

研究成果報告書

(国立情報学研究所の民間助成研究成果概要データベース・登録原稿)

研究テーマ (和文) AB	新規一分子機能計測法によるがん抑制因子 p53 の DNA 走査過程の解明				
研究テーマ (欧文) AZ	Single-molecule characterization of target DNA search mechanism of p53				
研究氏 代表名 者	カナ CC	姓)カマガタ	名)キヨト	研究期間 B	2013 ~ 2015 年
	漢字 CB	鎌形	清人	報告年度 YR	2015 年
	ローマ字 CZ	kamagata	kiyoto	研究機関名	東北大学
研究代表者 CD 所属機関・職名	東北大学多元物質科学研究所・助教				

概要 EA (600 字~800 字程度にまとめてください。)

DNA 結合蛋白質は、DNA の特定の部位に結合し、細胞の機能を制御することができる。しかし、「蛋白質がどのように 10^9 塩基対の DNA の中からわずか 20 塩基対の標的配列を探索し、結合できるのか？」という物理・化学・生物学的な疑問点は明らかにされていない。そこで、DNA 上の蛋白質の動きを単分子蛍光イメージングにより可視化することが必要であると考えた。細胞増殖の抑制、細胞死、DNA の修復などのがん抑制機能を持つ蛋白質 p53 を研究対象に選んだ。p53 は凝集しやすく活性のある状態で精製することが難しかったが、熱安定変異体を作製することで物理化学的な計測を可能にした。次に、全反射蛍光顕微鏡を作製し、DNA 上で p53 単分子の運動を観測した(図 1)。大量の単分子データを取得するため、マイクロコンタクトプリント技術を用いた DNA 整列固定技術を開発し、一部の単分子データの取得に使用した。p53 の DNA 上での拡散運動が $[Mg^{2+}]$ や $[Ca^{2+}]$ の濃度の上昇に伴い増加するが、DNA 上の探索距離は保持されていた。実際の細胞で起こる $[Mg^{2+}]$ や $[Ca^{2+}]$ の変化に対して、p53 の DNA 結合運動は制御されている。さらに、p53 には素早く探索する時と動かない時があり、複数の p53・DNA 複合体構造が考えられる。以上より、単分子蛍光観測を用いて生物学的に重要な蛋白質 p53 の機能を“動き”の視点で解析し、新しい知見を得ることができた。将来的に、p53 の関わる細胞のがん化機構の解明や他の DNA 結合蛋白質の機能解析などへの応用が期待される。

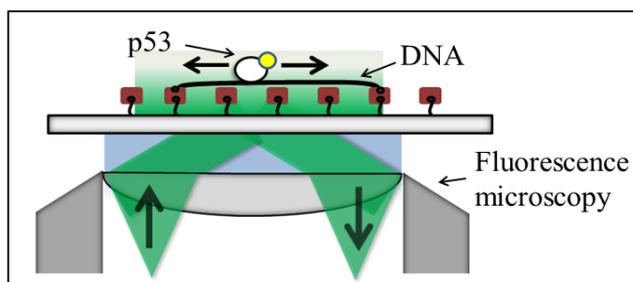


図 1 p53 の DNA 上でのスライディング運動の単分子蛍光観察

キーワード FA	単分子	p53	DNA	機能
----------	-----	-----	-----	----

(以下は記入しないでください。)

助成財団コード TA					研究課題番号 AA								
研究機関番号 AC					シート番号								

発表文献（この研究を発表した雑誌・図書について記入してください。）									
雑誌	論文標題 ^{GB}	One-dimensional sliding of p53 along DNA is accelerated in the presence of Ca ²⁺ or Mg ²⁺ at millimolar concentrations							
	著者名 ^{GA}	Murata A, Ito Y, Kashima K, Kanbayashi S, Nanatani K, Igarashi C, Okumura M, Iiaba K, Tokino T, Takahashi S and Kamagata K	雑誌名 ^{GC}	J. Mol. Biol.					
	ページ ^{GF}	2663~2678	発行年 ^{GE}	2	0	1	5	巻号 ^{GD}	427
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
雑誌	論文標題 ^{GB}								
	著者名 ^{GA}		雑誌名 ^{GC}						
	ページ ^{GF}	~	発行年 ^{GE}					巻号 ^{GD}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	
図書	著者名 ^{HA}								
	書名 ^{HC}								
	出版者 ^{HB}		発行年 ^{HD}					総ページ ^{HE}	

欧文概要 EZ

Transcription factors can search and bind specific target sites of DNA, which is the initial stage of transcriptional regulation of target genes. These proteins are considered to have an efficient mechanism that can search the target sites among a huge DNA with 10⁹ bps within a physiological time. However, the detailed mechanism based on the dynamics of these proteins on DNA remains unclear. To solve the target search problem of DNA binding proteins, we considered to apply our background in single-molecule measurements. In this study, we investigated the target search dynamics of tumor suppressor protein p53, which is a human transcription factor that controls cell cycle arrest, apoptosis and DNA repair, by using the single-molecule measurement.

To examine how complex dynamics p53 shows in moving along DNA and reading the sequence, we observed the diffusive movement of p53 labeled with a fluorescent dye along the extended DNA on coverslip by a home-build fluorescence microscopy. 1D sliding of p53 was strongly dependent on the concentration of Mg²⁺ and Ca²⁺, and the sliding distance of p53 was maintained in loss of homeostatic control. We found two sliding modes which correspond to two binding forms of p53. Thus, we succeeded to obtain a new insight on function of p53.