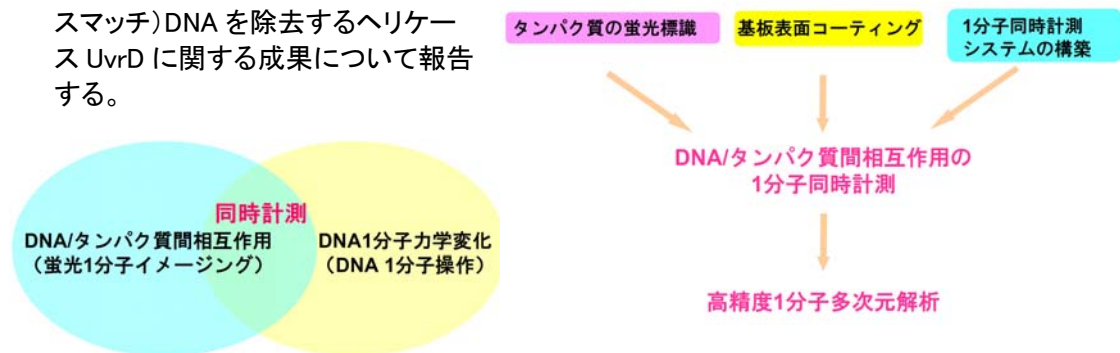


図 1 本研究で目指した 1 分子同時計測

図 2 1 分子同時計測の要素技術

(1) タンパク質と ATP 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。しかしながら、DNA 結合タンパク質に関しては蛍光標識の歴史が浅く、種々の標識法を試す必要がある。そこでまず、Cys 残基特異的に反応する官能基(マレイミド基)をもった蛍光色素がヘリカース UvrD の 2 つの Cys 残基(Cys52・Cys640)に標識されることを酵素消化・アミノ酸配列解析によって決定した。そして、この Cys 残基のうちの 1 つだけを欠失させた変異体(UvrDC640A)を作製し、単一の Cys 残基(Cys52)に 65%の標識率で蛍光

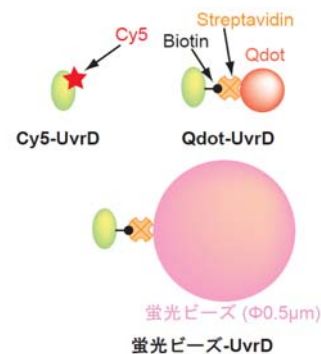


図 3 蛍光標識ヘリカース

標識することができた。また、分子生物学的手法によりビオチン化ペプチドタグを UvrD に導入し、ストレプトアビジンとの強固な相互作用を用いて、ヘリカーゼ活性を損なうことなく特異的に半導体超微粒子 (Qdot) や蛍光ビーズで標識することもできた (図 3)。その他、大腸菌やヒトの DNA 修復に関係するタンパク質のクローニング・発現・精製・蛍光標識も行った。ATP については、Cy3-ATP を合成し、それが UvrD の基質となることを確認した。

(2) 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 化した硼珪酸カバーガラス上では、十分なタンパク質非特異吸着抑制能がないという、まったく予想していなかった事態に遭遇した。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 4)。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。この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 5)。

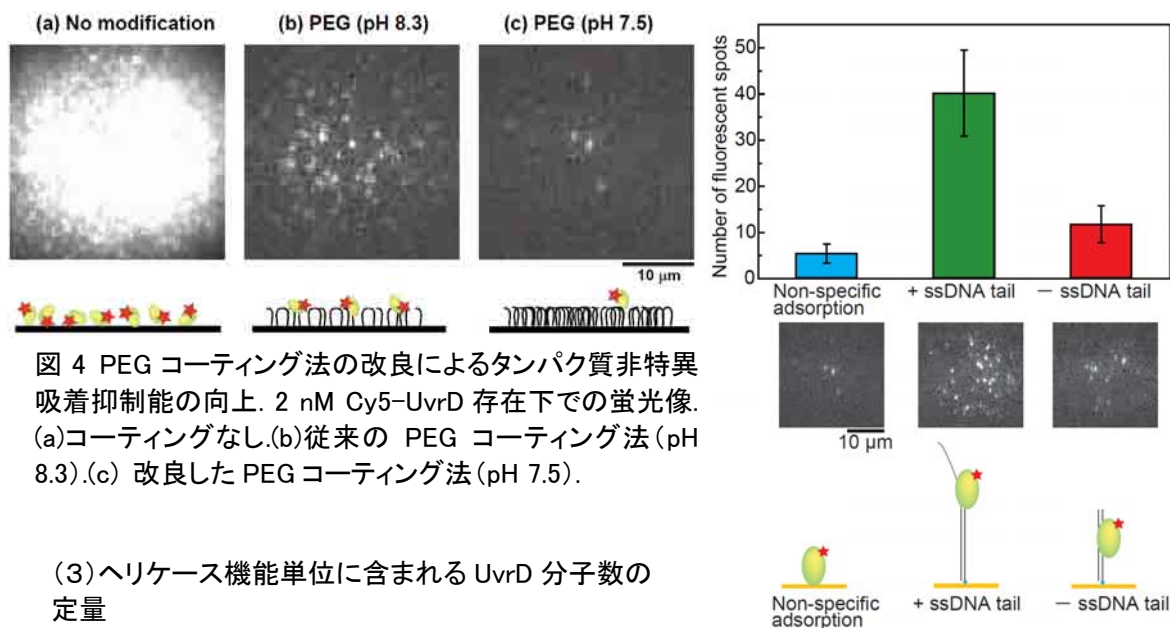


図 4 PEG コーティング法の改良によるタンパク質非特異吸着抑制能の向上。2 nM Cy5-UvrD 存在下での蛍光像。(a) コーティングなし。(b) 従来の PEG コーティング法 (pH 8.3)。(c) 改良した PEG コーティング法 (pH 7.5)。

(3) ヘリケース機能単位に含まれる UvrD 分子数の定量

Cy5 で標識した Cys 欠失変異体 UvrD (Cy5UvrD-C640A) を用いて、一本鎖突出 (dT₁₂、dT₂₀ 及び dT₄₀) をもつ 2 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。また、ATP 存在下での Cy5-UvrD-C640A の DNA への結合状態を観察したところ、やはり結合分子数が複数であることを明らかにした。この実験によって得られた結果は、UvrD が単量体ではなく、多量体でヘリケース活性を発揮していることを示している。

(4) 1 分子同時計測システムの構築

本研究では、DNA 1 分子操作法として、蛍光 1 分子イメージングと相性がよい磁気ピンセットを採用した。磁気ピンセットは、DNA にかかる張力を自在に変化させながら DNA の長さ変

図 5 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。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。

化を含む物理的・力学状態を計測できるのみならず、永久磁石を回転させることにより DNA の超らせん状態を制御することができる等の利点をもつ。

(4-1) 1分子同時計測顕微鏡の構築: 蛍光 1 分子イメージングと磁気ビーズセンシングが互いに干渉しないような光学系を構築した(図 6)。可視光レーザーによって励起した蛍光 1 分子像は、高感度 CCD カメラ(EMCCD カメラ)によって、蛍光 1 分子イメージングの障害とならないような波長の LED で照明した磁気ビーズ像は CCD カメラによって同時に観察できるようにした。この光学系によって、磁気ピンセットで DNA 1 分子を操作している磁気ビーズとその DNA と相互作用する Qdot-UvrD の蛍光 1 分子イメージングを可能になった(図 7)。

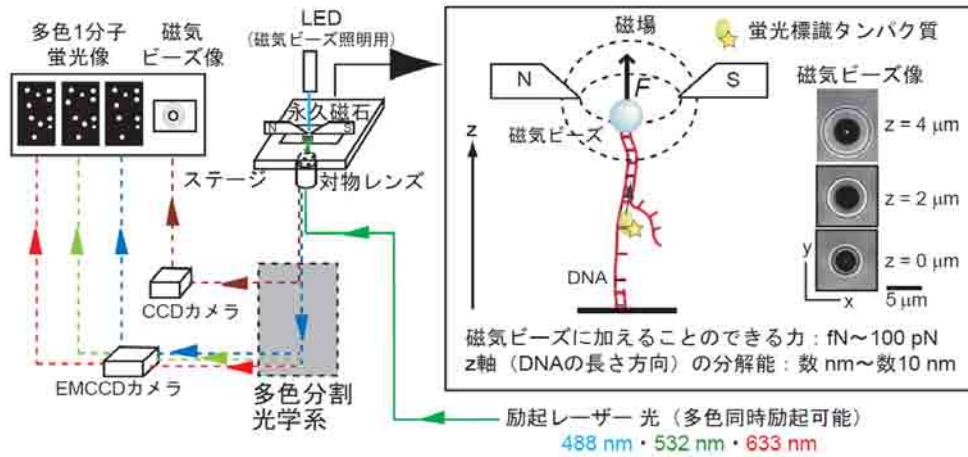


図 6 1 分子同時計測顕微鏡. 複数の可視光レーザーにより励起されたタンパク質に標識された蛍光分子から発する蛍光は、ダイクロイックミラー、バンドパスフィルターからなる多色分割光学系により、波長(色)で分けられた後、1 台の EMCCD カメラで多色同時 1 分子イメージングされる。磁気ピンセットによる DNA 1 分子操作は DNA が結合した磁気ビーズを永久磁石によって引っ張ることで行う。蛍光 1 分子イメージングの背景光とならないような波長の LED によって照明された磁気ビーズは CCD カメラで観察され、そのデフォーカス像の実時間解析から DNA の長さ変化を、多色同時 1 分子イメージングしながらモニターすることができる。

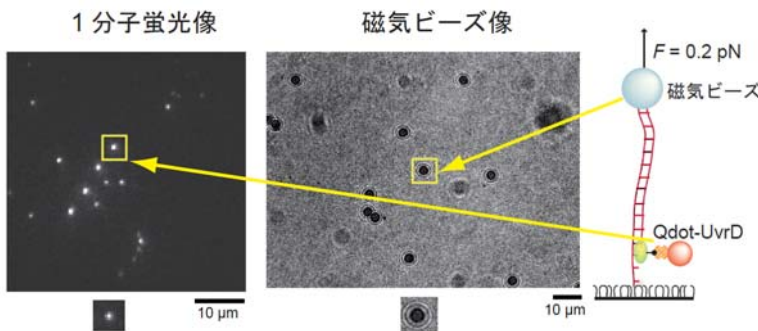


図 7 1 分子蛍光像と磁気ビーズ像の同時観察. 黄色い口で囲んだ部分にある蛍光像と磁気ビーズ像が右図を示す DNA/ヘリケース複合体を形成している。

(4-2) 高精度 1 分子多次元解析用ソフトウェアの開発: 機械的制御(対物レンズを微動するための piezo 素子の駆動、永久磁石を上下に動かすモーターの駆動、永久磁石を回転させるモーターの駆動)、画像取得

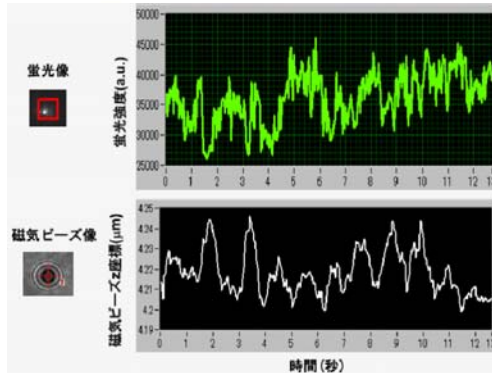


図 8 1 分子同時計測画面(抜粋). 1 分子蛍光像と磁気ビーズ像が右側に表示される。それらの像をもとに、蛍光強度と磁気ビーズの z 座標の時間変化が、右側のチャートに実時間表示されている。

(CCD カメラの磁気ビーズ像、EMCCD カメラの蛍光 1 分子像) 及び画像解析 (DNA の力学変化に伴う磁気ビーズの xyz の 3 次元座標実時間測定、蛍光輝点の 1 分子蛍光強度実時間測定) が総合的に見えるソフトウェアを開発し、実際に同時計測することができた (図 8)。

5. 自己評価

本研究では、これまできわめて限定的にしか行われてこなかった DNA 結合タンパク質の直接蛍光 1 分子イメージングを容易する基板表面コーティング法を開発しつつ、蛍光 1 分子イメージング技術と DNA 1 分子操作技術 (磁気ピンセット) を組み合わせた 1 分子同時計測顕微鏡を開発した。DNA を 1 分子操作しながら、その DNA と相互作用している 1 分子の DNA 結合タンパク質の蛍光 1 分子イメージングが可能となり、実時間で 1 分子の蛍光強度変化と DNA の物理変化に伴う磁気ビーズ (複数) の z 座標を計測できるこれまでにない新規の顕微鏡が完成したことになる。蛍光 1 分子イメージング技術及び DNA 1 分子操作技術は既存のものであるが、これらを組み合わせることには、顕微鏡のあらゆるコンポーネントの精査が必要であり、種々の工夫が必要であった。顕微鏡開発の過程以外で予想外であったのは、従来の表面コーティング法ではタンパク質のガラス基板上への非特異吸着抑制能が不十分で蛍光 1 分子イメージングが難しいことを発見したことである。蛍光 1 分子イメージングは本研究課題の最も基盤をなす技術であり、タンパク質のガラス基板上への非特異吸着抑制能を改良することが不可避となり、新しい表面コーティング法の開発に苦心した。

顕微鏡は完成したものの、研究期間中に最終目的である DNA/タンパク質間相互作用の素過程の解明には至らなかったのが残念であり、大いに反省すべき点である。具体的な成果としては、蛍光 1 分子イメージングによるヘリケースの DNA 結合モードのイメージングと、ヘリケースの機能単位中に含まれる分子数の定量にとどまり、1 分子同時計測による意味のあるデータを示すことができなかった。全体として達成度は 6 割程度と考えている。

今後、効率のよいデータ取得のため、さらなる系全体の改良が必要である。本研究で開発した顕微鏡によって得られるであろう情報は、これまで得られたことのない時間・空間的に多次元にわたるものであるので、何とか同時計測を実現させ、DNA 複製・修復・組み換えの機構において未解決の重要な問題に迫っていきたい。

6. 研究総括の見解

DNA とタンパク質 (ヘリカーゼ) との相互作用 (結合・解離) を、力を加えつつ 1 分子レベルで計測するための光学顕微鏡を開発した点は評価したい。しかしながら具体的測定対象については、DNA にヘリカーゼ何分子が結合しているかを直接観測したことは評価するものの、DNA-タンパク質間相互作用の何が初めて明らかにされたのかが明確でない。意義のあるターゲットの絞り込みが今後の課題であろう。

7. 研究成果リスト

A. さきがけ個人研究者が主導で得られた成果

(1) 論文 (原著論文) 発表

論文 (国際)

・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).

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件 (出願公開前)

(3) 学会発表

学会発表 (国際)

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

Novel Microscopy for simultaneous single molecule measurement of DNA/protein interaction. 5th East Asian Biophysics Symposium & 44th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (2006/11/14).

•Yokota, H., Han, Y. W., Allemand, J.-F., Xi, X. G., Croquette, V., Bensimon, D., Harada, Y. Single-molecule Observation of DNA/helicase Interaction by Novel Microscopy. The joint 52nd Annual Meeting of the Biophysical Society and 16th IUPAB International Biophysics Congress (2007/12/3).

•Yokota, H., Han, Y. W., Allemand, J.-F., Xi, X. G., Croquette, V., Bensimon, D., Harada, Y. Single-molecule Observation of DNA/helicase Interaction by Novel Microscopy. The first iCeMS Symposium, featuring mesoscopic interactions in cells and cellular membranes and the 11th International Membrane Research Forum (2008/2/21).

•Yokota, H., Han, Y. W., Allemand, J.-F., Xi, X. G., Croquette, V., Bensimon, D., Harada, Y. Single-molecule observation of DNA/helicase interaction. Gordon Research Conference: Single molecule approaches to biology (2008/8/21).

•Chujo, Y., Harada, Y., Yokota, H. Single-molecule visualization of the oligomeric form of Escherichia coli UvrD helicase in vitro. 54th Biophysical Society Annual Meeting (2010/2/22).

学会発表(国内)

•横田浩章, 韓龍雲, Allemand, J.-F., Xi, X. G., Croquette, V., Bensimon, D., 原田慶恵, 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45回年会 (2007/12/23).

•横田浩章, 韓龍雲, Allemand, J.-F., Xi, X. G., Croquette, V., Bensimon, D., 原田慶恵, 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 (2008/12/4).

•中条裕子、原田慶恵、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 (2009/1/11).

•横田浩章, 中条裕子, 西幹栄美, 原田慶恵, Single-molecule observation of DNA-helicase interactions. 第47回日本生物物理学会年会 (2009/11/1).

(4) 招待講演

招待講演(国際)

•Yokota, H., Single-molecule imaging of DNA-protein interaction 5th Handai Nanoscience and Nanotechnology International Symposium Nano-Advanced Materials Design - From Nano-Structure to Nano-Functionality - (2009/9/2).

•Yokota, H., Harada, Y. Single-molecule observation of DNA-helicase interactions The 13th Membrane Research Forum & The 6th iCeMS International Symposium Featuring Nan-Meso Membrane Mechanisms. (2010/1/28).

B. 本研究課題に関連した成果で主なもの

(1) 論文(原著論文)発表

論文(国際)

・Kozuka, J., Yokota H., Arai Y., Ishi Y., Yanagida T. Dynamic polymorphism of actin as activation mechanism for cell motility. Biosystems 88, 273–282 (2007).

・Allemand, J.-F., Bensimon, D., Charvin, G., Croquette, V., Lia, G., Lionnet, T., Neuman, K. C., Saleh, O. A., and Yokota, H. Studies of DNA–protein interactions at the single molecule level with magnetic tweezers. Lect. Notes Phys. 711, 123–140 (2007).

(2) 著書

・横田浩章, 原田慶恵, 光ピンセット ～生体分子の操作と力・変位計測～ 生命科学のための機器分析実験ハンドブック(羊土社)p.99–104 (2007).

(3) 学会発表

学会発表(国内)

・大江良洋, 貴家康尋, 横田浩章, 小原収, 原田慶恵, 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(2009/3/6).

(4) 招待講演

招待講演(国内)

・横田浩章, タンパク質分子ダイナミクスの 1 分子計測 慶應大学理工学部物理学科談話会 (2007/5/23).

・横田浩章, 光学顕微鏡による生体分子・細胞生物学研究のこれまでと将来展望 第 4 回放射光学会若手ワークショップ「次世代放射光源を用いた生命科学未踏領域への挑戦」(2007/8/6).