

DNA 修復機構の蛍光 1 分子イメージング

光産業創成大学院大学 光産業創成研究科 光バイオ分野

横田 浩章

1. 目的

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DNA修復機構が必要である。DNA修復機構のうちの一つであ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。ヒトでは、ヌクレオチド除去修復の遺伝的欠損は、皮膚の光線過敏症状と皮膚がんの高発を特徴とする色素乾皮症 (xeroderma pigmentosum: XP) などの疾患の原因となると考えられている。

これまで、除去修復機構に關与する数々のタンパク質の同定と構造解析がなされ、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きた。一方、実際これらのタンパク質が機能する多数のサブユニットからなる複合体の3次元構造を解くのが困難なこともあり、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。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。

本研究では、真核生物(ヒト)のヌクレオチド除去修復でDNA損傷認識に關与するタンパク質群に注目し、それらのタンパク質とDNAとの相互作用及び実際の損傷部位の認識過程における修復タンパク質の作用機序に蛍光プローブで標識したタンパク質1分子をDNA上で直接イメージングすることで迫ることを目的とした。筆者がこれまで独自に開発してきたDNA - 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1分子計測顕微鏡を用いて、従来用いられてきた損傷部位のないIDNAに加えて、損傷部位を挿入したDNAを用いてイメージングを行う。

2. 方法

(1) DNA修復タンパク質の蛍光標識及びDNA基質の作製

(1-1) DNA修復タンパク質の蛍光標識

高精度な1分子イメージング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分子に対応しており、またDNA基質のも可視化できていることが望ましい。

本研究では、ヒトのヌクレオチド除去修復でDNA損傷認識に關わるXPC複合体 (XPC-RAD23B) を、ビオチン - アビジン相互作用を用いて半導体超微粒子 (Qdot) で特異的に標識した。XPC複合体のビオチン化は、ビオチン化ペプチドタグを融合したXPCを含むXPC複合体をビオチン存在下でビオチンリガーゼに作用させることで行った。このビオチン化したXPC複合体に、ストレプトアビジンコートされたQdotを加え、Qdot標識XPC複合体を得た。

(1-2) 短いIDNA基質の作製

本研究で使用する31bpあるいは71bpの短いIDNAに関しては、相補的な配列をもつ2つのDNAオリゴをアニーリングすることによって作製した。DNAをガラス基板にビオチン - アビジン相互作用で固定するため、二本鎖DNAの片端をビオチン化している。また、DNAの局在を知るために、二本鎖DNAのもう一方の片端に蛍光色素を付加してある。この作製方法により、損傷部位をもたない二本鎖DNAのほか、単一のDNA損傷部位 (シクロブタン型ピリミジン二量体あるいは(6-4)光産物) をもつ二本鎖DNAを得た。

(1-3) 長いIDNA基質の作製

本研究で用いる長いIDNAに関しては、DNA (48,502bp、伸長時の長さ約16 μ m) を用いた。損傷部位を含む DNAは、DNAを紫外線照射することによって作製した。また、DNAの両端をストレプトアビジンコートしたシリカビーズ間に固定するため、DNAの両端にあるcos配列を利用してビオチン化した。

(2) DNA修復タンパク質の蛍光1分子イメージング

DNA タンパク質間相互作用の蛍光1分子イメージングは開発済みの1分子計測顕微鏡を用いて行った¹。具体的には、ヒトのヌクレオチド除去修復で損傷部位を認識するXPC複合体について、短いIDNA (31 bpあるいは71 bp・長さ10 ~ 20nm程度) あるいは長いIDNA (48,502 kbp・長さ16 μ m程度) をガラス基板に固定して蛍光1分子イメージングした。短いIDNAを用いる場合は、DNAの片端をガラス基板に固定した。長いIDNAを用いる場合は、DNAの両端を直径が2 μ mのシリカビーズ間に固定することによってDNAを伸張し、DNAのインターカレーターであるYOYO1で蛍光標識してその位置がわかるようにした。視野にあるYOYO1で蛍光標識したDNA及びQdotで標識したXPC複合体は、それぞれ異なる波長の蛍光を発するため、蛍光波長によって同一視野を2つ

分けて同時にイメージングした¹。蛍光1分子イメージングに用いたガラス基板及びシリカビーズの表面は、タンパク質の非特異吸着を抑制しDNA基質をビオチン-アビジン相互作用によって固定するため、ポリエチレングリコール (PEG) (1%のビオチンPEGを含む) でコーティングしたものをを用いた²。

3. 結果

DNA修復における最も根本的な問題の一つは、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点である。ゲノム全体を対象とするヌクレオチド除去修復において、損傷部位の認識と修復反応の開始に関わるXPC複合体は、非損傷DNAに対しても比較的強く結合するが、損傷DNAにはさらに高い親和性をもって特異的に結合することが報告されており³、これがDNAにまれにしかない損傷部位を効率よく探し出す機構としてはたらいっていると考えている。そこで、本研究ではQdotで標識したXPC複合体と非損傷あるいは損傷DNAとの相互作用の1分子イメージングを行った。

(1) 短いDNAにおける損傷部位認識機構の相互作用の1分子イメージング

短いDNAを用いた系では、33bpあるいは71bpの非損傷DNA・単一の損傷を含むDNAへのXPC複合体の結合・解離のダイナミクスの蛍光1分子イメージングを行った。そして、次の3つの結果を得た。

非損傷DNAと単一の損傷を含むDNAの間でXPC複合体がDNAに結合するレートに大きな違いはない(図1左)。

非損傷DNAとシクロブタンダイマーを含むDNAからのXPC複合体が解離しない割合は50%程度で同等であるが、(6-4)光産物を含むDNAのその割合は80%で突出して高い(図1右)。

33bp DNAより71bp DNAへのXPC複合体の結合アフィニティが高い。

(2) 長いDNAにおける損傷部位認識機構の相互作用の1分子イメージング

長いDNAを用いた系では、非損傷あるいは紫外線照射で損傷部位を DNA上でのXPC複合体の結合・解離のダイナミクスの蛍光1分子イメージングを行った。そして、次の2つの結果を得た。

紫外線損傷を与えたDNA上では、数珠状に結合しているXPC複合体をイメージングした(図2)。また、損傷DNAへ結合する瞬間をイメージングした。

非損傷DNA上での結合・解離及びDNAに沿った1次元拡散運動(図3)を観察した。中には数分間にわたって運動を行うものがあり(図4(a))、その拡散係数(図4(b))は広い分布(0.01~数10 $\mu\text{m}^2/\text{s}$)を示した(図4(c))。このことは、この1次元運動がDNAの二重らせんを忠実にスキャンしていないことを示唆している⁴。

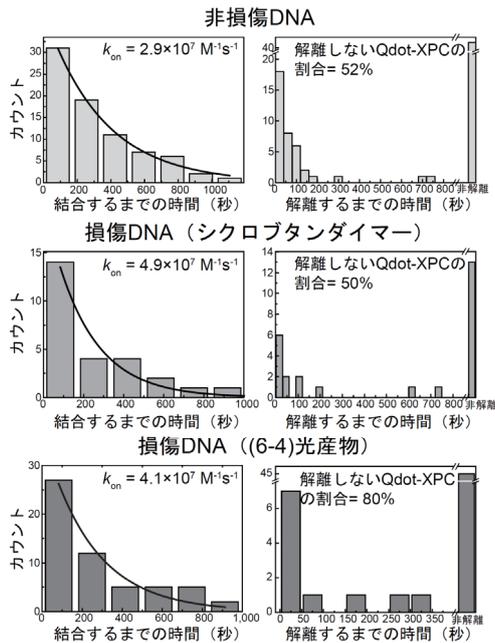


図1 XPC 複合体の非損傷・損傷 DNA (71bp)との結合・解離のダイナミクスの蛍光 1 分子イメージング (左)結合するまでの時間のヒストグラムと、フィッティングから求めた結合レート。(右)解離するまでの時間のヒストグラムと、観察時間内に解離しなかった Qdot-XPC のカウントと割合。

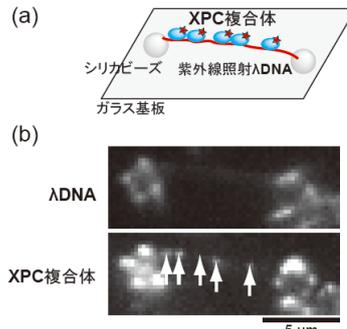


図2 XPC 複合体の紫外線損傷 DNA への結合の蛍光 1 分子イメージング (a)実験模式図。(b)同時観察蛍光像。矢印で示す XPC 複合体が DNA に数珠状に結合していることがわかる。

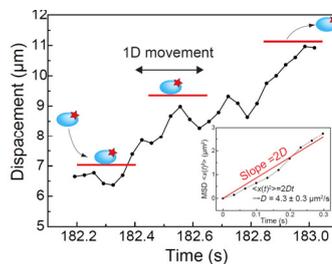


図3 XPC 複合体の非損傷 DNA 上での解離ダイナミクスの 1 分子イメージング DNA に結合した後、1次元運動をして解離した例。平均二乗変位 (MSD) から拡散係数を求めることができる。

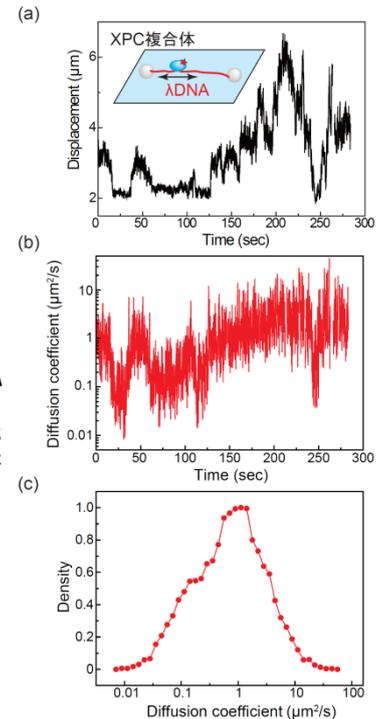


図4 XPC 複合体の非損傷 DNA 上での長時間 1次元拡散運動 (a)変位の時間変化。(b)拡散係数の時間変化。(c)拡散係数の分布。

4 . 考察

本研究では、真核生物（ヒト）のヌクレオチド除去修復でDNA損傷認識に關与するXPC複合体を、非損傷あるいは損傷DNA上で直接蛍光1分子イメージングし、従来の生化学的な研究手法では解明が難しいXPC複合体のDNAへの結合・解離のダイナミクスに迫った。本研究により、XPC複合体の損傷部位への高いアフィニティとDNA上での1次元拡散運動が明らかとなった。これらの結果は、従来の生化学的な方法で行われた先行研究^{3,5}の結果と矛盾しない。本研究で得られた結果は、XPC複合体がDNAの二重らせんを忠実にスキャンせずに高速にDNA上を1次元拡散運動して移動し、損傷DNAに高いアフィニティで結合してまれにしかない損傷部位を効率よく探し出しだしていることを強く示唆している。

5 . 参考文献

1. Yokota, H., Chujo, Y. A., Harada, Y. Single-molecule imaging of the oligomer formation of the nonhexameric *Escherichia coli* UvrD helicase. *Biophys. J.* **104**, 924-933 (2013).
2. Yokota, H., Han, Y. W., Allemand, J.-F., Xi, X. G., Bensimon, D., Croquette, V., Harada, Y. Single-molecule visualization of binding modes of helicase to DNA on PEGylated surfaces. *Chem. Lett.* **38**, 308-309 (2009).
3. Sugasawa, K., Shimizu, Y., Iwai, S., Hanaoka, F. A molecular mechanism for DNA damage recognition by the xeroderma pigmentosum group C protein complex. *DNA Repair (Amst)* **1**, 95-107 (2002).
4. Kochaniak, A. B., Habuchi, S., Loparo, J. J., Chang, D. J., Cimprich, K. A., Walter, J. C., van Oijen, A. M. Proliferating cell nuclear antigen uses two distinct modes to move along DNA. *J. Biol. Chem.* **284**, 17700-17710 (2009).
5. Hey, T., Lipps, G., Sugasawa, K., Iwai, S., Hanaoka, F., Krauss, G. The XPC-HR23B complex displays high affinity and specificity for damaged DNA in a true-equilibrium fluorescence assay. *Biochemistry* **41**, 6583-6587 (2002).