

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06149

研究課題名(和文)1分子DNAのねじれ応答測定による弾性調節型インスレーター機能の検証

研究課題名(英文)Verification of Elastic Regulated Insulator Function by Measuring the Torsional Response of Single DNA Molecule

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：インスレーターと呼ばれるDNAの特定の塩基配列は、DNAのマクロな変形を調節する役割を担っている可能性がある。ウニで同定されたインスレーター(ArsIns)を含むDNA試料を作製し、1本のDNAを直接ねじる実験を行った結果、「局所的な配列の違いにより、DNAのマクロな変形に違いが生じることが分かった。さらに、ArsInsの活性測定及びDNAモデルの数値シミュレーションを行った結果、DNAの塩基配列は蛋白質の設計情報や結合情報だけでなく、DNA自身のマクロな構造を調節するための情報を含んでいる可能性があることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトの場合、DNAの全塩基配列の内、蛋白質の設計情報を担う領域(コード領域)は全体の2%にも満たない。非コード領域に見られる反復配列は個により異なり、疾病の要因となる場合もある。局所的な配列の違いが表現型に及ぼす影響については、蛋白質の結合の有無だけでは説明できないことから、塩基配列に依存したDNAの力学特性に着目した研究が今後さらに加速するのではないかと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Specific sequences of DNA, called insulators, can play a role in regulating the degree of the macroscopic deformation of DNA. By preparing DNA samples containing the insulator (ArsIns) identified in sea urchins and performing direct twisting experiments on a single DNA, we found that local sequence differences cause differences in the macroscopic deformation of DNA. Furthermore, by measuring the activity of ArsIns and performing numerical simulations of DNA models, we found that DNA sequences could contain not only information on protein design and binding, but also information for regulating the macroscopic structure of DNA itself.

研究分野：生物物理学

キーワード：DNA インスレーター ねじれ 弾性 エンハンサー遮断活性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA 上のインスレーター (Ins) 配列は、染色体に無数に散在する DNA ループの形成を制御し、遺伝子の転写調節を担っている。これまでに CTCF や Su(Hw) など Ins に結合する蛋白質が同定されてきたが、Ins が存在することで目的の遺伝子の転写のみが活性化される仕組みは依然不明である。一方、(A)_n や (CCGNN)_n 反復配列がヌクレオソーム排他的で特異な弾性を示し、これらの配列が Ins 活性を示すことも分かってきた。また、ウニで同定された配列 (ArsIns) は、従来の Ins のような蛋白質の結合を必要とせずに Ins 活性を示す。これらの事実は、特定の塩基配列により“DNA のマクロな変形”が制御されていることを示唆している。すなわち、これらの塩基配列には、“DNA の変形のしやすさ”という力学的性質がコードされている可能性がある。しかし、従来の分子生物学的手法のみでは、転写の活性化に不可欠な DNA のマクロな変形と局所的な塩基配列の関係を力学的に捉えることは出来ず、上述の可能性を直接検証した例はない。

本研究では、ArsIns を組み込んだ DNA 試料のねじれ応答測定、ArsIns のエンハンサー遮断活性、及び塩基配列を考慮した DNA モデルの数値シミュレーションを行い、この可能性を検証した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、転写の活性化に不可欠な DNA のマクロな変形に対する局所的な配列の力学的寄与を明らかにすることである。研究代表者等が開発した張力・トルク独立制御型ピンセットを用いて、プロモーターとエンハンサーを含む全長 2.4 μm (7058 bp) の 1 分子 DNA を直接ねじる。一般に DNA をねじると DNA 鎖に歪みが蓄積し、マクロな構造 (超らせん構造) が出現する。578 bp の ArsIns を含む場合と、同サイズの他の配列を含む場合のねじれ曲線 (回転数と DNA の末端間距離の関係) を比較することにより、局所的な配列の違いがマクロな変形に及ぼす影響が分かる。さらに、上述の DNA を培養細胞に導入した際の Ins 活性を調べるとともに、塩基配列を考慮した DNA モデルの数値シミュレーションを行い、塩基配列に依存した弾性の違いにより Ins 活性の制御が可能であるかを検証した。

3. 研究の方法

(1) DNA のねじれ応答測定

図 1 (a) のように、プロモーターとエンハンサーの間に 578 bp の ArsIns を含む試料 (ArsIns 試料) と同一箇所を Lambda-DNA の一部に置き換えた試料 (Lambda 試料) を作製した。全長 2.4 μm (7058 bp) の DNA 試料の端をガラス基板に、反対側の端を磁性体ビーズに接着し、張力・トルク独立制御型ピンセットを用いて、DNA を伸ばさせたまま磁性体ビーズを回転し DNA にねじれを加えた。図 1 (b) に示すように、DNA をねじると超らせん構造が形成され、DNA の末端間距離が変化する。このときに得られるねじれ曲線の傾きがねじれに対する変形の大きさを表すことから、DNA の変形の様子の違いがねじれ曲線の概形に現れる。本研究では、ArsIns 試料と Lambda 試料のねじれ曲線を取得し、DNA の局所的な配列の違いがマクロな変形に及ぼす影響を調べた。

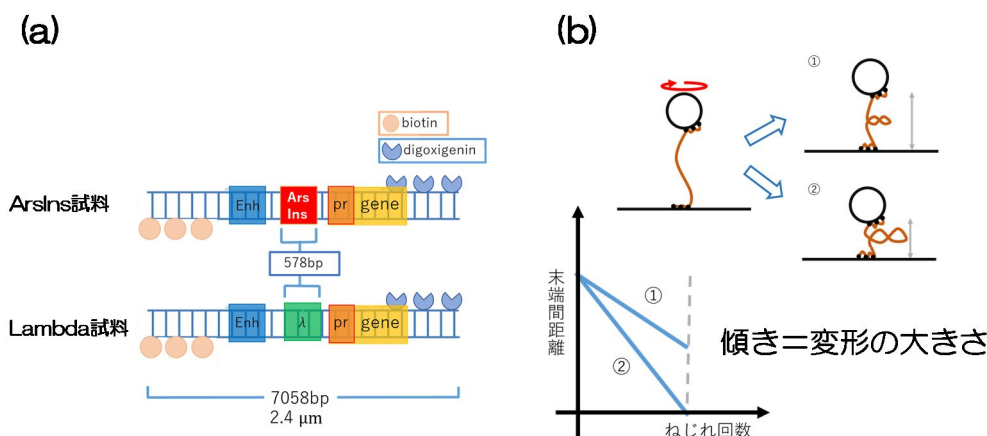


図 1 (a) 測定に用いた DNA 試料。(b) DNA のねじれ応答の様子。

(2) ArsIns のエンハンサー遮断活性

ルシフェラーゼ遺伝子上流にバフンウニ Ars 遺伝子のプロモーターとエンハンサーを融合させたレポーター遺伝子を作製し、このプロモーター/エンハンサー間に ArsIns を両方向に挿入した。ArsIns 挿入の際には、ArsIns の挿入方法を変えることにより、ArsIns の両側の塩基配列と方向が異なる 6 種類のレポーター遺伝子を作製した。これをパーティクルガン法でバフン

ウニ胚に導入してルシフェラーゼ活性を測定することにより、ArsIns のエンハンサー遮断活性を評価した。

(3) 基準振動解析による ArsIns・Lamda 両試料の動体解析

578 bp の ArsIns を配列中心に含む 2378 bp の線状 DNA のモデル(Ars モデル) および ArsIns を Lambda-DNA 上流 578 bp に置き換えた線状 DNA のモデル(Lamda モデル) を構築し、その動体の比較から ArsIns の動的特徴、特に柔軟性と機能性との関連を考察した。DNA の動体を解析するため、まずその配列依存的な基準構造のモデルを、配列依存的な塩基対間配向の *in vitro* 計測データと対を形成する塩基間配向の結晶構造解析のデータを参照しつつ、3 DNA(Lu XJ, Olson WK (2003)) を用いて構築した。そしてこの構造モデルに対し、近隣の原子間スケールの微小変形(*配列全体のスケールでは大きな変形が引き起こされる) の特徴を基準振動解析により評価することで、Ars モデルと Lamda モデルの動体の様相を比較し、ArsIns 自身の物性およびそれが周辺の動体に及ぼす影響を考察した。

4 . 研究成果

(1) ねじれ曲線に出現するピークと DNA の変形過程

DNA 試料を 1~10 Hz 程度の回転速度でねじると、ねじれ曲線に特徴的なピークが出現することが分かった。このピークはねじれに伴う超らせん構造の大きさに対応していると考えられる。ピークの大きさや出現頻度が回転速度に依存することから、ねじれに伴うマクロな変形過程がねじれ曲線に直接現れることが分かった。これらの成果を JPSJ 誌に発表した。

(2) 局所的な配列が DNA のマクロな変形に及ぼす影響

ArsIns 試料と Lambda 試料のねじれ曲線を取得した結果、ArsIns 試料のねじれ曲線が釣り鐘型の膨らんだ概形であるのに対し、Lambda 試料は急峻なピークを持つ尖った概形となることが分かり、2つの試料のねじれ曲線の概形に明確な違いが生じることが分かった。さらに、ArsIns 試料の場合、釣り鐘型の概形に加えて、Lambda 試料に見られた尖った概形も出現することが分かった。これらの結果は、「局所的な配列の違いにより、DNA のマクロな変形に違いが生じること」及び「ArsIns 配列がマクロな構造をスイッチさせる機能を持つ可能性があること」を示している。これらの成果については、現在論文投稿準備中である。

(3) ArsIns の周囲の配列がエンハンサー遮断活性に及ぼす影響

ArsIns の挿入方向と両側の塩基配列が異なる 6 種類のレポーター遺伝子を用いて ArsIns のエンハンサー遮断活性を評価したところ、ArsIns のエンハンサー遮断活性は挿入方向に依存しないことが明らかになった。しかし、ArsIns の周囲の塩基配列によってエンハンサー遮断活性の強さが異なることも明らかになった。これにより、ArsIns が周囲の領域を介して作用することが示唆された。

(4) 基準振動解析による ArsIns・Lamda 両試料の動体解析

Ars モデルと Lamda モデルの動体の様相を評価・比較した。その結果、Lamda モデルに比べ Ars モデルでは、配列中央 578 bp 部分およびその周辺領域において、二重らせん自身の伸縮や曲げの揺らぎが顕著に小さくなるが見出され、ArsIns による外部操作に対する周辺配列の力学的頑強性が示唆された。

(5) 高濃度 DNA 溶液の特異な粘弾性

生細胞内では DNA が高濃度で存在する環境において転写が行われる。DNA のねじれ応答を観測する際の実験系を利用することにより、密集した DNA が溶液の粘弾性に及ぼす影響を調べることが可能であることに気付き、上述の研究と並行して、高濃度 DNA 溶液中における微粒子の運動を観測した。その結果、「DNA の絡まり合いにより生じる弾性が微粒子の拡散を抑制すること」及び「溶液内に数ミクロン程度の力学的摂動を加えると単一の指数関数では表せない複雑な緩和が生じること」が分かった。これらの成果を AIP Advances 誌に発表し、Editor's pick に選出された。

(6) まとめ

本研究で得られた知見は、DNA の塩基配列が蛋白質の設計情報や結合情報だけでなく、DNA 自身のマクロな構造を調節するための情報を含んでいることを示唆する結果といえる。DNA の非コード領域に見られる反復配列は個により異なり、疾病の要因となる場合もある。局所的な配列の違いが表現型に及ぼす影響については、蛋白質の結合の有無だけでは説明できないことから、塩基配列に依存した DNA の力学特性に着目した研究が今後さらに加速するのではないかと考えられる。

また、近年、細胞内の粘弾性が細胞核の変形や腫瘍の形成に関係していることを示唆する結果

が相次いで報告されている。本研究で観測された高濃度 DNA 溶液に生じる特異な粘弾性は、細胞内の粘弾性を理解する上でも重要な知見となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Ohara, A., Fujii, M., Awazu, A.	4. 巻 89
2. 論文標題 Spontaneous Organizations of Diverse Network Structures in Coupled Logistic Maps with a Delayed Connection Change	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of the Physical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 114801 (1-11)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7566/JPSJ.89.114801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Fujii, S., Tago, T., Sakamoto, N., Yamamoto, T., Satoh, T., Satoh, A.K.	4. 巻 13(1)
2. 論文標題 Recycling endosomes associate with Golgi stacks in sea urchin embryos	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communicative & Integrative Biology	6. 最初と最後の頁 59-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/19420889.2020.1761069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 T. Kameda, M. M. Suzuki, A. Awazu, Y. Togashi	4. 巻 103
2. 論文標題 Structural dynamics of DNA depending on methylation pattern	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PHYSICAL REVIEW E	6. 最初と最後の頁 012404 (1-8)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1103/PhysRevE.103.012404	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Pieplow, A., Dastaw, M., Sakuma, T., Sakamoto, N., Yamamoto, T., Yajima, M., Oulhen, N., Wessel, G.M.	4. 巻 472
2. 論文標題 CRISPR-Cas9 editing of non-coding genomic loci as a means of controlling gene expression in the sea urchin	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 85-97
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ydbio.2021.01.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Takeru Kameda, Akinori Awazu, and Yuichi Togashi	4. 巻 6
2. 論文標題 Histone Tail Dynamics in Partially Disassembled Nucleosomes During Chromatin Remodeling	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 133, 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmolb.2019.00133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kazutaka Takao, Kazunori Takamiya, Da-Qiao Ding, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Hiraku Nishimori, and Akinori Awazu	4. 巻 88
2. 論文標題 Torsional Turning Motion of Chromosomes as an Accelerating Force to Align Homologous Chromosomes during Meiosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of the Physical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 023801 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7566/JPSJ.88.023801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Matsushima, Naoaki Sakamoto, and Akinori Awazu	4. 巻 123
2. 論文標題 Insulator Activities of Nucleosome-Excluding DNA Sequences without Bound Chromatin Looping Proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 1035-1043
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.8b10518	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Masaya Tanoguchi and Yoshihiro Murayama	4. 巻 8
2. 論文標題 Length dependence of viscoelasticity of entangled-DNA solution with and without external stress	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 AIP Advances	6. 最初と最後の頁 105218, 1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5048821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kotaro Yoshida, Daisuke Ando, Masahiro Makuta, and Yoshihiro Murayama	4. 巻 87
2. 論文標題 Dynamic Features of Plectoneme Formation of Twisted DNA at Low Force	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of the Physical Society of Japan	6. 最初と最後の頁 093801, 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7566/JPSJ.87.093801	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 柏崎今日子, 村山能宏
2. 発表標題 DNAねじれ応答の局所配列依存性
3. 学会等名 第19回関東ソフトマター研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本明典, 村山能宏
2. 発表標題 絡まり合ったDNA溶液における微粒子の緩和の変形サイズ依存性
3. 学会等名 日本物理学会2020年秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本明典, 村山能宏
2. 発表標題 局所変形後の絡まりあったDNA溶液中における微粒子の拡散と緩和過程
3. 学会等名 日本物理学会第75回年次大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮本明典, 村山能宏
2. 発表標題 局所変形に伴う絡まり合ったDNAのダイナミクス
3. 学会等名 第18回関東ソフトマター研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 柏崎今日子, 熊山翔太, 村山能宏
2. 発表標題 DNAねじれ変形の配列依存性の検出
3. 学会等名 第18回関東ソフトマター研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akinori Miyamoto and Yoshihiro Murayama
2. 発表標題 Relaxation process of entangled DNA solution after local deformation
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akinori Awazu
2. 発表標題 Insulator Activities of Nucleosome-Excluding DNA Sequences Without Chromatin Loop Form
3. 学会等名 The 57th Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊山翔太, 村山能宏
2. 発表標題 ねじれに依存したDNA超らせん構造の力学的安定性
3. 学会等名 日本物理学会第74回年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shota Kumayama and Yoshihiro Murayama
2. 発表標題 Mechanical stability of a single twisted DNA
3. 学会等名 The International Conference on APEF2018 -Advances in Physics of Emergent orders in Fluctuations- (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 熊山翔太, 村山能宏
2. 発表標題 DNA超らせん構造の力学的安定性
3. 学会等名 第17回関東ソフトマター研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 亀田 健, 富樫 祐一, 粟津 暁紀
2. 発表標題 過渡的に生じる中間体ヌクレオソームにおけるヒストンテール動態
3. 学会等名 第56会生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高尾 和孝, 西森 拓, 粟津 暁紀
2. 発表標題 核膜変形と核内流体を考慮した分裂酵母染色体動態の物理モデル
3. 学会等名 第56会生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松島 佑樹, 西森 拓, 坂本 尚昭, 粟津 暁紀
2. 発表標題 ヌクレオソーム排他的領域のインスレーター機能の解析
3. 学会等名 第56会生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松下 将也, 落合 博, 鈴木 賢一, 林 紗弥香, 杉山 文香, 山本 卓, 粟津 暁紀, 坂本 尚昭
2. 発表標題 Dynamic changes in the interchromosomal interaction of early histone gene loci during development of sea urchin
3. 学会等名 第56会生物物理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高山 雄揮, 伊藤 寛朗, 千田 久通, 西森 拓, 上野 勝, 粟津 暁紀
2. 発表標題 数理モデルとライブイメージングデータを用いた分裂酵母間期核内構造の解析
3. 学会等名 第56会生物物理学会
4. 発表年 2018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	坂本 尚昭 (Sakamoto Naoaki) (00332338)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・准教授 (15401)	
研究 分担者	粟津 暁紀 (Awazu Akinori) (00448234)	広島大学・統合生命科学研究科(理)・准教授 (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------