

生物物理学的アプローチによるがん抑制タンパク質 p53 の DNA 認識・結合機構の解明

鎌形 清人¹, 伊藤 優志^{1,2}

1. はじめに

DNA 結合タンパク質は DNA に結合し、転写の調節、DNA の高次構造の形成、DNA の複製・修復・切断・組換えなどの機能を持つ。DNA 結合タンパク質には、標的 DNA 配列に強く結合する配列特異的なタンパク質と、どんな DNA 配列にもまんべんなく結合できる配列非特異的なタンパク質がある。たとえば、転写因子や制限酵素は配列特異的な DNA 結合タンパク質であり、ヒストンなどの DNA の高次構造形成に関わるタンパク質は配列非特異的なタンパク質である。アミノ酸変異などによる DNA 結合タンパク質の機能の損失はがんなどの疾患に関わるため、DNA 結合タンパク質の機能の解明は創薬の観点からも重要な課題の一つである。さらに、CRISPR/Cas9 などのゲノム編集に関わる DNA 結合タンパク質は研究ツールとして注目されている。

配列特異的な DNA 結合タンパク質に共通する機能は、膨大な長さの DNA から標的 DNA 配列を探し出し、結合することである。実際の細胞には $10^6 \sim 10^9$ 塩基の DNA があるが、DNA 結合タンパク質の標的 DNA はわずか 5~30 塩基にすぎない。DNA 結合タンパク質は数分程度の生理的な時間内に標的配列の探索を行う必要があるため、“すばやく”、しかも、“正確な”標的探索運動があると考えられる。これまでに四つの探索運動が提案されている。(1) DNA からいったん解離し 3 次元的に拡散運動し DNA の別の部位に結合する“3 次元拡散”、(2) DNA から離れることなく DNA 上を移動する“1 次元スライディング”、(3) DNA

上をぴょんぴょんと移動する“ホッピング・ジャンピング”、(4) DNA の二つの部位間で乗り移る“セグメント間移動”である。理論的には、以上の探索運動を組み合わせることで、効率的な探索が可能になると考えられる。

実験的に標的探索の仕組みを調べるためには、個々の DNA 結合タンパク質の動きを追跡する必要がある。1993 年に、嶋本らのグループはガラス基板上に DNA を固定し、蛍光顕微鏡を用いて DNA 上を動く RNA ポリメラーゼの動きを単分子レベルで観測することに成功した¹⁾。この実験を皮切りに、さまざまな単分子蛍光計測法や DNA の固定化技術が考案され、さまざまな DNA 結合タンパク質の単分子計測が行われるとともに、標的探索の理解が進んできた。

がん抑制タンパク質 p53 は、たとえば多量体化する、天然変性領域を有するなどの DNA 結合タンパク質によくみられる特徴を持ち、かつがんの抑制という重要な機能を有することから、我々は、DNA 標的配列探索問題を調べるためのモデルタンパク質として p53 の研究を行ってきた²⁾。p53 は、DNA の標的配列に結合し、細胞周期停止、DNA の修復、アポトーシスを誘導する転写因子である。多彩な機能を持つことから、ゲノムの守護神とも呼ばれる。また、さまざまなタンパク質が p53 に結合しその機能を調節するため、p53 はタンパク質相互作用ネットワークの“ハブタンパク質”として働く。ヒトのがんの約 50% で p53 遺伝子の変異が見つかっており、p53 が標的 DNA へ結合できなくなると細胞のがん化を防げないため、標的 DNA への p53 の結合は生理的に重要である。p53 は N 末端ドメイン、コアドメイン、リンカー、四量体形成ドメイン、C 末端ドメインから構成される。コアドメインと四量体形成ドメインは特定の構造をとるが、それ以外のドメインは特定の構造をとらない天然変性領域である³⁾。コアドメインと C 末端ドメインはそれぞれ DNA と特異的に、または、非特異的に結合する。p53 はこの二つの DNA 結合ドメインを利用し、効率的な標的配列の探索を行うと考えられる。本稿では、単分子蛍光観測によって最近明らかにされた p53 の DNA 標的探索の仕組みを紹介する。

2. p53 の単分子蛍光観測

まず、単分子蛍光計測の詳細を紹介する。全反射蛍光

¹ 東北大学多元物質科学研究所 (〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1)

² 東北大学大学院理学研究科化学専攻 (〒980-8577 宮城県仙台市青葉区片平 2-1-1)

DNA-binding regulation of tumor suppressor p53 revealed by biophysical approach

Kiyoto Kamagata¹ and Yuji Itoh^{1,2} (¹Institute for Multidisciplinary Research for Advanced Materials, Tohoku University, Katahira 2-1-1, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8577, Japan, ²Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tohoku University, Katahira 2-1-1, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 980-8577, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890533

© 2017 公益社団法人日本生化学会

顕微鏡を用いて、ガラス基板上に固定されたDNA上を動く、蛍光色素標識p53をイメージした(図1a)⁴⁾。基板付近のDNAに結合したp53だけを照明するため、光源としてレーザーを用いて対物レンズの端に集光することで全反射蛍光照明をした。また、p53単分子からの微弱の蛍光を検出するため、微弱の光を電子に変換し増幅できる検出器EM-CCDを用いた。DNAやタンパク質がガラス基板へ非特異的に吸着してしまうため、PEGなどのコーティング剤を用いた。ビオチンPEGでコーティングしたガラス基板にニュートラアビジンを介して、ビオチン化DNA(p53の標的配列のないDNA)を固定した。DNAの固定されたフローセルでは、フローの圧力によりDNAが引き伸ばされることで、その上を動くp53のイメージングが可能になる。

次に、実験に使用したp53サンプルについて説明する。野生型のp53は不安定で凝集しやすく、*in vitro*の実験に使用するには困難という問題があった。そこで、我々は先行研究⁵⁾に基づき、野生型p53に変異を導入することで疑似野生型p53を作製した。疑似野生型p53は野生型p53より高い安定性を持ち、かつがん抑制機能を維持している。以後、本稿では断りのない限り疑似野生型p53をp53と称する。

p53のコアドメイン(DNA結合に関わらない部位にK292C変異を導入)に蛍光色素Atto532を修飾し、蛍光修飾p53サンプルとした。DNA上にあるp53単分子に相当する蛍光スポットを選別し、そのスポットの中心を追跡することで、DNA上を動くp53の時系列データを得た(図1b)。時系列データから平均2乗変位(単位時間あたりの

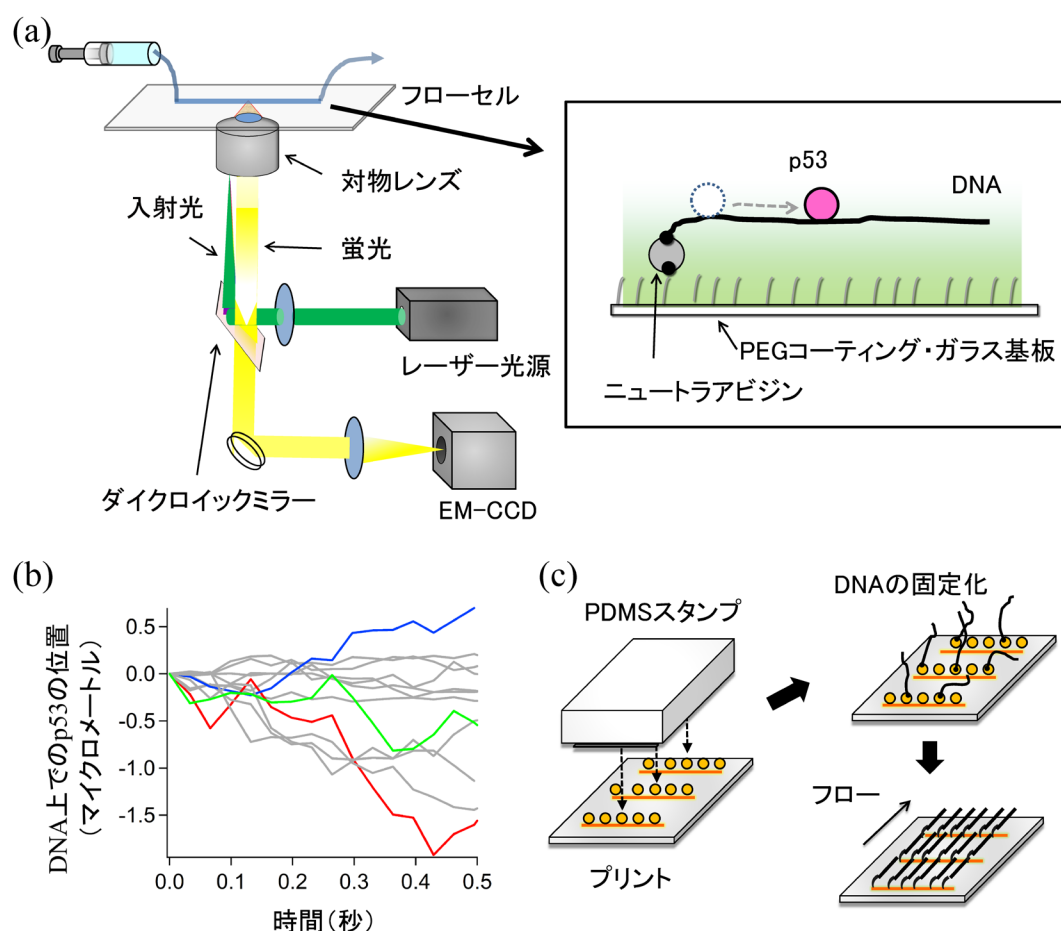


図1 単分子蛍光顕微鏡を用いたDNA上でのp53の動きの観測

(a)全反射蛍光顕微鏡を用いた単分子計測の模式図。対物レンズの端に入射光を導入し、フローセルのガラス基板表面付近を照明する。基板にはDNAの末端が固定され、フロー圧で引き伸ばされたDNA上を動く蛍光色素修飾p53をイメージングする。p53からの蛍光はダイクロイックミラーなどを経て、EM-CCDで検出される。(b) DNA上を動くp53の時系列データ。(c) DNA 整列固定技術“DNA garden”。PDMSスタンプによりビオチンつきBSAをガラス基板へ転写し、そこにニュートラアビジンとDNA(末端にビオチンのついた)を固定化する。フロー圧によりDNAを引き伸ばし、p53を含むDNA結合タンパク質の動きを解析する。ビオチンつきBSAが整列固定されるため、DNAの末端をそろえて固定できる。(b)の図は文献4を、(c)の図は文献7を改変し使用した。(c)の図は、日本化学会に使用許可を得て、転載した。

移動距離の2乗)を計算しプロットしたところ、時間に対して直線であったことから、p53のDNA上での動きは1次元拡散運動であることが明らかとなった。p53の拡散係数の平均値は $0.18 \mu\text{m}^2/\text{s}$ であり、DNA上を1次元的に移動すると仮定して得られる拡散係数よりも低い値だった。したがって、p53はDNA上を1次元的に移動するというよりは、DNAの溝に沿って回転しながら移動すると考えられる²⁾。この結果は、van Oijenのグループで行われた単分子計測の先行研究の結果とも一致する⁶⁾。このように、単分子計測はDNA結合タンパク質のDNA上での運動を明らかにできる。

上記の方法は現在でも複数の研究室で一般的に使用されている。この方法でもデータを取得できるが、ガラス基板へのDNAやDNA結合タンパク質の吸着(不完全なコーティング)やガラス基板へ固定されるDNAの“位置”や“数”の調整の困難さなどのため、得られる単分子データの数が少ないことが問題点となっていた。最近、我々は、DNAやDNA結合タンパク質の単分子計測において一度の計測で大量のデータを簡便に得る方法として、ガラス基板上にDNAを整列固定できる“DNA garden”を開発した⁷⁾。MPCポリマーでコーティングしたガラス基板に、ポリジメチルシロキサン(PDMS)スタンプを用いてビオチンつきウシ血清アルブミン(BSA)を固定し、そこにニュートラアビジンを介してDNAの末端を一行に固定した(図1c)。類似のDNA整列固定法^{8,9)}のように基板の微細加工の必要性がなく、簡便で再現性の高い方法である。また、DNA gardenにはフロー圧でDNAの伸び縮みを制御できるという利点もある。我々は、p53存在下でDNAの伸び縮みを繰り返す実験を行い、p53がDNAの複数の場所をつかみ、DNAのループ構造の形成によりDNAを収縮させることを見いだした。DNA gardenは、p53以外のタンパク質のDNA上のスライディング運動やDNA収縮の観察など、さまざまな実験に応用できる。

3. p53の二つのスライディング運動

p53のスライディング運動を注意深くながめると、p53がすばやくDNA上を移動するときとゆっくりと移動するときがあることがわかった。そこで、p53のスライディング運動を定量的に解析するため、p53の時系列データから単位時間あたりのp53の移動距離の分布を作成した(図2a)^{4,7)}。単一の拡散運動の場合、移動距離の分布は単一のガウス関数で表される。p53の移動距離分布は二つのガウス関数の和でよくフィッティングできたため、p53は速いスライディング運動と遅いスライディング運動の両方を持つことが明らかとなった。DNA結合ドメインのコアドメインを欠損させた変異体では遅いスライディング運動が観

測されなかったことから、遅いスライディング運動ではp53のコアドメインがDNAに強く結合した状態であると考えられる(図2b)。コアドメインがDNA配列を読むことができるため、遅いスライディング運動のときにp53は標的配列を認識できると考えられる。一方、速いスライディング運動では、p53のC末端ドメインがDNAに結合し、コアドメインが弱くDNAに結合した状態である(図2b)。そのため、速いスライディング運動では、p53がDNA上をすばやく移動し、より長いDNAの標的探索を可能にすると考えられる。複雑なスライディング運動はp53だけでなく他のDNA結合タンパク質[lacリプレッサー、レプリソーム、DNAグリコシラーゼ、UvrA/UvrB複合体、transcription activator-like effector (TALE)]でもみられることから、複数の役割を持つスライディング運動を組み合わせることで効率的な標的探索が達成されるのかもしれない。今後、DNA結合タンパク質の標的探索における複雑なスライディング運動の役割を調べるのが重要であろう。

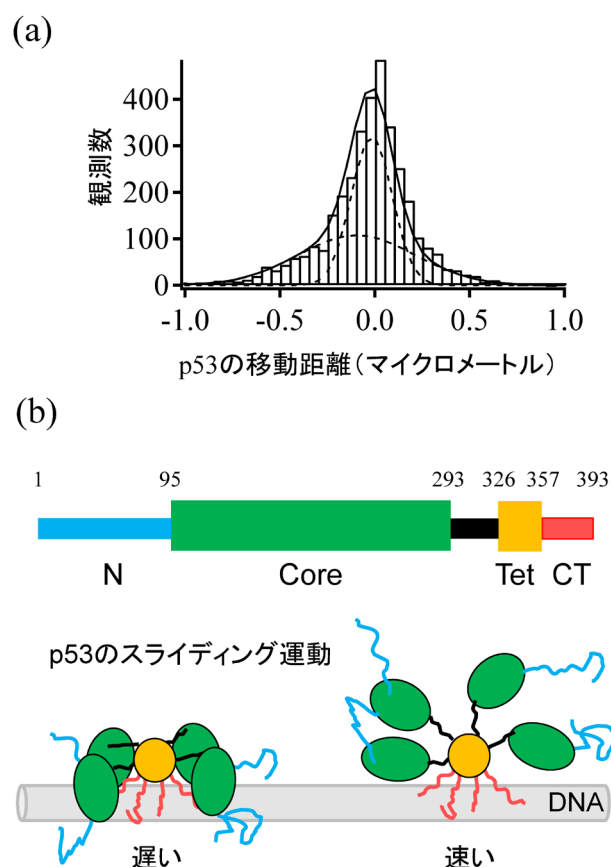


図2 p53の二つのスライディング運動

(a) 165 ミリ秒の時間間隔におけるp53の移動距離の分布。実線は二つのガウス関数の和でベストフィッティングした曲線を表し、破線は各ガウス関数の曲線を表す。(b) p53の二つのスライディング運動時の模式構造。N、Core、Tet、CTはそれぞれ、N末端ドメイン、コアドメイン、四量体形成ドメイン、C末端ドメインを表す。(a)の図は文献4を改変し使用した。

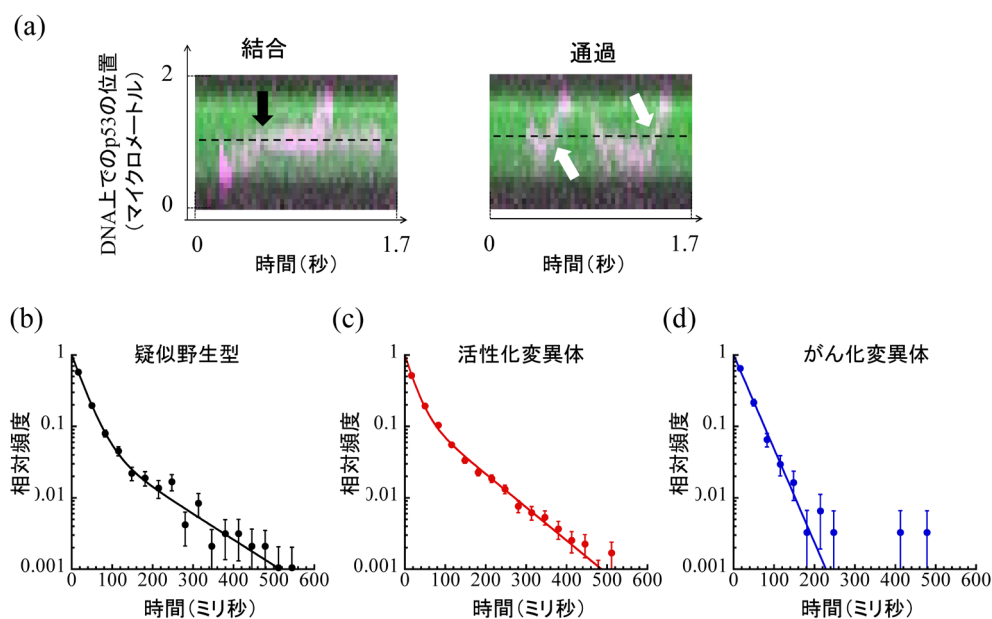


図3 p53の標的認識・結合に関わる単分子蛍光測定

(a) 疑似野生型p53の典型的な時系列データ。点線はp53の標的DNAの位置を表す。ピンク色または白色はp53のDNA上での軌跡を表す。緑色はDNAを表す。(b) 疑似野生型p53の標的上の滞在時間分布。(c) p53の活性化変異体の標的上の滞在時間分布。(d) p53のがん化変異体の標的上の滞在時間分布。(b～d)において、実線は一つまたは二つの指数関数でベストフィットした曲線を表す。(a～d)の図は文献10を改変し使用した。

4. p53の低い標的配列の認識率

DNA結合タンパク質は一般に、スライディング運動で標的配列にたどり着くと、標的配列を通り過ぎることなく結合できると考えられてきたが、実験による直接的な証拠は得られていない。この仮説を実験的に確かめるために、p53の標的配列を含んだDNAをガラス基板に固定し、単分子蛍光顕微鏡を用いてそのDNA上で動くp53を観測した¹⁰⁾。p53はDNAに非特異的に結合し、スライディング運動し、標的配列にたどり着く。もし、p53が正確に標的を認識できれば、p53の動きは標的配列上で止まり、長い時間結合すると予測される。実際に、p53の標的結合過程を観測したところ、驚くべきことに、大部分のp53は標的配列を認識できずに通り過ぎることが明らかとなった(図3a)。一方、残りのp53は結合に成功し、標的配列上により長くとどまった(図3a)。p53の標的配列との結合を定量的に解析するため、p53が標的配列上に滞在した時間を計測し、その滞在時間の分布を作成した(図3b)。この分布は二つの指数関数の和で表され、早い減衰が標的配列を認識できずに通り過ぎることを表し、遅い減衰が標的配列への結合を表す。p53が標的配列を認識し、結合に成功した割合(標的認識率)はわずか7%であった。低い標的認識率は、スライディング時の構造から標的認識の構造へ変化する前に標的を通り過ぎてしまうためであると考えられる。

次に、標的認識と転写活性の関係性を調べるため、翻訳

後修飾を模倣した活性化変異体(S392E)とがん化変異体(R248Q)を作製し、同様の単分子実験を行った(図3c, d)。活性化変異体では標的認識率が18%へ上昇したのに対し、がん化変異体では標的認識率は0%へ減少した。一方で、活性化変異体において標的配列への結合時間は疑似野生型と同じであった。以上より、p53の標的認識率と転写活性に相関があったことから、標的認識率がp53の機能に重要であることが明らかとなった。

DNA結合タンパク質の標的探索は効率的であると推測されたため、標的認識率は100%と考えられていた¹¹⁾。しかし、標的認識率を定量的に計測した研究は、p53と*lac*リプレッサーの2例しかない。興味深いことに、*lac*リプレッサーでも標的認識率が50%と報告されている¹²⁾。また、アミノ酸変異による標的認識率の変化と機能の関連性は今のところp53だけで見つかった。他のDNA結合タンパク質でもDNA標的認識率がその生物活性を決めている可能性があり、今後の検証が期待される。

5. まとめと今後の展開

単分子蛍光計測法を用いて、p53の標的DNAへの結合過程を調べたところ、二つのスライディング運動、低い標的認識率、標的認識率の制御などが明らかとなった。疾患に関わるp53のアミノ酸変異は多く見つかったが、原因を特定できていないものもある。p53変異体の単分子蛍光

計測により、それらのp53変異による疾患の原因を特定できると考えられる。また、p53で発見された“標的DNAの認識の制御”は他のDNA結合タンパク質でも使われている可能性があるため、さまざまなDNA結合タンパク質においてその可能性を検証する必要がある。最近、DNA結合タンパク質はタンパク質固有の標的探索運動を持つことが明らかになってきた。たとえば、スライディング運動はp53だけでなく他のDNA結合タンパク質でも観測されるが、Cas9はスライディング運動せず、3次元探索のみをする¹³⁾。さらに、TALEはp53とは異なり、DNAの溝に沿わず1次元的にDNA上を動く¹⁴⁾。タンパク質の種類によって探索の特徴がなぜ異なるのかは明らかになっていない。今後、DNA garden法を用いたさまざまなDNA結合タンパク質の計測を通して、DNA結合タンパク質の機能の理解が進むことを期待している。

近年、James G. McNallyらのグループが、p53の細胞内での運動と標的配列との結合を単分子蛍光分光法により観察した¹⁵⁾。彼らの*in vivo*での実験から得られたp53の標的配列に対する結合時間は、我々が*in vitro*の実験で求めた結合時間より10倍ほど長かった。この違いの原因として、細胞内の混雑環境、p53と他の生体分子との相互作用などのさまざまな要因が考えられる。*in vitro*での生物物理学の実験を行うことで、混雑環境や他の生体分子がp53の標的探索に与える影響を一つずつ解明できると期待される。

謝辞

p53研究における共同研究者〔鹿島理沙、時野隆至（札幌医科大学）、七谷圭、奥村正樹、稲葉謙次、坂本清志、和田健彦（東北大学）、高橋聡研究室（東北大学）の方々〕

に感謝します。

文 献

- 1) Kabata, H., Kurosawa, O., Arai, I., Washizu, M., Margaron, S.A., Glass, R.E., & Shimamoto, N. (1993) *Science*, **262**, 1561–1563.
- 2) Kamagata, K., Murata, A., Itoh, Y., & Takahashi, S. (2017) *J. Photochem. Photobiol. Photochem. Rev.*, **30**, 36–50.
- 3) Kamada, R., Toguchi, Y., Nomura, T., Imagawa, T., & Sakaguchi, K. (2016) *Biopolymers*, **106**, 598–612.
- 4) Murata, A., Ito, Y., Kashima, R., Kanbayashi, S., Nanatani, K., Igarashi, C., Okumura, M., Inaba, K., Tokino, T., Takahashi, S., & Kamagata, K. (2015) *J. Mol. Biol.*, **427**, 2663–2678.
- 5) Petty, T.J., Emamzadeh, S., Costantino, L., Petkova, I., Stavridi, E.S., Saven, J.G., Vauthey, E., & Halazonetis, T.D. (2011) *EMBO J.*, **30**, 2167–2176.
- 6) Tafvizi, A., Huang, F., Fersht, A.R., Mirny, L.A., & van Oijen, A.M. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 563–568.
- 7) Igarashi, C., Murata, A., Itoh, Y., Subekti, D.R.G., Takahashi, S., & Kamagata, K. (2017) *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **90**, 34–43.
- 8) Yamamoto, T., Kurosawa, O., Kabata, H., Shimamoto, N., & Washizu, M. (2000) *IEEE Trans. Ind. Appl.*, **36**, 1010–1017.
- 9) Fazio, T., Visnapuu, M.L., Wind, S., & Greene, E.C. (2008) *Langmuir*, **24**, 10524–10531.
- 10) Itoh, Y., Murata, A., Sakamoto, S., Nanatani, K., Wada, T., Takahashi, S., & Kamagata, K. (2016) *J. Mol. Biol.*, **428**, 2916–2930.
- 11) Benichou, O., Loverdo, C., Moreau, M., & Voituriez, R. (2011) *Rev. Mod. Phys.*, **83**, 81–129.
- 12) Hammar, P., Leroy, P., Mahmutovic, A., Marklund, E.G., Berg, O.G., & Elf, J. (2012) *Science*, **336**, 1595–1598.
- 13) Sternberg, S.H., Redding, S., Jinek, M., Greene, E.C., & Doudna, J.A. (2014) *Nature*, **507**, 62–67.
- 14) Cuculis, L., Abil, Z., Zhao, H., & Schroeder, C.M. (2016) *Nat. Chem. Biol.*, **7**, 12248.
- 15) Morisaki, T., Muller, W.G., Golob, N., Mazza, D., & McNally, J.G. (2014) *Nat. Commun.*, **5**, 4456.

著者寸照

●鎌形 清人（かまがた きよと）



東北大学多元物質科学研究所助教。理学（博士）。

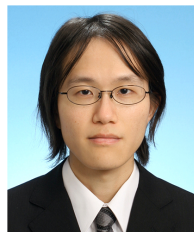
■略歴 1978年千葉県に生る。2000年上智大学理工学部卒業。05年東京大学大学院理学研究科物理学専攻修了。学術振興会特別研究員（東京大学）や特任研究員（大阪大学）を経て、09年より現職。

■研究テーマと抱負 DNA結合蛋白質の機能解析のための単分子蛍光計測法の開発。生物物理学的手法によるがん抑制蛋白質p53の機能解析。DNA結合蛋白質が持つ様々な性質を明らかにし、物理化学的な性質と機能を結びつける研究を展開する。

■ウェブサイト <http://www.tagen.tohoku.ac.jp/modules/laboratory/index.php?laboid=34>

■趣味 サッカーとNBAの観戦。

●伊藤 優志（いとう ゆうじ）



東北大学大学院理学研究科博士課程後期三年。理学（修士）。

■略歴 1990年山形県に生る。2013年3月東北大学理学部卒業。2013年4月より大学院生として現在の研究室に配属（生命分子ダイナミクス研究分野）。2017年4月より日本学術振興会特別研究員DC2（東北大学大学院理学研究科）。

■研究テーマと抱負 私は現在、がん抑制タンパク質p53の標的配列探索ダイナミクスを研究しています。当研究室で開発した一分子蛍光装置を用いることで、p53が効率的に標的配列を探し出すメカニズムを解明したいです。

■ウェブサイト <http://www2.tagen.tohoku.ac.jp/lab/takahashi-s/>

■趣味 p53や一分子実験の最新の論文を読むこと。