

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770164

研究課題名(和文) DNA合成反応の可視化技術を基としたタンパク質複合体の精密挙動解析

研究課題名(英文) Analysis of DNA metabolic reactions based on single molecule visualization method.

研究代表者

大重 真彦(Oshige, Masahiko)

群馬大学・大学院理工学府・准教授

研究者番号：00451716

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：1分子解析技術は、DNAやタンパク質の1分子を対象とした分子挙動やその分布に基づきDNA代謝反応の素過程等を解析することが可能である。この技術を用いて、DNA代謝反応であるDNA合成反応とDNA分解反応の1分子観察技術を開発した。クレノウフラグメントによるDNA合成の1分子観察により、鑄型DNAの形態変化はDNA合成速度へ影響を与え、伸長させた鑄型DNAの方が縮んだランダムコイル形態の時よりも75%速くなることを見出した。一方、T7エキソヌクレアーゼによるDNA分解反応の解析では、酵素の供給を制御する事により分解反応の一時停止がおきることを見出し、その挙動を明らかにすることに成功した。

研究成果の概要(英文)：DNA synthesis and DNA digestion reactions were studied using direct single-molecule observations in microflow channels. In the channels, ss DNA shape was controlled as relaxed and stretched form by adjusting buffer flow rate, and DNA synthesis reactions by Klenow Fragment (3'-5' exo-) were observed. Analysis of the synthetic reaction rates demonstrated that the DNA synthesis reaction rate of stretched ss DNA was approximately 75% higher than that of random coiled ss DNA. Also, DNA digestion reactions by T7 Exonuclease (T7 Exo) were directly observed both under pulse-chase conditions and under continuous buffer flow conditions with T7 Exo. Under pulse-chase conditions, the double-stranded regions of DNA monotonously shortened by a DNA digestion reaction with a single T7 Exo molecule. Under continuous buffer flow conditions with T7 Exo, some pauses were observed during a DNA digestion reaction and double-stranded regions shortened linearly except during these pauses.

研究分野：分子生物学

キーワード：1分子観察 計測技術 可視化技術 DNA代謝反応 DNA複製 DNAポリメラーゼ ヌクレアーゼ DNA結合タンパク質

1. 研究開始当初の背景

DNA 塩基配列情報の解読から DNA-タンパク質やタンパク質間相互作用の解析を中心にタンパク質の機能解析が盛んに行われている。これらの成果の多くは電気泳動を主とする多分子解析の結果によるものである。しかし、この多分子解析法では、対象とする反応の前後でしか測定できないため反応過程の酵素の挙動等が覆い隠されてしまう。また、1 反応中に数百万分子以上の集合分子の挙動を解析することになるため、得られた結果は数百万以上の分子の平均値となる。そのため、個々の分子挙動やその分布の詳細について明らかにすることは困難である。一方、1 分子解析技術は、DNA やタンパク質の 1 分子を対象とした解析を行うため、多分子解析法では覆い隠されてしまう分子挙動や分子個々の分布の解析が可能であり、反応の素過程等を明らかにすることが可能である。

DNA 代謝反応の 1 分子解析を行うためには、蛍光顕微鏡視野内において個々の DNA 分子を可視化し、観察する必要がある。そのためには、DNA 分子を染色するための蛍光色素が必要となる。DNA を蛍光色素で染色する試薬として YOYO-1 等の DNA の塩基対間に挿入されるインターカレーター型蛍光色素と DAPI (4'-6-Diamidino-2-Phenylindole) 等のマイナーグループに特異的に結合するグループバインダー型蛍光色素がある。しかし、これらの蛍光色素は 2 本鎖 DNA (dsDNA) 領域の可視化は可能であるが、1 本鎖 DNA (ssDNA) 領域に対しては有効ではない。本研究代表者は、1 本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA (Replication Protein A) の 70 kDa サブユニットの 1 本鎖 DNA 結合ドメインと黄色蛍光タンパク質 (YFP) の融合タンパク質 (RPA-YFP) および、Rec A の ssDNA 結合部位配列である 24 アミノ酸残基のペプチドを蛍光化合物 (Atto488) で化学修飾した蛍光ペプチド (ssDNA Binding Peptide-Atto488:ssBP-488) を調製し、安定的な ssDNA の可視化技術を開発した。この ssDNA の可視化技術を基に本研究計画を実施した。

2. 研究の目的

本研究は、開発した ssDNA の可視化技術を基に、DNA 代謝反応である DNA 合成反応および DNA 分解反応の 1 分子レベルでの可視化・解析を可能とする技術の開発をおこない、DNA 代謝反応の素過程や DNA 代謝反応のメカニズムの解析を行うことを目的とした。DNA 合成反応では RPA-YFP で蛍光標識した ssDNA を鋳型とし、DNA 合成酵素である Klenow Fragment (3'-5' exo-) の DNA 合成反応の進行による RPA-YFP の解離を観察することにより反応の可視化・解析をおこなった。また、DNA 分解反応では DNA 分解酵素の T7 Exonuclease (T7 Exo) を用いた DNA 分解により dsDNA から ssDNA になった領域を ssBP-488 で可視化することにより反応の可視

化・解析をおこなった。

3. 研究の方法

3.1 微細流路装置

溶液中の固定化されていない DNA 分子はブラウン運動によるランダムな形態変化をとるため明確な挙動を捉えることが困難である。そこで DNA の形態制御法として、熱硬化性高分子である Polydimethylsiloxane (PDMS) で作製した微細流路を用いた (Fig.1)。流路中ではシリンジポンプ (KD scientific, Holliston, MA, USA) による流れにより、片端固定した DNA 分子の形態を制御した。

3.2 DNA 合成反応の直接観察

DNA 合成反応の 1 分子解析では、Figure 1 に示した微細流路装置を用い実験を行った。実験手順は、ガラス基板に ssDNA を片端固定後、非特異的吸着を防ぐために基板を牛血清アルブミン (BSA) でブロッキング、そして RPA-YFP 分子を注入し ssDNA を標識した。流路内の過剰な RPA-YFP 分子を取り除いた後、DNA 合成酵素である Klenow Fragment (3'-5' exo-) を 7.5 units 注入した。この時、流れの ON/OFF 制御により、RPA-YFP 標識 ssDNA の形態を伸張形態もしくはランダムコイル形態に制御し、DNA 合成反応の進行に伴う RPA-YFP の解離による DNA 合成反応の観測を行った。DNA 合成反応の終了後、インターカレーター型蛍光色素である SYTOX Orange を注入することで DNA 合成反応後の dsDNA を観察した (Fig.2)。

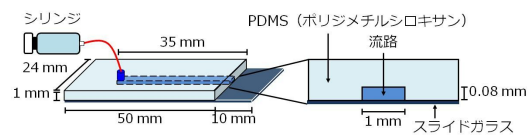


Figure 1 DNA 合成反応の 1 分子観察解析に使用した微細流路の模式図

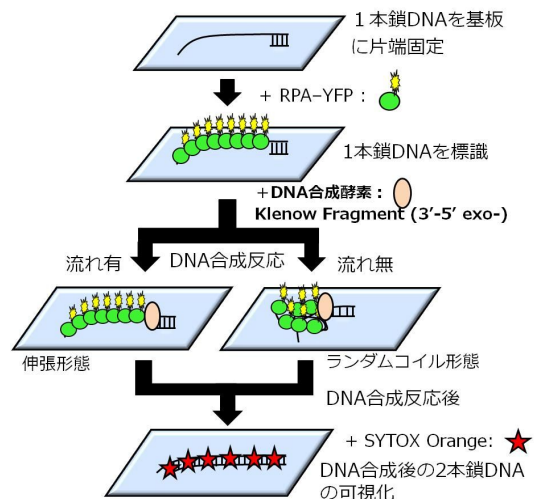


Figure 2 DNA 合成反応の 1 分子観察の概要

3.3 T7 Exo を反応開始前のみ供給した条件および連続的に供給した条件における DNA 分解反応の 1 分子観察解析

T7 Exo を反応開始前のみ供給した条件および連続的に供給した条件における DNA 分解反応の 1 分子観察では、微細流路装置 Fig. 3(A)および Fig. 3(B)を用いた。流路内のガラス基板の上に dsDNA を片端固定後、ガラス基板を BSA でブロッキングし、SYTOX Orange を注入することにより dsDNA を可視化した。その後、各々の条件で T7 Exo を 20 units 注入し、T7 Exo を反応開始前のみ供給した条件 (T7 Exo を注入後、即座に T7 Exo を含まない緩衝液を供給した条件)および T7 Exo を含む緩衝液を連続的に供給したときの条件下で DNA 分解反応を観察した (Fig. 4)。毎 5 分ごとに 40 分間観察し、流速は 50 $\mu\text{l/h}$ とした。

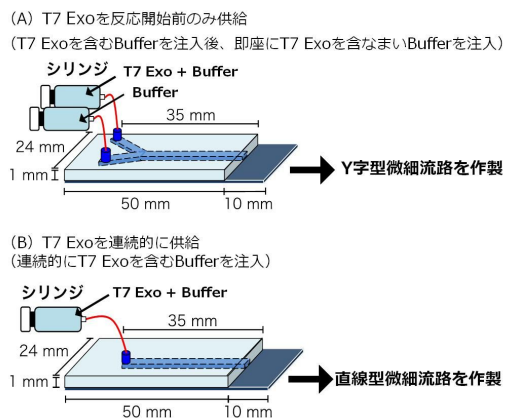


Figure 3 DNA 分解反応の 1 分子観察に使用した微細流路の模式図

- (A) T7 Exo を反応開始前のみ供給した条件で使用した微細流路の模式図
(B) T7 Exo を連続的に供給した条件で使用した微細流路の模式図

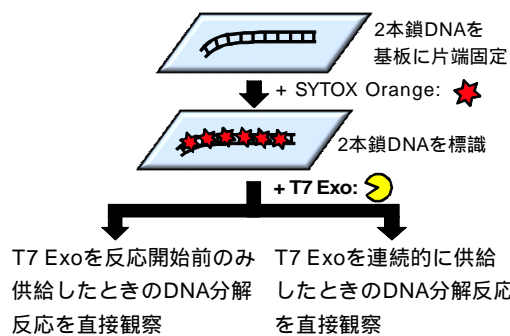


Figure 4 T7 Exo による DNA 分解反応の 1 分子観察の概要

4. 研究成果

4.1 DNA 合成反応の 1 分子観察解析

流れの ON/OFF 制御により、RPA-YFP 標識 ssDNA 形態を伸張形態 (流れ有) (Fig.5A) 及びランダムコイル形態 (Fig.5B) に制御し、

DNA 合成反応を直接観察した。ランダムコイル形態 (流れ無) の DNA 合成反応観察では、撮影時に一時的に緩衝液を流し DNA の伸張させることで観察した。その結果、DNA 合成反応が進むにつれて ssDNA に結合していた RPA-YFP が解離し、自由端から単調に短くなることを観察した。DNA 合成反応は伸長形態では 535 sec、ランダムコイル形態では 996 sec で完了した。Figure 6 は Fig. 5 の観察結果をグラフ化したものである。伸長形態での観察では 20 nm/sec で RPA-YFP で可視化された領域が短くなった。これは、DNA の塩基対間距離から算出すると 91 bases/sec となった。また、ランダムコイル形態では 11 nm/sec となり、同様に算出すると 52 bases/sec となった。この結果、DNA 合成速度の伸長形態はランダムコイル形態に比較し 75%速くなることを確認した。この結果より DNA の形態が DNA 合成酵素の反応の素過程に影響を与えることを示すことに成功した。

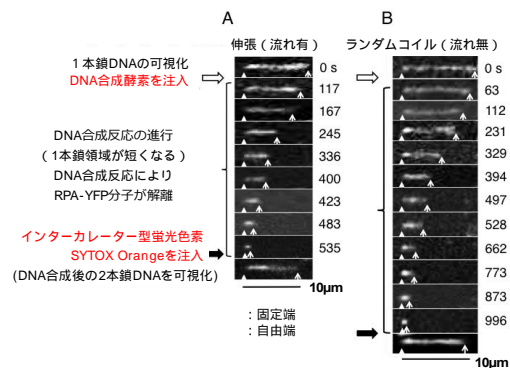


Figure 5 DNA 合成反応の 1 分子観察結果
A: RPA-YFP 標識 ssDNA を伸張形態 (流れ有) に制御した時の DNA 合成反応の 1 分子観察結果
B: RPA-YFP 標識 ssDNA をランダムコイル形態 (流れ無) に制御した時の DNA 合成反応の 1 分子観察結果

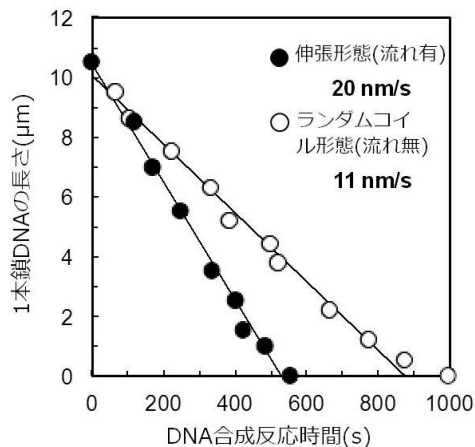


Figure 6 DNA 合成反応の 1 分子解析結果

4.2 T7 Exo を一時的に供給したときと連続的に供給したときの DNA 分解反応の 1 分子観察解析

T7 Exo は 5'→3' の方向へ dsDNA の片方の DNA 鎖を分解する酵素である。反応前は 2 本鎖であった DNA は、T7 Exo が作用することにより 1 本鎖 DNA 領域が出現する。2 本鎖 DNA を SYTOX Orange で可視化した DNA 分子に T7 Exo を作用させることにより、SYTOX Orange で可視化した 2 本鎖 DNA 領域が短くなる様子を観察した。T7 Exo を含む緩衝液を一時的に供給したときには、dsDNA の自由端から単調に短くなっていく様子が観察された (Fig. 7)。その後、T7 Exo を含まない緩衝液を供給すると、分解反応は数分後に停止し、停止後も観察を続けたが、dsDNA の長さは変化しなかった (Fig. 8)。T7 Exo は dsDNA に結合する事で dsDNA の自由端から分解し、その後、T7 Exo が解離する事で DNA 分解反応が停止したために、dsDNA の伸張の長さは変化しなかったと考えた。

一方、T7 Exo を連続的に供給する条件でも、DNA 分解反応の進行の間に複数の反応停止が起きる様子の観察に成功した (Fig. 9)。これらの停止期間を除いては自由端から可視化した dsDNA 領域は単調に短くなった (Fig. 10)。これらの結果より、T7 Exo は dsDNA に結合することで自由端から dsDNA を分解し、DNA 分解反応の間に起きた反応の停止は T7 Exo が dsDNA から解離したためであると推測される。現在、この推測を検証するために、蛍光標識した T7 Exo を調製し、観察を試みている。

以上の結果をまとめると、T7 Exo の DNA 分解速度および processivity において、T7 Exo を一時的に供給したときでは 5.7 bases/sec および 6692 bases となった。また、T7 Exo を連続的に供給したときにおいては、5.2 bases/sec および 5072 bases となった。DNA 分解反応の動態解析において、T7 Exo の供給方法を変化させることにより、反応の停止を検出することに成功し、T7 Exo の素過程を明らかにすることに成功した。

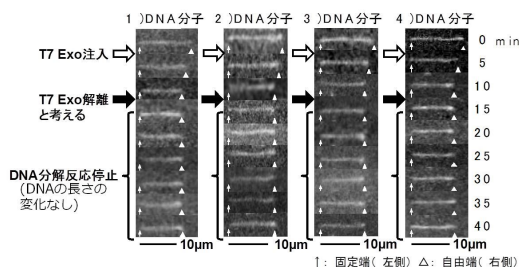


Figure 7 T7 Exo を一時的に供給したときの DNA 分解反応の 1 分子観察結果

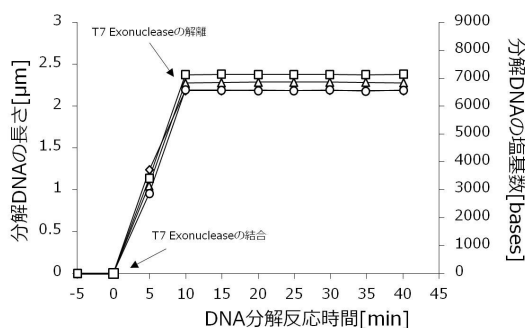


Figure 8 T7 Exo を一時的に供給したときの DNA 分解反応の経過時間における分解された DNA の長さと分解された DNA の塩基数の関係。□、○、△ は Fig. 7 の 1)-4) に対応する。

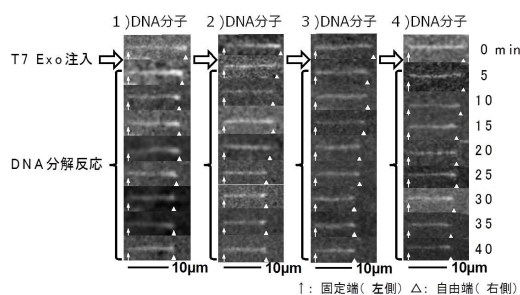


Figure 9 T7 Exo を連続的に供給したときの DNA 分解反応の 1 分子観察結果

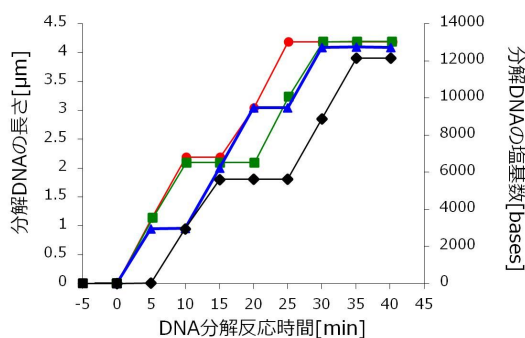


Figure 10 T7 Exo を連続的に供給したときの DNA 分解反応の経過時間における分解された DNA の長さと分解された DNA の塩基数の関係。■、●、▲ は Fig. 9 の 1)-4) に対応する。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Takahashi S., Motooka S., Usui T., Kawasaki S., Miyata H., Kurita H., Mizuno T., Matsuura S., Mizuno A., Oshige M., Katsura S., Direct Single-Molecule Observations of Local Denaturation of a DNA Double Helix under a Negative Supercoil State, Analytical Chemistry,

査読有, 87(6), 2015, 3490-3497, DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00044.

Takahashi S., Usui T., Kawasaki S., Miyata H., Kurita H., Matsuura S., Mizuno A., Oshige M., Katsura S., Real-time single-molecule observations of T7 Exonuclease activity in a microflow channel, Analytical Biochemistry, 査読有, 457, 2014, 24-30, DOI: 10.1016/j.ab.2014.04.012.

Takahashi S., Kawasaki S., Miyata H., Kurita H., Mizuno T., Matsuura S., Mizuno A., Oshige M., Katsura S., A new direct single-molecule observation method for DNA synthesis reaction using fluorescent replication protein A, Sensors, 査読有, 14(3), 2014, 5174-5182, DOI: 10.3390/s140305174.

〔学会発表〕(計8件)

碓井智大、高橋俊介、川崎祥平、宮田英史、栗田弘史、松浦俊一、水野彰、大重真彦、桂進司、蛍光 T4 DNA Ligase の 1 分子解析の試み、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

高橋俊介、碓井智大、川崎祥平、宮田英史、栗田弘史、松浦俊一、水野彰、大重真彦、桂進司、微細流路中での T7 Exonuclease 活性のリアルタイム 1 分子観測、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

高橋俊介、本岡伸也、川崎祥平、宮田英史、栗田弘史、松浦俊一、水野武、水野彰、大重真彦、桂進司、負の超らせん導入による二重らせんの局所的な開裂の 1 分子直接観測、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 26 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

大島伸紀、宮田英史、内海歩、石黒勇登、渋谷元規、高橋俊介、大重真彦、桂進司、His-tag 融合タンパク質固定化のための金薄膜表面修飾法の開発、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 14 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

高橋俊介、川崎祥平、宮田英史、栗田弘史、水野武、松浦俊一、水野彰、大重真彦、桂進司、蛍光複製タンパク質 A を用いた 1 本鎖 DNA 標識による DNA 合成反応のリアルタイム 1 分子観察、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 14 日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

川浦啓希、宮田英史、大島伸紀、高橋俊介、大重真彦、桂進司、DNA 分子の高効率固定化法の開発、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議場およびマ

リンメッセ福岡(福岡県福岡市)

岡田惇、高橋俊介、宮田英史、大島伸紀、大重真彦、桂進司、環状 DNA 分子の固定化技術開発、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議場およびマリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

発表者：高橋俊介、川崎祥平、山口晃史、宮田英史、栗田弘史、水野武、松浦俊一、水野彰、大重真彦、桂進司、微細流路中での 1 本鎖 DNA 認識ペプチドを用いた 1 本鎖 DNA の直接観察法、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 11 日、福岡国際会議場およびマリンメッセ福岡(福岡県福岡市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大重 真彦 (OSHIGE, Masahiko)
群馬大学・大学院理工学府・准教授
研究者番号：00451716

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし