

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06946

研究課題名(和文)1分子解析技術による真核生物のDNA複製反応解析へのアプローチ

研究課題名(英文) Direct single-molecule observations of DNA unwinding by SV40 large tumor antigen under a negative DNA supercoil state

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) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：負の超らせん状態下でのSV40ラージT抗原(SV40複製開始とDNAヘリカーゼの機能を合わせ持つ複製因子)によるDNA鎖巻き戻し反応の直接観察を試みた。実験の結果、SV40ラージT抗原によってSV40複製起点から複製が開始され、巻き戻されたDNAの1本鎖領域を直接観察できること、負の超らせん密度の増加がSV40oriからのDNA複製反応の開始の効率を上昇させること、さらに、引き続くSV40ラージT抗原によるDNA鎖巻き戻し反応促進することを明らかにした。これらの結果から、負の超らせんがDNA複製開始の制御に重要な役割を果たしている可能性があることを示すことに成功した。

研究成果の概要(英文)：Superhelices, which are induced by the twisting and coiling of double-helical DNA in chromosomes, are thought to affect DNA metabolic processes. In this study, I report the effects of negative supercoiling on the unwinding activity of simian virus 40 large tumor antigen (SV40 TAg) at a single-molecular level. The supercoiling density of linear DNA templates was controlled using magnetic tweezers and monitored using a fluorescent microscope in a flow cell. SV40 TAg-mediated DNA unwinding under relaxed and negative supercoil states was analyzed by the direct observation of both single- and double-stranded regions of single DNA molecules. Increased negative superhelicity stimulated SV40 TAg-mediated DNA unwinding more strongly than a relaxed state; furthermore, negative superhelicity was associated with an increased probability of SV40 TAg-mediated DNA unwinding. These results suggest that negative superhelicity helps to regulate the initiation of DNA replication.

研究分野：分子生物

キーワード：DNA DNA複製 高次構造 超らせん SV40 1分子観察

1. 研究開始当初の背景

真核生物の DNA 複製反応解析法として、1980 年代から SV40 DNA 複製系が Kelly、Hurwitz、Stillman 等の多くの研究者により確立され、SV40 ラージ T 抗原 (TAg)・DNA ポリメラーゼ α /プライマーゼ複合体 (pol α 複合体)・DNA トポイソメラーゼ I (Topo I) (以下、これらのタンパク質を 3 因子と略) が必須であることが示された [Fanning E *et al.*, *Virology*, 384, 352-359, 2009 (Review)]。真核生物の DNA 複製反応に必要な因子が明らかであるため、1 分子解析に適した実験系であると考えた。しかし、3 因子+HeLa 細胞抽出液の実験結果より、DNA 複製反応効率は鑄型 DNA の構造 (閉環状または直鎖状 DNA) の違いにより大きな差があることが報告されている [Katsura S *et al.*, *Cell Struct. Funct.*, 18, 19-32, 1993]。それは、3 因子のみ (*in vitro* 条件) の DNA 複製反応効率は「閉環状 DNA \ll 直鎖状 DNA」であり、3 因子+HeLa 細胞抽出液 (*in vivo* に近い条件) での反応効率は「閉環状 DNA \gg 直鎖状 DNA」となる。このことから DNA の超らせん構造は、生体内での DNA 複製反応への関与が示唆されるが、明らかではない。この違いの解明には、既存の多分子解析法では困難であり、その理由は以下の点にあると考える。

理由 1 : 多分子解析における鑄型 DNA 分子は、熱散乱により局所的に超らせんが導入されており、様々な超らせん状態の鑄型 DNA の集合を対象とした DNA 複製反応を解析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 複製反応が開始する」のか、「熱散乱により偶然に超らせんの閾値を越えた DNA 分子を鑄型にして DNA 複製反応が開始している」のか、両者の判別は困難である。

理由 2 : 染色体 DNA は、周期的に核マトリックスに固定化されている。その核マトリックスに固定されている DNA には負の超らせんが導入されていると推定されている [Napierala M *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 280, 37366-37376, 2005]。また、DNA 複製反応には Topo I が必須であるため、超らせん構造を常に制御しながら反応が進行する。そのため、反応開始前の鑄型 DNA に超らせんを導入しても、Topo I 活性により予め導入した超らせんは消失する。したがって、多分子解析での DNA 複製反応解析は、超らせん構造が維持されている反応の初期段階での解析を行っている可能性が高い。

上記の理由により、多分子解析では DNA の高次構造を維持しながら解析を行うことは困難である。そのため、DNA 1 分子に着目し、鑄型 DNA へ自由に超らせん構造を導入することが可能な制御技術が必要となる。

2. 研究の目的

本研究計画者は、既に鑄型 DNA へ自由に超らせん構造を導入することが可能な制御

技術の開発に成功し、SV40 DNA 複製開始点をもつ λ DNA (SV40ori- λ DNA) に負の超らせんを導入し、2 本鎖 DNA (dsDNA) である SV40ori 領域を局所的に解離させることに成功した [Takahashi S, *et al.*, *Anal. Chem.*, 87, 3490-3497, 2015]。また、DNA 複製反応に関与する DNA 代謝酵素の 1 分子解析技術についても確立している。その技術は、

1) 1 本鎖 DNA (ssDNA) の可視化技術 [Takahashi S, *et al.*, *J. Fluoresc.*, 23, 635-640, 2013] および [Oshige M, *et al.*, *J. Fluoresc.*, 21, 1189-1194, 2011]、

2) DNA 合成反応の可視化技術 [Takahashi S, *et al.*, *Sensors (Basel)*, 14, 5174-5182, 2014] および [Oshige M, *et al.*, *Anal. Biochem.*, 400, 145-147, 2010]

3) DNA 分解反応の可視化技術 [Takahashi S, *et al.*, *Anal. Biochem.*, 457, 24-30, 2014]

4) DNA 連結酵素の 1 分子局在解析技術 (発表準備中データ) である。

多分子解析により DNA 複製因子とその相互作用は明らかになってきた。しかし、1 分子レベルでの DNA 複製因子の DNA-タンパク質相互作用やタンパク質間相互作用の詳細は極めて限られた知見しか得られていない。また、DNA の超らせん構造は、転写制御に密接に関与することが報告されている [Hirose S *et al.*, *PNAS*, 85, 718-722, 1988]、超らせん構造が他の DNA 代謝反応に与える影響は明らかでない。本研究計画は、1 分子レベルで DNA の負の超らせん構造を制御し、DNA 複製反応の 1 分子解析を行う。そして、超らせん構造の有無とその DNA 複製反応への影響について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

3.1 実験試薬と装置

RPA-YFP の調製および ssDNA 結合活性の測定については、過去の発表論文 [Oshige M, *et al.*, *J. Fluoresc.*, 21, 1189-1194, 2011] に基いて実験を行った。

微細流路装置および表面改質ガラス基板の作製については、過去の発表論文 [Takahashi S, *et al.*, *Sensors (Basel)*, 14, 5174-5182, 2014] および [Takahashi S, *et al.*, *Anal. Biochem.*, 457, 24-30, 2014] に基いて作製した。

SV40 ラージ T 抗原は国立研究開発法人理化学研究所 今本細胞核機能研究室 専任研究員 水野武博士のご厚意により提供していただいた [Ishimi Y, *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 266, 16141-16148, 1991]。

本研究で用いたマイクロシリンジポンプは KD Scientific 社製 KDS-100 (Holliston, MA, USA) を用いた。マイクロシリンジはハミルトン社製 250 μ L のマイクロシリンジ

Forward SV40ori-λDNA



Reverse SV40ori-λDNA



図 1 : F-SV40ori-λDNA 及び R-SV40ori-λDNA の概要図

F-SV40ori-λDNA : 左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 SV40ori-λDNA
R-SV40ori-λDNA : 右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 SV40ori-λDNA

及び 100 μL のマイクロシリンジ (Reno, NV, USA) を用いた。

図 1 は片端ビオチン化・他片端ジゴキシゲニン化 SV40ori-λDNA のイラストを示す。なお、左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 SV40ori-λDNA 及び右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 SV40ori-λDNA は特に指定しない限り F-SV40ori-λDNA 及び R-SV40ori-λDNA と記載した。F-SV40ori-λDNA の左端のビオチン化部位はガラス基板表面に固定し、右端のジゴキシゲニン化部位には磁気ビーズを結合させた。また、R-SV40ori-λDNA の右端のビオチン化部位はガラス基板表面に固定し、左端のジゴキシゲニン化部位には磁気ビーズを結合させた。調製方法については、過去の発表論文 [Takahashi S, *et.al.*, Anal. Chem., 87, 3490-34907, 2015] と同様の方法で行った。

3. 2 微細流路内でのガラス基板修飾および微細流路内での直鎖状 DNA のガラス基板表面と磁気ビーズの固定

方法については、過去の発表論文 [Takahashi S, *et.al.*, Sensors (Basel), 14, 5174-5182, 2014]、[Takahashi S, *et.al.*, Anal. Biochem., 457, 24-30, 2014] および [Takahashi S, *et.al.*, Anal. Chem., 87, 3490-34907, 2015] と同様の方法で行った。

3. 3 負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察

本実験では ssDNA 領域を標識後、YOYO-1 により dsDNA 領域を染色することによって SV40ori-λDNA の指定した超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を直接観察した。以下にその実験操作を述べる (図 2)。

1) F-SV40ori-λDNA の左端ビオチン化部位はガラス基板表面に固定した後、右端ジゴキシゲニン化部位には抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを結合させた。

2) 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、255 ng の SV40 ラージ T 抗原を含む緩衝液

負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を直接観察

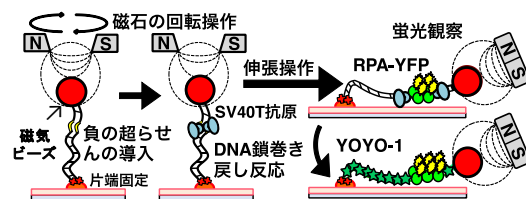


図 2 : SV40ori-λDNA の 0, -0.02, -0.04, -0.06 の超らせん密度の負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の観察実験の概要図

(SV40 TAg Buffer [30 mM HEPES (pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 50 μg/mL BSA], 1% 2-Mercaptoethanol, ATP regeneration mixture, Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 50 μL) 後、シリンジに充填し、20 μL/h にて流路内に注入することによって 45 分間インキュベートし、SV40 ラージ T 抗原を SV40 複製起点に結合させた。

3) インキュベートの前、磁気ピンセット装置を用いることによって F-SV40ori-λDNA に 0, -0.02, -0.04, -0.06 の超らせん密度の負の超らせんを導入した。磁石を微細流路の真上に設置し、磁気ビーズを付加した直鎖状 DNA を引きつけた。負の方向に指定した回転数 (1 秒あたり 1 回転する回転速度) 磁石を回転させた後、磁石の回転を停止した。これにより、F-SV40ori-λDNA の負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を開始させた。

4) 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、15 μg の RPA-YFP を含む緩衝液 (TAg Buffer, 1% 2-Mercaptoethanol, ATP regeneration mixture, Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 100 μL) 後、シリンジに充填し、30 μL/h、40 分間、流路内に注入した。

5) 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、緩衝液 (40 mM HEPES pH 8.0, 10% glycerol, 0.1% Tween 20, 1% 2-Mercaptoethanol, Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、30 μL/h、40 分間、微細流路内に注入することによって流路内のフリーな RPA-YFP の余剰な蛍光を取り除き、SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域を観察した。

6) もう一つの磁石を微細流路装置の側面から慎重に設置することによって F-SV40ori-λDNA を伸張させた。その後、RPA-YFP により標識した ssDNA 領域を観察した。

7) 観察後、0.6 mL のマイクロチューブ内にて、0.1 μM YOYO-1 を含む緩衝液 (40 mM HEPES pH 8.0, 10% glycerol, 0.1% Tween 20, 1% 2-Mercaptoethanol, Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、30 μL/h、40

分間、流路内に注入することによって F-SV40ori- λ DNA の dsDNA 領域を染色した。その後、6) と同様な伸張操作により伸張させた F-SV40ori- λ DNA を観察した。

8) SV40ori- λ DNA の負の超らせん状態下にて SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応は同一の顕微鏡視野内にてビデオレートでの撮影後、画像化した。画像解析ソフト Image J を用いることによって画像化した DNA の dsDNA 領域の蛍光領域をもとに F-SV40ori- λ DNA の長さを計測した。

9) Image J を用いることによって F-SV40ori- λ DNA の負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域を光学マッピングした。

4. 研究成果

4. 1 負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察

本研究では 1 回転あたり 10.5 塩基対の DNA の弛緩状態下での回転数に対して DNA 二重らせんを巻き戻したらせんの回転数を負の超らせんの超らせん密度として定義することによって、F-SV40ori- λ DNA に 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度の負の超らせんを導入したときの SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を直接観察した。図 3 は F-SV40ori- λ DNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の蛍光画像である。F-SV40ori- λ DNA の 0、-0.02 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域は輝点として現れた (図 3 A、B)。光学マッピングによって SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の位置を解析したところ、F-SV40ori- λ DNA 上の輝点の位置が SV40 複製起点の位置と一致した。一方で、SV40 ラージ T 抗原が非添加である同様な実験では SV40ori- λ DNA 上に輝点が出現しなかったことから、SV40 ラージ T 抗原によって SV40ori- λ DNA の SV40 複製起点領域から DNA 複製反応が開始されたと考えられる。興味深いことに、F-SV40ori- λ DNA の -0.04、-0.06 の超らせん密度下では SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域はさらに拡張され、長い直線状の蛍光領域として観察された (図 3 C、D)。この結果は DNA が高い超らせん密度の負の超らせん状態のときのみ出現したことから、高い負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を促進させることが示された。試験管内実験による多分子の挙動の平均値の測定では、熱運動によって局所的に様々な密度の超らせんが導入されている状態である閉環状 DNA の超らせん密度を制御すること、DNA 複製反応の開始の過程は覆い隠されてしまうこと、DNA トポイソメラーゼによって超らせん状態の閉環状 DNA の超らせ

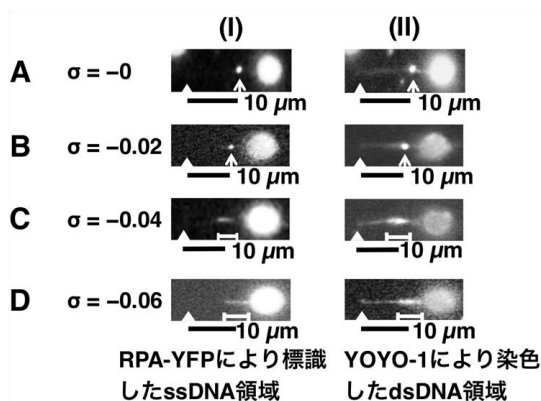


図 3 : SV40ori- λ DNA の負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察

F-SV40ori- λ DNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応は (I) RPA-YFP により ssDNA 領域を標識後、(II) YOYO-1 により dsDNA 領域を染色することより直接観察された。

A : 0 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された SV40ori- λ DNA の蛍光画像

B : -0.02 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された SV40ori- λ DNA の蛍光画像

C : -0.04 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された SV40ori- λ DNA の蛍光画像

D : -0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された SV40ori- λ DNA の蛍光画像

白三角：鋳型 DNA の固定端

白矢印：ssDNA 領域の蛍光領域

黒線：10 μ m のスケールバー

んが弛緩されることなどにより、超らせんが DNA 複製反応に与える影響を解析することが困難であることから、本研究の結果と同様な結果を得ることは事実上、不可能である。本研究では DNA 1 分子を操作することによって直鎖状 DNA に負の超らせんを導入し、さらに、DNA 複製反応の開始を直接観察することによって負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応に影響を与えることをはじめて実証することができた。また、既往の研究にて報告されている DNA に付加した磁気ビーズの挙動を追跡する磁気ピンセット装置のみ用いた間接的な解析では、DNA の末端間距離の変化の情報しか得ることができないため、SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の位置や長さを決定することができず、負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応に与える影響の実態を明らかにすることは極めて困難である。一方、本研究では、1 分子レベルの蛍光観察によって SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の位置や長さを捉えることができるため、負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を促進させることを明らかにした。

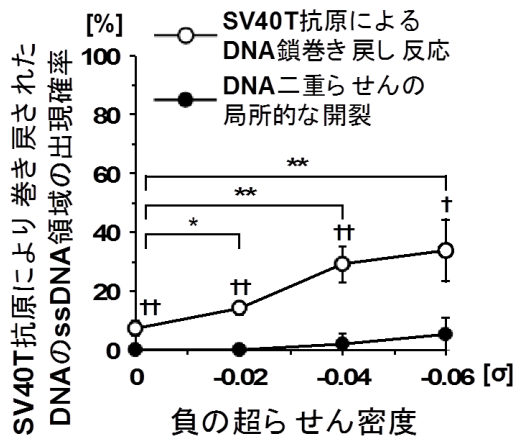


図4：F-SV40ori-λDNA の指定した超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応と局所的な開裂の出現頻度の確率分布

白丸：F-SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された ssDNA 領域の出現頻度の確率分布

黒丸：0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での F-SV40ori-λDNA の局所的な開裂の出現頻度の確率分布

SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の実験を通して観察した DNA の分子の数：46 ($\sigma = 0$)、38 ($\sigma = -0.02$)、53 ($\sigma = -0.04$)、43 ($\sigma = -0.06$) 分子

負の超らせん歪みによる DNA 二重らせんの局所的な開裂の実験を通して観察した DNA の分子の数：55 ($\sigma = 0$)、54 ($\sigma = -0.02$)、46 ($\sigma = -0.04$)、49 ($\sigma = -0.06$) 分子

エラーバー：F-SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により DNA 鎖巻き戻し反応の実験と 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での F-SV40ori-λDNA の局所的な開裂の実験の各 4 回の実験を通して得られた標準偏差

ダガー：F-SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された ssDNA 領域の出現頻度と 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での DNA 二重らせんの局所的な開裂の出現頻度を比較したときの有意水準値 5%とした両側 t 検定による統計解析

アスタリスク：F-SV40ori-λDNA の 0 の超らせん密度下と -0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下との SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された ssDNA 領域の出現頻度の比較したときの有意水準値 5%とした片側 t 検定による統計解析

さらに、本研究では DNA の負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 複製反応の開始にどのような影響を与えるのか、を調査するために、実験により獲得された蛍光画像を解析した。図4は 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の実験と 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での F-SV40ori-λDNA の局所的な開裂の実験の 2 つの実験条件により得られた DNA の

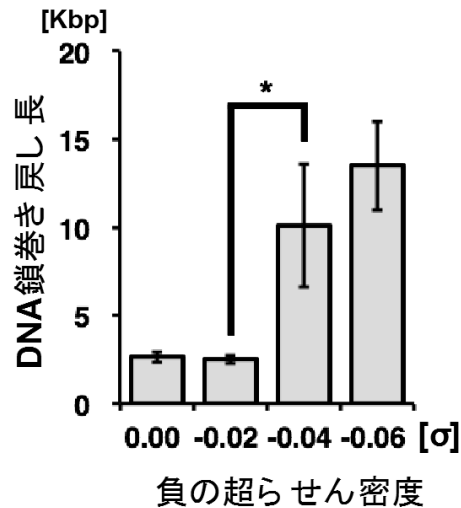


図5：SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の長さのヒストグラム

F-SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の長さを測定した分子の数：4 ($\sigma = 0$)、4 ($\sigma = -0.02$)、3 ($\sigma = -0.04$)、3 ($\sigma = -0.06$) 分子

エラーバー：F-SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の長さの標準偏差

アスタリスク：F-SV40ori-λDNA の -0.02 の超らせん密度下と -0.04 の超らせん密度下との SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の長さを比較したときの有意水準値 5%とした両側 t 検定による統計解析

ssDNA 領域の発生の確率分布を示す。解析の結果、いかなる超らせん密度の負の超らせんにおいても、SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の出現頻度が高いことが示された。これらの有意水準値 5%の両側 t 検定による統計解析では、各超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応と各超らせん密度下での DNA 二重らせんの局所的な開裂との ssDNA 領域の出現頻度に有意差が示された ($P = 0.008$ [$\sigma = 0$]、 0.001 [$\sigma = -0.02$]、 0.006 [$\sigma = -0.04$]、 0.012 [$\sigma = -0.06$])。以上の結果、出現した DNA の ssDNA 領域の大部分は SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応に依っていることが示された。また、F-SV40ori-λDNA の -0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下では 0 の超らせん密度下 (弛緩状態) よりも SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の出現頻度が 1.8 倍、4.0 倍、4.8 倍程度増加した。これらの有意水準値 5%の片側 t 検定による統計解析では、F-SV40ori-λDNA の 0 の超らせん密度下と F-SV40ori-λDNA の -0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下との SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA

領域の出現頻度に有意差が示された ($P = 0.012$ [$\sigma = 0$ vs -0.02], 0.002 [$\sigma = 0$ vs -0.04], 0.009 [$\sigma = 0$ vs -0.06]). 以上の統計的な解析の結果、負の超らせんが SV40 DNA 複製反応の開始の発生の頻度に重要な影響を与えることを明らかにした。

図5はF-SV40ori- λ DNAの0、 -0.02 、 -0.04 、 -0.06 の超らせん密度下でのSV40ラージT抗原により巻き戻されたDNAのssDNA領域の長さのヒストグラムを示す。これらの結果、F-SV40ori- λ DNAの -0.04 、 -0.06 の超らせん密度下は0、 -0.02 の超らせん密度下よりもSV40ラージT抗原によって巻き戻されたDNAのssDNA領域の長さが4.5倍程度拡張したことが示された。また、有意水準値5%の両側t検定による統計解析では、F-SV40ori- λ DNAの -0.02 の超らせん密度下と -0.04 の超らせん密度下とでのSV40ラージT抗原によって巻き戻されたDNAのssDNA領域の長さの有意差が示された ($P = 0.047$ [$\sigma = -0.02$ vs -0.04]). DNA鎖巻き戻し反応は負の超らせんを弛緩するために、SV40ラージT抗原によるDNA鎖巻き戻し反応は、負の超らせん状態下ではエネルギー的に有利に進行する。この理由から、SV40ラージT抗原によって巻き戻されたDNAのssDNA領域の長さもまた拡張されたと考えられる。高い負の超らせんがSV40ラージT抗原によるDNA鎖巻き戻し反応を促進させることを示すことに成功した。

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 1件)

①Takahashi S, Motooka S, Kawasaki S, Kurita H, Mizuno T, Matsuura SI, Hanaoka F, Mizuno A, Oshige M, Katsura S, Direct single-molecule observations of DNA unwinding by SV40 large tumor antigen under a negative DNA supercoil state., *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics*, 査読有, 2018, 36(1):32-44. doi: 10.1080/07391102.2016.1269689.

[学会発表] (計 7件)

①高橋俊介、本岡伸也、川崎祥平、栗田弘史、水野武、松浦俊一、水野彰、大重真彦、桂進司、DNAの負の超らせん導入下におけるSV40ラージT抗原によるDNA解鎖反応の1分子直接観察、BMB2015(第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会)、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

②高橋俊介、石川裕一、柳基成、小和瀬聡実、川崎祥平、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を用いた1本鎖DNA標識によるDNA合成反応の1分子観察、BMB2015(第38回日

本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会)、2015年12月1日(火)、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

③小和瀬聡実、碓井智大、高橋俊介、川崎祥平、栗田弘史、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39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

④柳基成、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、大腸菌由来DNAポリメラーゼによるDNA合成反応の1分子解析、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

⑤石川裕一、高橋俊介、岸川健太、川崎祥平、栗田弘史、水野武、松浦俊一、水野彰、大重真彦、桂進司、ヒトDNAポリメラーゼ δ 触媒サブユニットの1分子観察の試み、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

⑥高橋俊介、本岡伸也、川崎祥平、栗田弘史、水野武、松浦俊一、花岡文雄、水野彰、大重真彦、桂進司、1分子レベルの蛍光観察による負の超らせんがSV40 DNA複製反応の開始に与える影響の評価、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月2日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

⑦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、SSB-YFPを用いたDNAポリメラーゼの1分子解析、2017年度生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017)、2017年12月8日(兵庫県神戸市)

[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

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

(4)研究協力者

なし