

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 3 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26400426

研究課題名(和文) 張力・トルク独立制御型ピンセットの開発による1分子DNAの高次構造の解明

研究課題名(英文) Elucidation of DNA higher order conformation by development of a novel tweezer controlling force and torque independently

研究代表者

村山 能宏 (Murayama, Yoshihiro)

東京農工大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60334249

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)：DNAを引っ張ったり捻じったりすると、歪の蓄積により複雑な構造が出現する。細胞内ではDNAの高次構造が制御されることで、遺伝子発現が制御されている。本研究では、1分子DNAの伸長操作と回転操作を独立に制御できる装置を開発し、従来の方法では観測が困難な低張力領域において、捻じれにともなうDNAの構造変化を観測することに成功した。本研究で得られた結果は、DNAの塩基配列には蛋白質の設計情報だけでなく、高次構造に関する情報もコードされている可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Complicated conformations of DNA appear when strain is accumulated by stretching and twisting DNA. In living cells, gene expression is regulated by regulating the higher order conformation of DNA. In this study, we have developed a novel tweezer which enables us to stretch and twist a single DNA independently, and succeeded to observe the conformational change in low force regime that is hard to access by traditional method. Our results indicate that not only a protein design but also conformational design can be coded in DNA base sequence.

研究分野：生物物理学

キーワード：DNA 高次構造 構造変化 捻じれ 張力 トルク

1. 研究開始当初の背景

ひもを振じると曲げと振じれによる歪が蓄積され、座屈にともなう大規模な構造変化が生じる。DNAは直径約2 nmのひも状の高分子であり、引っ張られたり振じられたりすることで複雑な高次構造が出現する。細胞内ではDNAの高次構造が巧みに制御されることで、遺伝子発現が制御されている。この巧妙な制御機構を解明するためには、どのような物理的条件下、どのような高次構造が出現するのかを明らかにする必要がある。

従来、振じれにともなうDNAの高次構造変化の観測には、おもに永久磁石の回転を利用した磁気ピンセットが用いられており、DNAに加わる力が0.5 pN以上の領域における振じれと高次構造の関係が明らかにされている。しかし、永久磁石を用いた従来型の磁気ピンセットでは、DNAの伸長操作と回転操作に同一の磁石を用いるため、低張力下で振じることができない。生体内のDNAは0.5 pN以下の低張力下にあると考えられており、この領域におけるDNAの高次構造を明らかにするためには、1分子DNAの伸長と回転操作を独立に行える新たな手法の開発が不可欠であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、1分子DNAの張力とトルクを独立に制御できる装置を開発し、従来の手法では困難な低張力領域におけるDNAの高次構造を解明することである。本研究では、DNAの伸長操作に光の輻射圧を、回転操作にヘルムホルツ型コイルで生成する回転磁場を用いることで、DNAの伸長に必要な力と回転に必要なトルクを独立に制御できる装置を開発した。さらに、この装置を用いて0.5 pN以下の張力下におけるDNAの振じれ応答の測定により、低張力領域におけるDNAの高次構造の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 張力・トルク独立制御型ピンセットの開発

図1のように、全長16.5 μm の λ -DNAを用いてDNAの一端をガラス基板に、他端を直径3 μm の磁性体ビーズに結合させた試料を作成した。DNAの伸長操作には、対物レンズで集光したレーザー光(波長1064 nm)を用いた。レーザー光を磁性体ビーズに照射すると、ビーズは光の輻射圧によりz軸方向の力を受ける。この力によりDNAは伸長され、ビーズは輻射圧による力とDNAに生じる張力が釣り合う位置で静止する。レーザー光の出力変化によりDNAに生じる張力を変化させることができる。また、DNAの回転操作を実現するために、図1に示した2対のヘルムホルツ型コイルを作成した。対面する2つのコイルに対し同じ大きさの電流を同方向に流すと、試料近傍においてコイルを貫く方向に一樣な磁場が生成される。コイル1,2とコイル3,4に

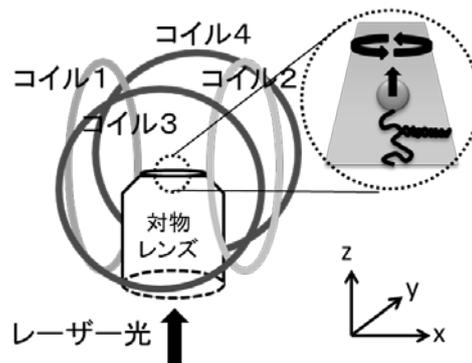


図1. 張力・トルク独立制御型ピンセットによるDNAの伸長、回転操作の概念図

位相を $\pi/2$ ずらした交流電圧を流すことで、z軸方向を回転軸とする回転磁場が生成される。この磁場が磁性体ビーズに及ぼすトルクによりビーズを回転させ、DNAを振じる。交流電流の振幅、周波数を変えることで、トルク的大小と回転速度を変化させた。

(2) ビーズの位置および力の算出

ビーズの位置およびビーズに加わる力ともに位置zの関数である。本研究では、CCDカメラで取得したビーズ像の大きさから位置zを算出した。また、DNAが結合していない磁性体ビーズに対してレーザー光を照射し、輻射圧によりビーズが上昇するときの位置zの時間変化からストークス抵抗力を算出し、位置zにおいてビーズに加わる力を求めた。

(3) 低張力領域におけるDNAの振じれ応答の観測

DNAに振じれが蓄積されると座屈が生じ、二重らせん構造を持つDNAがさらに大きならせん構造を形成する(超らせん形成)。図1のように伸長させたままDNAを振じると、超らせんの形成にともないDNAの末端間距離が減少する。以下では、このときのDNAを振じった回数と末端間距離の関係をDNAの振じれ応答と呼ぶことにする。本研究では、独自に開発した張力・トルク独立制御型ピンセットを用いて、従来観測されていない0.5 pN以下の張力領域における振じれ応答を測定した。

4. 研究成果

(1) 張力・トルク独立制御型ピンセットの開発

直径1.0 mmの導線を用いて、巻数200-300回のコイルを作成した結果、直径3 μm の磁性体ビーズを10 Hzで回転可能な磁場を生成することができた。このときにビーズに印加されるトルクは3-4 pN μm と見積もられ、DNAを振じるのに十分な大きさである。また、相対誤差3%未満の精度で位置検出が可能な解析方法を確立することができた。さらに、NDフィルタでレーザー強度を抑制すること

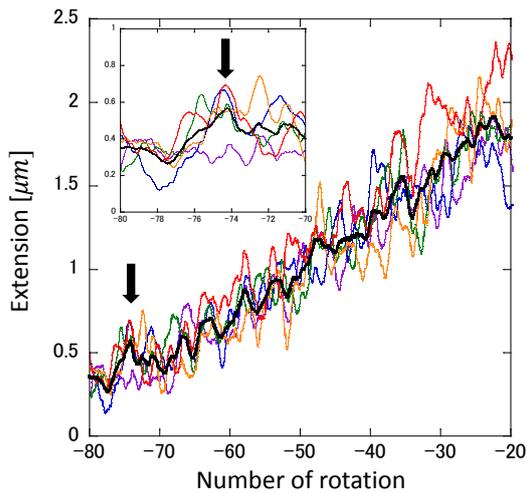


図 2. 低張力下 (<0.2 pN)における DNA の振
じれ応答

により、0.5 pN 以下の張力の下、全長約 8 μm の DNA に対し末端間距離の変化を検出できることを確認した。このように、従来の手法では困難な低張力領域での振じれ応答の取得が可能で、張力・トルク独立制御型ピンセットの開発に成功した。

(2) 低張力領域における DNA の振じれ応答

開発した装置を用いて取得した振じれ応答の一例を図 2 に示す。これは全長 8 μm の DNA に対し 0.2 pN 以下の張力域において、1 Hz の回転速度で振じったときの振じれ応答であり、DNA を二重らせんの回転方向と逆向き（負方向）に振じっている。図中の色付きの線は同一の DNA 試料に対する 5 回の測定結果であり、黒線は 5 回の測定値の平均値である。振じれ応答を見ると、DNA を負方向に振じることによって数百 nm の増減を繰り返しながら末端間距離が短くなるのが分かる。

DNA を振じると、始めに歪の蓄積で生じた座屈により小さなループが形成される。本測定で観測された末端間距離の増減の大きさは、理論的に見積もられるループサイズとほぼ一致する。ループが形成された後、さらに振じると、ループが形成された箇所を超らせんが形成される場合と、他の箇所新たなループが形成される場合が考えられる。低張力の場合、高張力の場合と比較して複数箇所ループが形成される確率が高いことが理論的に予測されており、本測定で得られた末端間距離の増減は、低張力域に特有のループ形成によるものと考えられる。また、図 2 中の矢印で示した箇所のように、複数回の測定結果において同一箇所末端間距離の増減が現れる場合があることが分かった。この結果は、DNA 内に局所的に安定な構造が形成されていることを示唆している。このような安定な構造が出現する箇所が、塩基配列に依存した DNA の力学特性で決まっているならば、DNA の塩基配列には蛋白質の設計情報だけでな

く、DNA の高次構造に関する情報がコードされていると捉えることができる。

このように、本研究で開発した装置を用いることで、従来観測されていない低張力領域における振じれ応答の取得に成功し、その特徴を明らかにすることができた。

(3) 生体高分子溶液中の微粒子の拡散過程

本研究で開発した画像取得および解析手法を用いると、直径数マイクロメートルのビーズの位置を数 nm の精度で 3 次元的に検出できる。この技術を生体高分子溶液中の微粒子の運動観測に利用できるのではないかと考え、コラーゲンおよび DNA 溶液中における微粒子の運動観測を試みた。

直径 1 μm のポリスチレンビーズを光ピンセットで捕捉し、z 軸（光軸）方向のビーズの位置の揺らぎを測定した。z 軸方向の弱い捕捉力を利用することで、捕捉力の影響をほとんど受けない自由拡散領域から捕捉力の影響を受ける束縛拡散領域まで、広い範囲の運動を測定できる。これらの測定結果を基に、溶液の粘性および弾性が微粒子の運動に及ぼす影響を評価した。その結果、コラーゲン溶液は通常の粘性流体の性質を示すのに対し、DNA 溶液では時間スケールに依存した弾性が生じることが分かった。弾性の出現は DNA のように長い高分子の溶液に特有の性質と考えられ、複雑に絡まり合った DNA のネットワーク構造の緩和が時間スケールに依存した弾性を生み出していると考えられる。

これらの結果は、核内のような高濃度 DNA 溶液中における拡散過程では、運動の時間スケールに応じて、粘性の寄与だけでなく弾性の寄与も考慮する必要があることを示唆している。

(4) 1 分子 DNA 上の蛋白質の拡散過程

本研究で開発した装置で用いているレーザー光は、透過率の小さい磁性体ビーズに対しては強い輻射圧を及ぼすが、透過率の大きいポリスチレンビーズに対しては、微粒子を捕捉する光ピンセットとして利用できる。本研究で開発した装置を光ピンセットとして利用することで、DNA 鎖の熱運動が DNA 結合蛋白質の一次元ブラウン運動に及ぼす影響について調べた。

DNA の両末端に直径 3 μm のポリスチレンビーズを結合させ、DNA 上を一次元ブラウン運動する DNA 結合蛋白質 (Staphylococcal Nuclease) の様子を観測した。その結果、DNA の熱揺らぎは蛋白質のブラウン運動の速さ（拡散定数）に直接影響しないものの、DNA 結合蛋白質の存在確率は DNA 鎖の熱揺らぎが大きい箇所で高くなることが分かった。現在までにその要因を解明するには至っていないが、これらの結果は DNA 結合蛋白質の結合頻度が、高次構造に依存した DNA の熱揺らぎを介して調節されている可能性を示唆している。

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1件)

①Masafumi Kuroda and Yoshihiro Murayama, Simple method to measure and analyze the fluctuation of a small particle in biopolymer solutions, Review of Scientific Instruments, 86, 125105(1-6), 2015, 10.1063/1.4936879, 査読有

[学会発表] (計17件)

①嵯峨早友佳, 村山能宏, ポリリジンによるDNAの凝縮転移, 日本物理学会第72回年次大会, 2017年3月20日, 大阪大学豊中キャンパス (大阪府豊中市)

②吉田浩太郎, 村山能宏, 捩じれ応答に現れるDNA高次構造の記憶, 日本物理学会第72回年次大会2017年3月20日, 大阪大学豊中キャンパス (大阪府豊中市)

③Masaya Tanoguchi and Yoshihiro Murayama, Effect of mesh structure of DNA on diffusion of a small particle, 日本生物物理学会第54回年会, 2016年11月26日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

④Kotaro Yoshida and Yoshihiro Murayama, Dependence of twisting velocity on higher order structure of DNA, 日本生物物理学会第54回年会, 2016年11月26日, つくば国際会議場 (茨城県つくば市)

⑤村山能宏, 微粒子が感じるDNAの揺らぎ, 粘性, 弾性, 異常拡散をめぐる最近の進展, 2016年8月31日, 慶応大学日吉キャンパス (神奈川県横浜市)

⑥田之口将也, 村山能宏, DNAの網目構造が微粒子の拡散に及ぼす影響, 第15回関東ソフトマター研究会, 2016年8月15日, 首都大学東京 (東京都八王子市)

⑦安倍弘喜, 村山能宏, 熱的に揺らぐDNA上における微粒子のブラウン運動, 日本物理学会第71回年次大会, 2016年3月22日, 東北学院大学泉キャンパス (宮城県仙台市)

⑧増田心一郎, 黒田真史, 村山能宏, DNA溶液中における微粒子の束縛された拡散運動, 日本物理学会第71回年次大会, 2016年3月22日, 東北学院大学泉キャンパス (宮城県仙台市)

⑨吉田浩太郎, 安藤大輔, 村山能宏, 捩じれ速度に依存したDNAの超螺旋形成・崩壊過程, 日本物理学会第71回年次大会, 2015年9月19日, 関西大学千里山キャンパス (大阪府吹田市)

⑩Shinichiro Masuda, Masafumi Kuroda, and Yoshihiro Murayama, Effective elasticity acting on a small particle in DNA solution, International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2015, 2015年8月21日, Inamori Hall Shiran-Kaikan (京都府京都市)

⑪ Hiroki Abe and Yoshihiro Murayama,

Probability Distribution of the Position of a DNA Binding Protein on a Thermally Fluctuating DNA, International Symposium on Fluctuation and Structure out of Equilibrium 2015, 2015年8月21日, Inamori Hall Shiran-Kaikan (京都府京都市)

⑫安藤大輔, 村山能宏, 張力・トルク独立制御型ピンセットを用いたDNAの超らせん形成の観測, 日本物理学会第70回年次大会, 2015年3月23日, 早稲田大学早稲田キャンパス (東京都新宿区)

⑬Hiroki Abe and Yoshihiro Murayama, 1D diffusion of a DNA binding protein along a thermally fluctuating DNA, Physics of Structural and Dynamical Hierarchy in Soft Matter, 2015年3月16日, Institute of Industrial Science, University of Tokyo (東京都目黒区)

⑭Daisuke Ando, Masahiro Makuta, and Yoshihiro Murayama, Formation of DNA supercoils under independent control of tension and torque, Physics of Structural and Dynamical Hierarchy in Soft Matter, 2015年3月16日, Institute of Industrial Science, University of Tokyo (東京都目黒区)

⑮Masafumi Kuroda and Yoshihiro Murayama, Constrained diffusive motion in biopolymer solutions, Physics of Structural and Dynamical Hierarchy in Soft Matter, 2015年3月16日, Institute of Industrial Science, University of Tokyo (東京都目黒区)

⑯安倍弘喜, 村山能宏, DNA結合蛋白質によるDNAの力学特性変化, 日本物理学会2014年秋季大会, 2014年9月8日, 中部大学春日井キャンパス (愛知県春日井市)

⑰増田心一郎, 村山能宏, 非一様な溶液中における微粒子の運動観測, 日本物理学会2014年秋季大会, 2014年9月8日, 中部大学春日井キャンパス (愛知県春日井市)

[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]

ホームページ等

<http://kenkyu-web.tuat.ac.jp/Profiles/27/0002621/profile.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村山 能宏 (MURAYAMA Yoshihiro)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授
研究者番号: 60334249

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

安藤 大輔 (ANDO Daisuke)

吉田 浩太郎 (YOSHIDA Kotaro)

黒田 真史 (KURODA Masafumi)

安倍 弘喜 (ABE Hiroki)

増田 心一郎 (MASUDA Shinichiro)

田之口 将也 (TANOGUCHI Masaya)

嵯峨 早友佳 (SAGA Sayuka)