

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07280

研究課題名(和文) 1分子レベルのDNA超らせん構造制御技術を用いたDNA複製開始反応の解析

研究課題名(英文) Analysis of DNA replication initiation based on controlling technique of single DNA molecules

研究代表者

桂 進司 (KATSURA, Shinji)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：10260598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：各種DNAポリメラーゼを対象として、DNA合成速度の1分子解析を行った結果、processiveなT7 DNAポリメラーゼでは、平均値144base/s、標準偏差16base/sの計測結果が得られた。また、パルスチェイス実験により、そのprocessivityは11.1kbaseであると推定することができた。一方、連続合成成長が短いため、distributiveなDNAポリメラーゼでは、DNA合成の停止を観測することはできなかった。また、DNAへ超らせん構造を導入しながら蛍光解析を行うシステムを開発し、超らせんによりDNAにトロイダル状の構造が導入される様子をリアルタイムに観察可能になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAポリメラーゼの挙動を1分子レベルで解析する方法を確立した。この方法は他のポリメラーゼのキャラクターゼーションにも適用できると考えられ、DNAポリメラーゼの分類・機能分担の解析に応用できると考えている。また、併せてDNAへ超らせん構造を導入しながら蛍光解析を行うシステムを開発したので、超らせん構造がDNA代謝酵素に与えている影響を解析できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Single molecule analysis of DNA elongation rates of several DNA polymerases have been carried out. This study demonstrated that processive polymerase, T7 DNA polymerase synthesized with 144 bases/s in elongation rate, and the processivity was also determined as 11.1kbases. On the other hand, any pauses in polymerase reactions have not been observed in the case of a distributive polymerase DNA polymerase I, probably due to too short processivity less than a resolution limit of an optical microscope.

We also succeeded in development of fluorescent observation system with supercoil induction, which permitted real time observation of DNA behavior during supercoil induction.

研究分野：生物化学工学

キーワード：DNAポリメラーゼ DNA複製 DNA超らせん構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1)現在の分子生物学研究は、「より詳細へ」と向かう分子レベル研究と「細胞から個体へ」と向かう細胞レベルの研究が主流となっている。しかし、この両方の研究を橋渡す研究も重要と考え、本研究計画はSV40 (Simian virus 40) DNA複製系を基としたDNA複製反応の1分子解析を行う。DNA複製反応の1分子解析は、原核生物ではO'Donnellやvan Oijen等の研究グループが精力的に行っている。しかし、真核生物のDNA複製反応の1分子解析はほとんど進展していない。

(2)試験管内の反応溶液内に含む数百万以上の鋳型DNA分子には、熱散乱によって局所的に超らせんが導入されていることから、様々な超らせん状態のDNAを鋳型としてDNA複製反応に与える影響を評価していると考えられる。そのため、「超らせん構造とは無関係にDNA複製反応が開始している」のか、「熱散乱によりある超らせん密度の閾値を越えたDNA分子のみ鋳型としてDNA複製反応が開始している」のか、両者の判別は極めて困難である。

2. 研究の目的

本研究計画はDNA複製反応過程を解き明かすために、SV40 (Simian virus 40) DNA複製系をモデルとして適用し、DNA複製反応過程を1分子レベルで直接観察し、解析するために、以下の要素技術の確立を目的とした。

- (1) 1分子の観察システムでは、多数の試料DNA分子を観察する必要があるため、そのための多くのDNA分子を識別可能な形で固定化する技術
- (2) 各種DNAポリメラーゼの合成素反応を解析する技術
- (3) 超らせんが導入されたDNA分子をリアルタイムで観察する技術の開発
- (4) これらを組み合わせてSV40の複製の様子を観察する技術

3. 研究の方法

(1) DNA合成反応をリアルタイムで観測をする場合、溶液中でDNAを形態制御する必要性が生じる。そこで、片末端を修飾したDNA分子を固定化できるように表面修飾を行った微細流路をスライドガラス及びPDMSで作成し、様々な固定化条件でDNA分子の末端固定化を試み、その固定化効率を評価した。

(2)上で開発した方法を用いて、末端標識したDNA分子を固定化し、様々なDNAポリメラーゼを対象として、DNA合成の伴う蛍光標識一本鎖結合タンパク質(RPA-YFP)の解離反応を観察することによって、DNA合成の伸長反応を解析した。また、この際、反応開始直後のみ、DNAポリメラーゼを供給し、その後はDNAポリメラーゼを供給しない方法(パルスチェイス法)によって、DNAポリメラーゼによる合成反応の詳細解析を行った。

(3)微細流路の延長線上にネオジウム磁石を取り付けた回転盤を設置し、この回転盤をマイクロコンピュータ Arduino Unoにより制御されたモーターを回転させることにより、回転速度、回転数を制御・記録可能なシステムを作成した。このシステムは蛍光顕微鏡の対物レンズと干渉しないため、蛍光観測を行いながら、リアルタイムにDNA超らせん構造を導入することが可能になった。

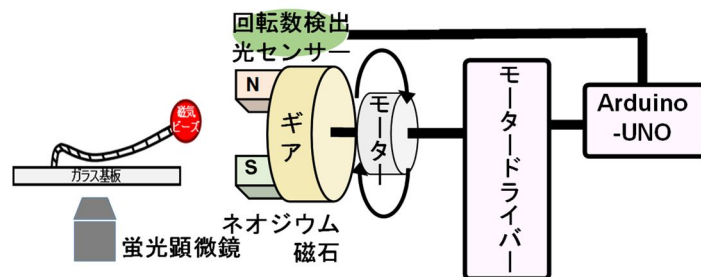


Fig.1 超らせん導入システムの概念図

4. 研究成果

(1) DNA試料溶液を流して基板に固定化する際に、DNA試料溶液を流した後に流れを停止させる工程を挟むことで、固定化DNA分子数を増やすことを試みた。流動時間と停止時間の合計を90分とし、停止時間を変化させることにより、様々な固定化条件を設定し、顕微鏡視野での1フレームで観察を行い、観察された分子数を整理した結果をTable 1に示す。

	停止時間 0分 流動時間 90分		停止時間 15分 流動時間 75分		停止時間 30分 流動時間 60分		停止時間 60分 流動時間 30分	
観察DNA長	10μm<	10μm>	10μm<	10μm>	10μm<	10μm>	10μm<	10μm>
入口 1cm	9	0	155	1	608	6	150	5
入口 2.5cm	30	1	256	5	568	11	137	6
入口 4cm	27	0	241	8	691	15	191	2
合計	76	1	652	14	1867	32	478	13

Table.1 DNA試料の流れを停止させた時間と、その時観察できた分子数の関係

以上の結果から、流れを停止させることで、基板に固定化された DNA 分子数が増えることが分かった。また、停止時間 30 分が最適条件であることが明らかになった。

(2) 各種 DNA ポリメラーゼの合成素反応を解析

・ T7 DNA ポリメラーゼの合成反応

リアルタイム観察により得られたデータから、時間当たりの一本鎖 DNA 領域の長さをプロットし、T7 DNA ポリメラーゼによる DNA 合成速度を算出した(Fig.2)。算出した DNA 合成速度はそれぞれ、青丸：159bases/s、橙丸：148bases/s であった。

・ T7DNA ポリメラーゼのパルスチェイス実験

T7 DNA ポリメラーゼを 180s 供給した後、供給を停止させ、Buffer を注入した。268s 後、ssDNA の長さが変化しなくなった。これは合成反応が停止したことを意味する。算出した合成速度は 127bases/s, processivity は 11.1kbase であった(Fig.3)。

・ DNA ポリメラーゼ の合成反応

T7 DNA ポリメラーゼと同様に DNA ポリメラーゼによる DNA 合成速度を算出した。算出した合成速度はそれぞれ、青丸：64bases/s、橙丸：86bases/s であった(Fig.4)。

・ DNA ポリメラーゼ のパルスチェイス実験

T7 DNA ポリメラーゼと同様に DNA ポリメラーゼによるパルスチェイス実験を行った。パルスチェイス実験の結果、DNA ポリメラーゼ の合成反応はほとんど得られなかった(Fig.5)。これは、DNA ポリメラーゼ の processivity が低い性質を持つからだと考えられる。

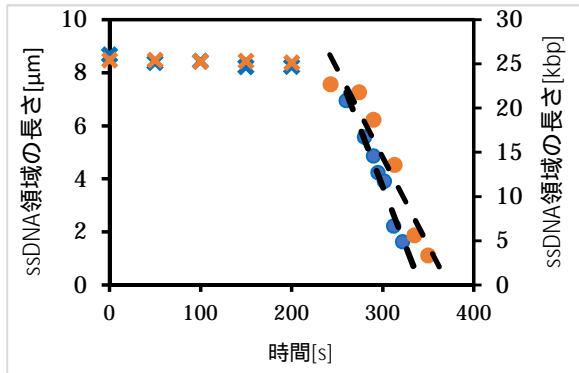


Fig.2 T7 DNA ポリメラーゼの合成反応時間あたりの ssDNA 領域の長さ及び塩基数の変化

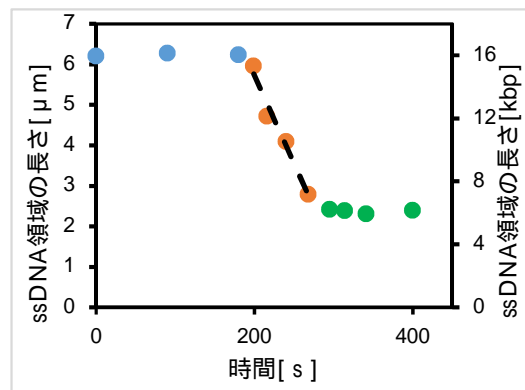


Fig.3 パルスチェイス実験を行った時の T7 DNA ポリメラーゼの合成反応時間あたりの ssDNA 領域の長さ及び塩基数の変化

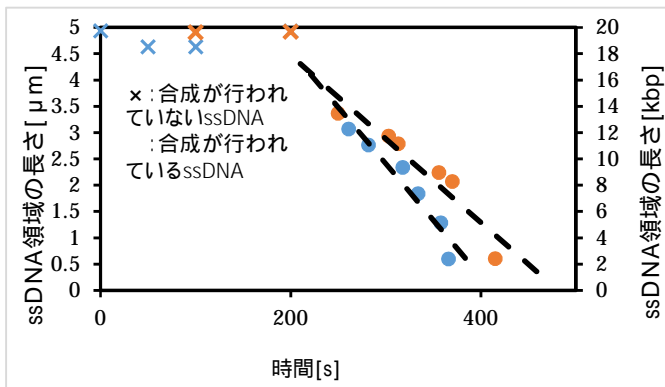


Fig.4 DNA ポリメラーゼ の DNA 合成反応時間あたりの ssDNA 領域の長さ及び塩基数の変化

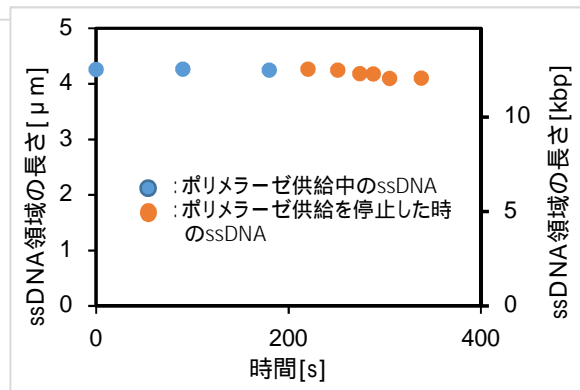


Fig.5 パルスチェイス実験を行った時の DNA ポリメラーゼ の合成反応時間あたりの ssDNA 領域の長さ及び塩基数の変化

(3) DNA へ超らせん構造を導入しながら蛍光解析を行うシステムを用いて、ファージ DNA にリアルタイムに超らせんを導入しながら蛍光観察を行った(Fig.6)。その結果、超らせんの導入量に応じて伸張した DNA の長さが減少することが示された。これは超らせんにより DNA にトロイダル状の構造が導入されたことを示している。

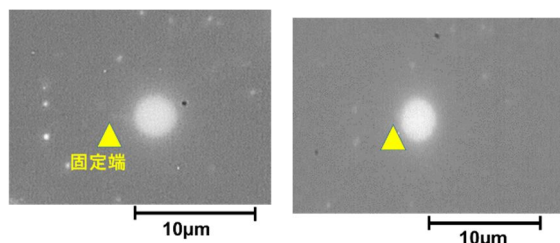


Fig.6 超らせん導入前 超らせん導入後

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 栗本雅之、小野稜平、手塚大輔、樋山みやび、板橋英之、大重真彦、桂進司
2. 発表標題 発光酵素ルシフェラーゼによるDNA合成反応の検出
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 勝見 匡、栗本雅之、高橋俊介、川崎祥平、栗田弘史、松浦俊一、水野 彰、大重真彦、桂 進司
2. 発表標題 SSB-YFPを用いたDNAポリメラーゼの1分子解析
3. 学会等名 生物科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 青木凌太、勝見匡、高橋俊介、川崎祥平、栗田弘史、水野武、水野彰、大重真彦、桂進司
2. 発表標題 1分子解析のためのマイクロ流路内におけるDNA分子の片端固定化法
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大重 真彦 (OSHIGE Masahiko) (00451716)	群馬大学・大学院理工学府・准教授 (12301)	