



2020年8月25日

報道機関 各位

東北大学多元物質科学研究所

DNA 結合タンパク質のジャンプまで観察できるサブミリ秒分解単分子蛍光計測法の提案 —がん抑制タンパク質 p53 の速い運動の発見—

【発表のポイント】

- DNA 結合タンパク質の DNA 上での動きを計測できる単分子蛍光顕微鏡の時間分解能をサブミリ秒に向上
- がん抑制タンパク質 p53^{注1)}の DNA への過渡的な結合中間体を発見
- p53 が DNA 上でジャンプすることを発見
- p53 が、DNA 結合ドメインをホップさせながら、DNA 上を動く可能性を提案

【概要】

DNA 結合タンパク質は、細胞内にある DNA の中から結合すべき標的部位を探索し、そこに結合して機能を発揮しています。この探索運動を明らかにするために、単分子蛍光顕微鏡を用いてその動きを追跡する方法が用いられています。しかし、測定的时间分解能（例えば、33 ミリ秒）内に起こる素早い運動を計測することは困難でした。

東北大学多元物質科学研究所の鎌形清人准教授らの研究グループは、単分子蛍光顕微鏡に、強力なレーザー光による臨界角の全反射照明^{注2)}とカメラの1次元検出を組み合わせることで、サブミリ秒の時間分解能を達成しました。この方法を用いてがん抑制タンパク質 p53 の挙動を観察したところ、DNA への結合時に過渡的な中間体を經由することと、DNA 上でのジャンプ運動を発見しました。さらに、p53 は、DNA 結合ドメインを結合・解離させながら DNA 上を動く可能性が明らかになりました。本研究で提案したサブミリ秒分解単分子計測法は、DNA・蛋白質複合系の機能解析に役立つことが期待されます。

本研究成果は、2020年8月13日に英国科学誌 *Scientific Reports*（オンライン版）に掲載されました。本研究は、科学研究費助成事業の支援を受けて、実施されました。

【研究背景】

DNA 結合タンパク質は、細胞内にある DNA の中から標的部位を探索し、そこに結合し、機能を発揮しています。この標的部位への結合には、(1) DNA に沿ってスライディングする、(2) DNA 上でジャンプする、(3) 2 本の DNA 間を移動するなどの探索運動が考えられます。これらの探索運動を調べるのに、単分子蛍光顕微鏡を用いて、蛍光色素を修飾したタンパク質の DNA 上での動きを追跡する方法が用いられています (Fig. 1a)。例えば、がん抑制に関与する DNA 結合タンパク質 p53 の場合、DNA 上のスライディング運動や DNA 間移動がすでに明らかにされています。しかし、計測の時間分解能 (例えば、33 ミリ秒) 内に起こる素早い運動があると考えられますが、それを計測する方法がありませんでした。

【研究の成果】

研究グループは、まず、DNA・蛋白質の複合系に特化した単分子蛍光顕微鏡の時間分解能の向上に取り組みました。DNA をガラス基板にその末端を介して固定し、その DNA に結合するタンパク質を入射レーザー光で照明し、タンパク質から出る蛍光をカメラで検出します (Fig. 1b)。実際には、2 次元画像の中に、複数の DNA に結合したタンパク質が蛍光スポットとして検出されます。私たちは、(1) 短い時間でも十分な蛍光の光子数を得られるように入射光強度を高くし、(2) 検出光路にスリットを導入し、検出される DNA を 1 本に絞り、(3) カメラによる検出を 2 次元から 1 次元に減らすことで、時間分解能の向上を試みました (Fig. 1b のピンク色の枠)。続いて、ガラス基盤から少し離れた位置にある DNA を適切に照明する方法を検討し、対物レンズに入射光を全反射照明が起こる角度 (臨界角) で導入することが最適であることを突き止めました (Fig. 1c)。改良した蛍光顕微鏡と臨界角全反射照明を用いて、500 マイクロ秒の時間分解能での計測が可能となりました。これまで、DNA 結合タンパク質の計測の時間分解能は 8 ミリ秒が最高でしたが、大幅に更新することに成功しました。

次に、開発した方法を用いて、がん抑制タンパク質 p53 の素早い運動の計測を行いました。まず、DNA への p53 の結合時間を計測したところ、数ミリ秒の短い結合の存在が明らかとなりました。これは、p53 が DNA への結合時に過渡的に形成する中間体であると考えられます (Fig. 2a)。次に、DNA 上での p53 の動きを追跡したところ、DNA 上で p53 がジャンプ運動することを明らかにしました。このジャンプ運動は、細胞内で DNA 上に結合している多くの障害物タンパク質を避けて、p53 が効率的に標的を探索できるようにしていると考えられます。最後に、p53 の DNA 上の動きを詳細に解析したところ、p53 が、DNA 結合ドメインをホップさせながら、DNA のリン酸骨格に沿わずに移動する可能性が明らかになりました (Fig. 2b)。

今後、本研究で提案したサブミリ秒分解単分子計測法は、p53 だけでなく、様々な DNA 結合タンパク質の機能解析に役立つと期待されます。

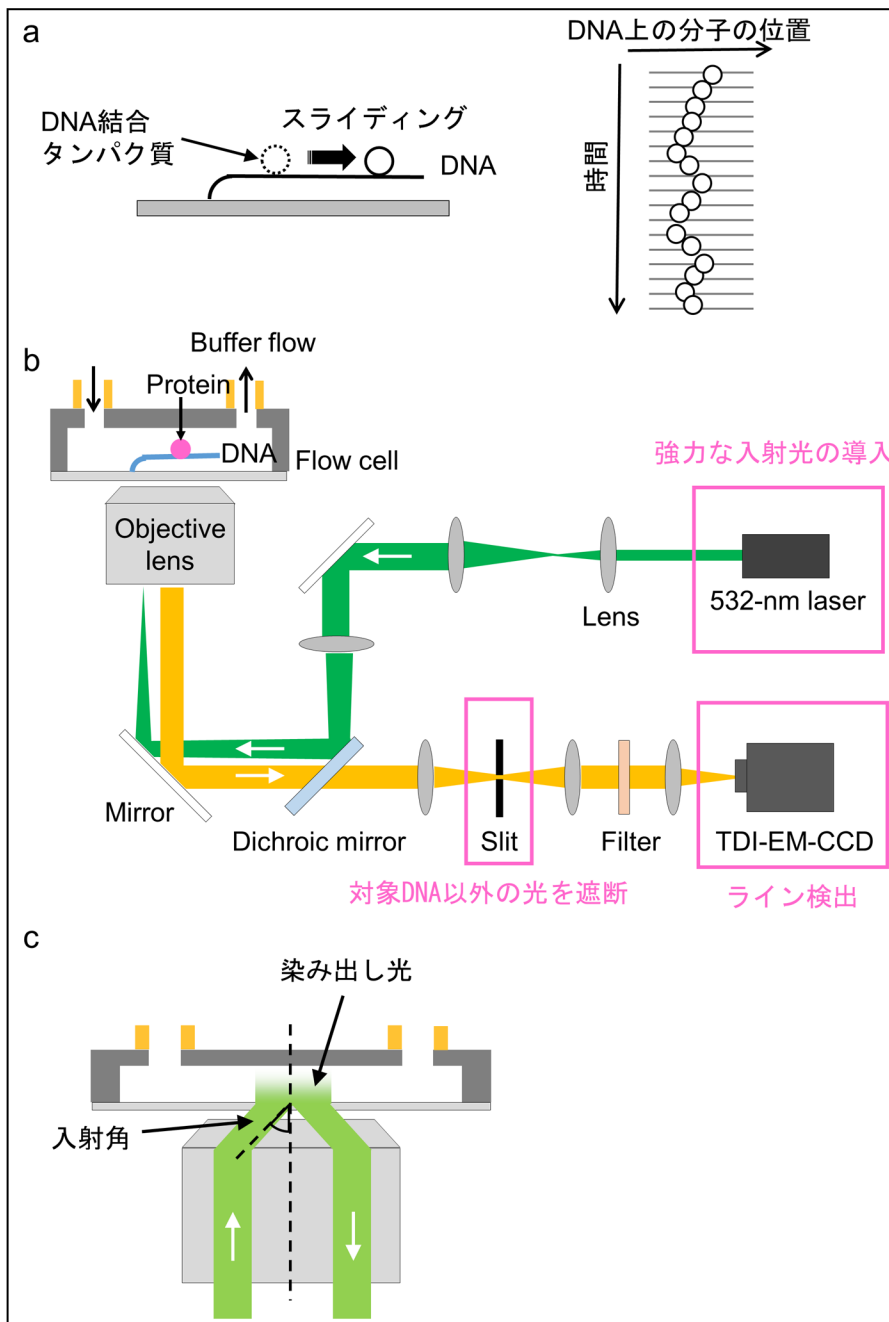


Fig.1 a) DNA 結合タンパク質の DNA 上での動きの単分子計測。b) DNA・タンパク質の複合系を対象としたサブミリ秒時間分解単分子蛍光顕微鏡。532 nm のレーザーでフローセル内のタンパク質を照明し、タンパク質から出る蛍光をカメラで検出します。ピンク枠は、今回改良した点を表しています。c) 全反射照明の模式図。入射角が臨界角を超えると、溶液とガラスの界面で、入射光が反射され、染み出し光が生じます。原著論文の図 1,2 より転載しました。

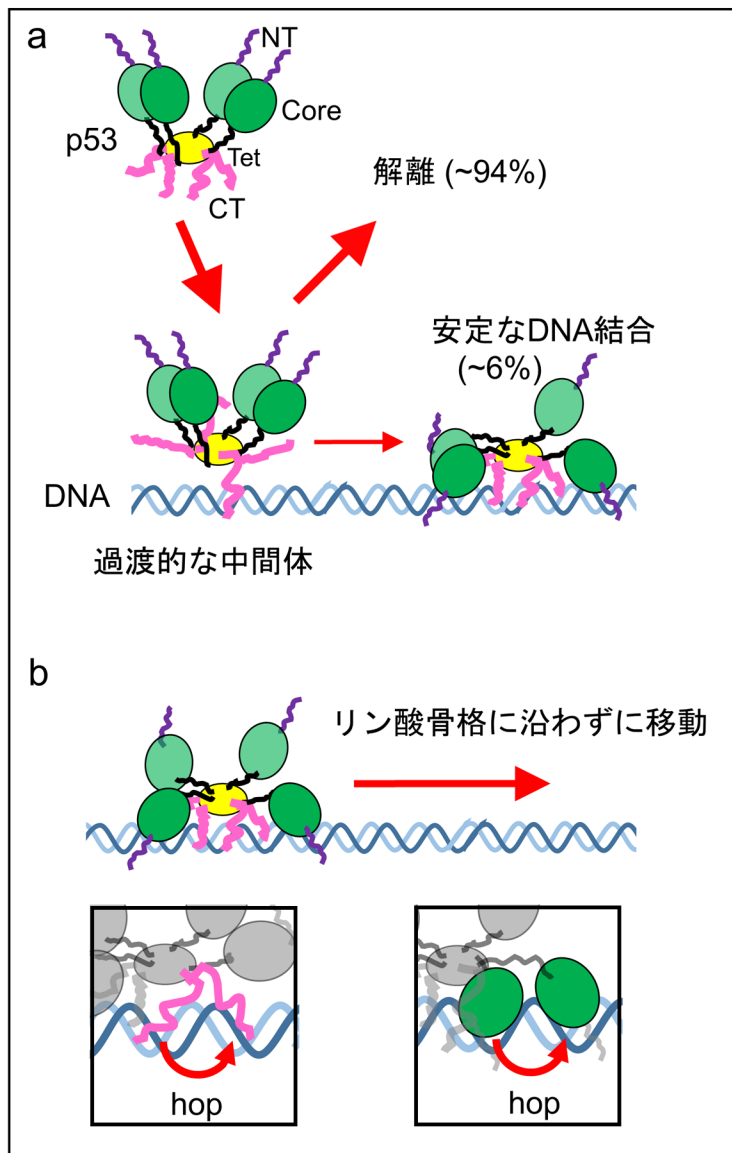


Fig.2 サブミリ秒分解単分子蛍光計測から明らかにされた、がん抑制タンパク質 p53 の DNA 上での動きに関する模式図。a) p53 は、過渡的な DNA 結合中間体を経て、安定な DNA 結合複合体を形成します。NT、Core、Tet、CT は、それぞれ、N 末ドメイン、コアドメイン、4 量体ドメイン、C 末ドメインを表しています。b) p53 は、DNA のリン酸骨格（青）に沿わずに移動します。この際、Core と CT の DNA 結合ドメインを DNA に結合させたり、離したりしながら、移動すると考えられます。原著論文の図 6 より転載しました。

【論文情報】

題目：Transient binding and jumping dynamics of p53 along DNA revealed by sub-millisecond resolved single-molecule fluorescence tracking

著者：Dwiky Rendra Graha Subekti^{1,2}, Agato Murata^{1,2}, Yuji Itoh¹, Satoshi Takahashi^{1,2}, and Kiyoto Kamagata^{1,2,*}

所属：¹ 東北大学 多元物質科学研究所, ² 東北大学大学院 理学研究科化学専攻

雑誌：*Scientific Reports* 10, 13697 (2020)

URL：<https://www.nature.com/articles/s41598-020-70763-y>

DOI：10.1038/s41598-020-70763-y

【用語解説】

注1) がん抑制タンパク質 p53

がん抑制タンパク質 p53 は、ゲノムの守護神と呼ばれ、ゲノム DNA 上の特定の部位に結合し、下流の遺伝子の発現を制御します。そして、細胞周期の停止、損傷した DNA の修復、およびアポトーシスなどを引き起こし、細胞のがん化を抑制しています。ヒトのがん細胞の約 50%において、p53 遺伝子の変異が原因であることが知られています。

注2) 全反射照明

ガラスと溶液の界面に入射光を導入する時、ある入射角（臨界角）を超えると、入射光が界面で反射する現象（全反射）が起こる。この際、界面付近で染み出し光が発生する。この染み出し光を利用した照明法。

【お問い合わせ先】

(研究に関すること)

東北大学多元物質科学研究所

准教授 鎌形 清人 (かまがた きよと)

電話：022-217-5843

Email：kiyoto.kamagata.e8@tohoku.ac.jp

(報道に関すること)

東北大学多元物質科学研究所 広報情報室

電話：022-217-5198

E-mail：press.tagen@grp.tohoku.ac.jp