

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月10日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21770183

研究課題名（和文）1分子観察解析技術を応用したDNA-タンパク質群相互作用の精密解析

研究課題名（英文）Development of single molecule observation technique for the interaction analysis of DNA and protein

研究代表者

大重 真彦（OSHIGE MASAHIKO）

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00451716

研究成果の概要（和文）：DNA-タンパク質の相互解析を行うために、黄色蛍光タンパク質と1本鎖DNA結合タンパク質RPA70kDaのDNA結合部位の融合タンパク質（RPA-YFP）を作成した。RPA-YFPは1本鎖DNA結合活性を有し、マイクロ流路中に片端固定した1本鎖RPA-YFPの可視化に成功し、塩を用いることにより可視化操作を行うことに成功した。この技術を用いることによりKlenow fragment（3'-5' exo-）によるDNA合成反応の精密解析のための1分子観測技術の構築に成功した。

研究成果の概要（英文）：Intercalation of fluorescent dyes such as YOYO-1 and SYTOX Orange has been the standard method for observing single molecules of double-stranded DNA (dsDNA), but effective fluorescent dyes for observing single molecules of single-stranded DNA (ssDNA) have not been found. To facilitate direct single-molecule observations of DNA metabolism reactions, it is necessary to establish methods for discriminating ssDNA and dsDNA. To observe ssDNA directly, we prepared a fusion protein consisting of the 70 kDa DNA-binding domain of replication protein A and enhanced yellow fluorescent protein (RPA-YFP). This fusion protein had ssDNA-binding activity. In this experiment, dsDNA was stained by SYTOX Orange and ssDNA by RPA-YFP, and we succeeded in staining ssDNA and dsDNA by using RPA-YFP and SYTOX Orange simultaneously and in observing of DNA synthesis reaction by Klenow fragment (3'-5' exo-).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物化学工学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：1分子解析、形態制御、可視化技術、1本鎖DNA結合タンパク質、1本鎖DNA結合ペプチド

1. 研究開始当初の背景

近年の生化学・分子生物学・遺伝学・細胞

生物学などの進展とゲノムプロジェクトの成果を基に、DNA-タンパク質間相互作用を中

心に、タンパク質の性質についての理解が深まってきている。しかし、これらの知見のほとんどは数万分子以上の多分子を対象とした生化学的・遺伝学的解析であり、その反応の素過程の詳細について解明できていない部分も多く残されている。一方、1分子観察技術の進展も目覚ましく、DNA やタンパク質を対象としたの1分子観察・1分子操作技術を用いた生化学反応をリアルタイムに観測することが可能となってきた。電気泳動など従来用いられてきた解析手法では1反応系において100万分子以上を対象となることが多く、得られた結果は多分子の平均挙動となってしまうため個々の分子挙動やその分布についての詳細は不明となる。それに対して1分子観察技術による解析では、多分子解析では隠れてしまう個々の分子挙動やその分布等の反応の素過程を直接観察することが可能であり、従来の解析法では得ることが困難な生化学的性質に関する新たな知見を得ることができる。と考える。

2. 研究の目的

現在の分子生物学・生化学解析技術は、1反応中に数万分子以上のDNA やタンパク質を用いた解析を行う多分子解析が主流である。そのため、得られた結果は数万分子以上の平均的な挙動の結果であり、分子1個が持つ本来の素の性質を明らかにすることは困難である。本研究は、1分子観察解析技術を応用し、DNA やタンパク質の形態を制御をしながら複合体中における個々の分子の挙動解析技術を確立し、解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

溶液中の分子挙動を1分子レベルでリアルタイムに観察するための有効な手段として蛍光標識による蛍光観察法がある。蛍光観察を用いた1分子イメージング法では顕微

鏡視野内において個々の分子挙動を捉えることが可能であるが、DNA 合成反応やDNA 複製・修復・組換え反応に1分子解析技術を適用した報告はあまりなかった。その理由として、i) 固定されていない1分子DNA は溶液中でブラウン運動によるランダム形態をとるため有益な情報が得難い。ii) 2本鎖DNA を蛍光標識するインターカレータ型蛍光色素はDNA 合成等のDNA 代謝反応が妨げられることが多い。iii) DNA 代謝反応の根幹である2本鎖DNA を1本鎖DNA にし、2本鎖DNA に戻す反応で、1本鎖DNA の安定した可視化法がないことが考えられた。これらの問題を解決するためにマイクロ流路を用いることによりDNA の形態制御を行い、そして、ssDNA の可視化技術を確立した後、DNA-タンパク質の精密解析技術の構築を試みた。

4. 研究成果

4-1 RPA-YFP

RPA とは本来3つのサブユニットから成るものであり、各サブユニットについては、多くの研究が行われている。1本鎖DNA (以降ssDNA と表記) に対して結合能はアミノ酸残基は70kDa のサブユニットに存在し、本研究ではマウス由来のRPA 70kDa サブユニットでアミノ酸190~431番目まで部位と黄色蛍光タンパク質(YFP) と融合させる形でタンパク質発現ベクターを設計し、さらに、タンパク質精製用にHis-tag が融合されるように設計した。

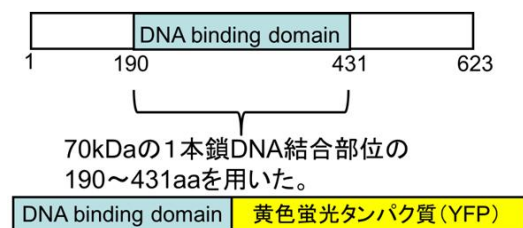


Fig. 1 RPA-YFP のデザイン

4-2 RPA-YFP の SDS-PAGE 結果

RPA-YFP を大腸菌で発現させ、His タグを用いて精製した結果を Fig. 2 に示した。

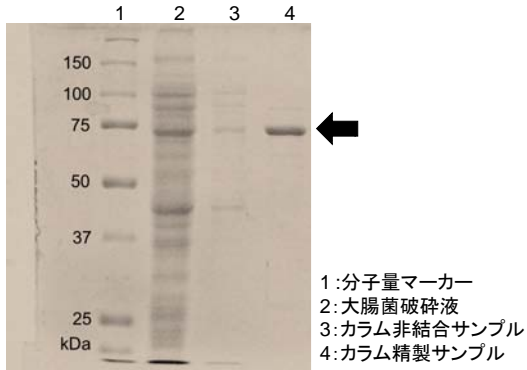


Fig. 2 精製前後の RPA-YFP SDS-PAGE 結果

この結果から、RPA-YFP の精製に成功し、以降の実験では、この精製 RPA-YFP を実験に使用した。

4-3 RPA-YFP の結合活性実験

得られた RPA-YFP が DNA 結合活性を有するかどうかの確認実験を Fig. 3 に示した。実験に使用した 1 本鎖 DNA は M13mp18 ssDNA を用いた。

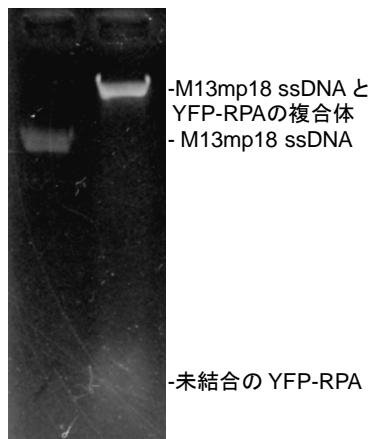


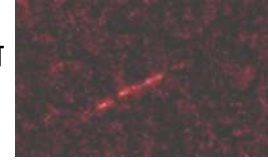
Fig. 3 RPA-YFP の結合活性実験結果

この結果より、RPA-YFP は 1 本鎖 DNA 結合活性を有することを確認した。

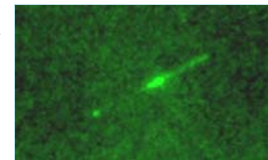
4-4 RPA-YFP による 1 本鎖部位の可視化

1 本鎖 DNA 結合活性を確認した RPA-YFP を用いて、2 本鎖部位と 1 本鎖部位を持つように調製した λ DNA の可視化実験を行った。

A) SYTOX Orange による 2 本鎖部位の可視化



B) RPA-YFP による 1 本鎖部位の可視化



C) A と B の重ねあわせ

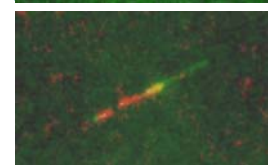


Fig. 4 2 本鎖部位と 1 本鎖部位を持つ λ DNA の可視化実験

この結果より、2 本鎖 DNA 染色剤である SYTOX Orange と 1 本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA-YFP を用いることによって、2 本鎖部位と 1 本鎖部位を染め分けることに成功した。

4-5 片端固定した 1 本鎖 DNA のマイクロ流路中での可視化実験

マイクロ流路を用いることにより、DNA の形態を制御し、リアルタイムで 1 本鎖 DNA を可視化可能であるかどうかを実験を行った (Fig. 5)。

この結果より、300mM 以上の NaCl の存在下では RPA-YFP を 1 本鎖 DNA より解離させることを確認した。そして、マイクロ流路内を 300mM 以下の NaCl 濃度に戻し、RPA-YFP を再び投入することにより再び可視化することが可能であることを確認した。このことより、意図的に 1 本鎖 DNA 領域を可視化することに成功した。

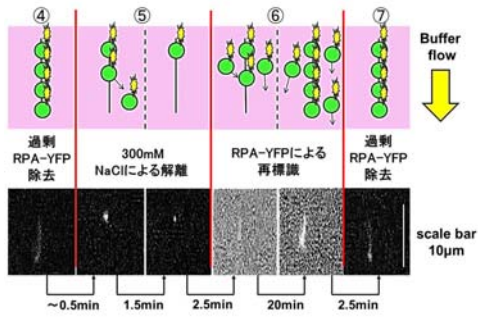


Fig.5 RPA-YFP による 1 本鎖 DNA の可視化・塩による解離・再可視化実験結果

4-6 片端固定した 1 本鎖 DNA のマイクロ流路中での DNA 合成反応の可視化実験

マイクロ流路中で、RPA-YFP により 1 本鎖 DNA の可視化操作を行うことが可能になった。この技術を用いて、DNA 合成反応の可視化を試みた。

DNA 合成反応の可視化方法として、合成した dsDNA を可視化する方法が考えられる。しかし、YOYO-1 を反応系に添加した場合は DNA ポリメラーゼ活性を阻害し、SYBR Green を添加した場合は蛍光強度が十分でなく、DNA 分子を観察することが出来なかった。そのため、Fig. 6 の方法を用いて条件検討を行った。

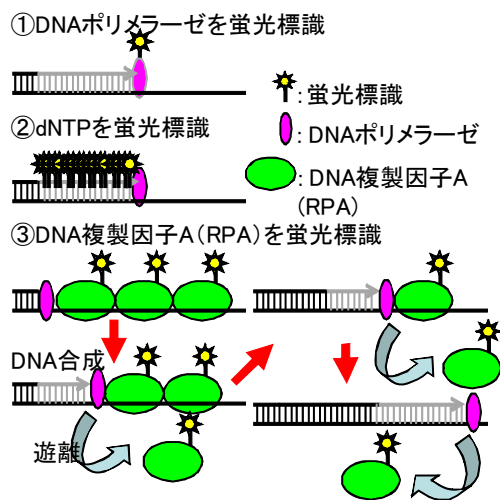


Fig.6 DNA 合成反応の可視化方法のアイデア

①は DNA ポリメラーゼを蛍光標識する方法、②は基質である dNTP を蛍光標識する方法、③は 1 本鎖 DNA を蛍光 RPA (RPA-YFP) で可視化し、その解離を観察する方法である。①は DNA ポリメラーゼの動きが観察できるが、DNA 上を合成しながら動いているのか明確ではなく、②の蛍光標識 dNTP は合成 DNA 鎖への取り込み効率が DNA ポリメラーゼ種によって大きく異なった。③の方法は、ssDNA を RPA により物理的に安定させ、YFP-RPA の蛍光により ssDNA を可視化する反応系である。また、DNA 合成により鋳型 DNA が dsDNA になれば YFP-RPA は結合できないため、DNA ポリメラーゼにより DNA 合成反応が進んでいることを間接的に観察可能となる。実際に行った実験結果を Fig. 7 に示す。

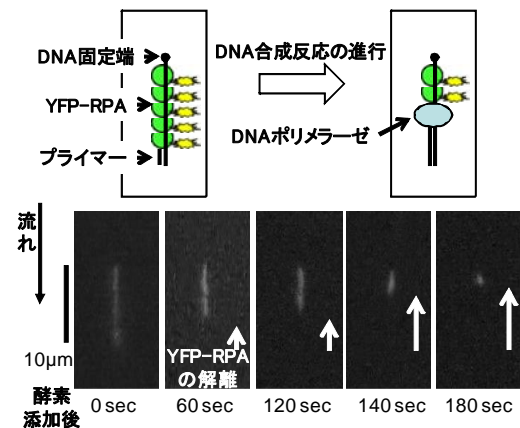


Fig.7 マイクロ流路中での Klenow fragment (3' -5' exonuclease) による蛍光 RPA の解離観察実験

λ DNA を熱解離させ 1 本鎖化し、自由端にプライマーを結合した鋳型 DNA をガラス基板に片端固定した。その後、YFP-RPA を流し ssDNA を可視化した図が Fig. 7 の 0 sec である。その後、DNA ポリメラーゼとして、5' \rightarrow 3' かつ 3' \rightarrow 5' エキソヌクレアーゼ活性を持た

ない Klenow fragment (3' -5' exo-) を添加した。この結果から、経時毎に RPA-YFP の解離観察が可能であり、Fig. 7③は実験系として可能であることを確認した。現在、Fig. 7③の実験系に Fig. 7①の蛍光 DNA ポリメラーゼを組み合わせる実験、反応後 (180 sec 以降) に YOYO-1 を含む溶液を流し合成した dsDNA を確認する反応系を構築している。

以上により、本研究計画の目的であるマイクロ流路を用いることにより DNA の形態制御を行い、そして、ssDNA の可視化技術を確立し、DNA-タンパク質の精密解析技術の構築に成功した。

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 2 件)

1. Oshige, M., Kawasaki, S., Takano, H., Yamaguchi, K., Kurita, H., Mizuno, T., Matsuura, S. I., Mizuno, A., Katsura, S., Direct Observation Method of Individual Single-Stranded DNA Molecules Using Fluorescent Replication Protein A., Journal of Fluorescence, 査読有り, 21(3), 1189-1194, 2011

2. Oshige, M., Yamaguchi, K., Matsuura, S. I., Kurita, H., Mizuno, A., Katsura, S., A new DNA combing method for biochemical analysis., Analytical Biochemistry, 査読有り, 400(1), 145-147, 2010

[学会発表] (計 6 件)

1. 村上太滝、川崎祥平、高橋俊介、大重真彦、栗田弘史、松浦俊一、水野武、水野彰、桂進司、開発した 2 種類の 1 本鎖 DNA 可視化方法の比較検討、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日、パシフィコ横浜(神

奈川)

2. 川崎祥平、大重真彦、水野武、栗田弘史、松浦俊一、水野彰、桂進司、Real-Time 観測を目指した 1 本鎖 DNA 可視化技術の開発、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (兵庫)

3. 村上太滝、野中潤、川崎祥平、大重真彦、栗田弘史、松浦俊一、水野彰、桂進司、1 本鎖 DNA 結合ペプチドを用いた 1 本鎖 DNA の可視化、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010 年 12 月 9 日、神戸ポートアイランド (兵庫)

4. 山口晃史、川崎祥平、大重真彦、松浦俊一、栗田弘史、水野彰、桂進司、1 分子解析のための DNA 形態制御、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、パシフィコ横浜 (神奈川)

5. 山口晃史、川崎祥平、大重真彦、松浦俊一、水野武、栗田弘史、水野彰、坂口謙吾、桂進司、1 分子観察技術を用いた DNA-タンパク質相互作用解析の試み、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、パシフィコ横浜 (神奈川)

6. 川崎祥平、山口晃司、大重真彦、水野武、栗田弘史、坂口謙吾、水野彰、桂進司、1 本鎖 DNA 結合因子を用いた 1 本鎖 DNA の可視化技術の開発、第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日、パシフィコ横浜 (神奈川)

[図書] (計 2 件)

1. 【タイトル】 DNA Microarrays, Synthesis and Synthetic DNA (Editor: Campbell, M. J.)

【執筆した章のタイトル】 Manipulation and Direct Observation Techniques for Investigation of DNA Metabolic Reactions.

【執筆者】 Oshige, M., Katsura, S.

【出版社】 Nova Science Publishers

【発行年】 2011 年

【ISBN】 978-1-61209-823-4

【総ページ】 384 ページ (担当 373-384)

2. 【タイトル】 リアルタイム計測による生命現象の解析 (村田静昭監修)

【執筆した章のタイトル】 第 7 章 DNA 代謝反応の 1 分子観察と DNA 分子の形態制御技術

【執筆者】 桂進司、大重真彦

【出版社】 シーエムシー出版

【発行年】 2011 年

【ISBN】 978-4-7813-0319-2

【総ページ】 153 ページ (担当 71-79)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大重 真彦 (OSHIGE MASAHIKO)

群馬大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：00451716

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：