

平成21年 5月18日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19870003

研究課題名（和文）1分子解析法を用いたDNAポリメラーゼの機能解析

研究課題名（英文）The analysis of DNA polymerase activities by using the single molecule observation techniques.

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：1分子DNAおよびタンパク質の精密解析を行うために、蛍光顕微鏡視野内で反応を1分子レベルでの測定技術確立し、解析することを目的とし研究を実施した。

各種DNA合成酵素の単位時間当たりの合成速度計測を行った結果、Taq DNAポリメラーゼは800-900塩基/分、T7 DNAポリメラーゼは3000-3200塩基/分、DNAポリメラーゼIは1000-1100塩基/分、DNAポリメラーゼβは2000-2100塩基/分となった。また、DNA合成反応を観察するための1本鎖DNA領域の可視化に成功した。方法は、DNA複製因子AのDNA結合部位と黄色蛍光タンパク質の融合タンパク質を使用することにより1本鎖DNAを安定的に可視化することが可能となった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,360,000	0	1,360,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,710,000	405,000	3,115,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA、酵素、1分子解析、表面修飾、固定技術

## 1. 研究開始当初の背景

DNA複製・修復・組み換え反応に関与する

DNAポリメラーゼの生化学的機能解析研究は盛んに行われている。しかし、これまでの解

析法は数万分子以上の DNA やタンパク質を含む反応系で解析が行われていた。そのため、多数分子の平均的な挙動の解析しか行えず、酵素 1 分子の挙動解析を行うことは困難であった。例えば、生化学的解析で良く用いられる変性 15%ポリアクリルアミド/7M 尿素ゲルを用いた DNA 合成能の解析結果 (図 1) からは、DNA ポリメラーゼ 1 分子で DNA 合成した反応の結果 (反応 1) であるのか、DNA 合成過程で分子種の入れ替わりがおきた反応の結果 (反応 2) であるのか区別を付けることは困難であった (図 1)。

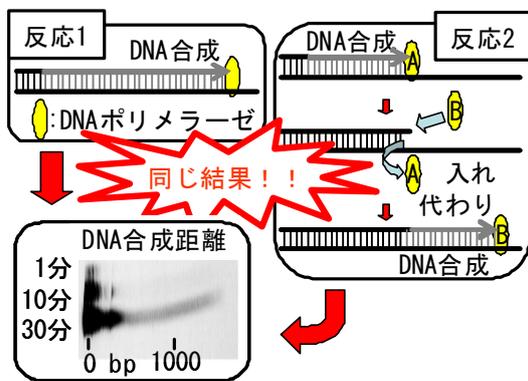


図 1 : 多分子解析の問題点

DNA ポリメラーゼは 10 数種類の存在が確認されているにもかかわらず、より具体的な機能分担は明確にはなっていない。しかし、DNA ポリメラーゼには組織局在性や DNA 損傷を乗り越える等の性質を示す分子種が存在することから明確な役割分担が存在すると考える。その点を明確にするために、DNA 合成反応の可視化を行い、DNA ポリメラーゼの挙動を 1 分子レベルで解析を行う。DNA ポリメラーゼの新知見を得るための 1 分子観察を行うには、観察対象になりうる DNA ポリメラーゼ分子・鋳型 DNA・基質 (dNTP) を蛍光標識する必要がある。そのために、蛍光標識物質の開発及び酵素への標識物質修飾法の開発も行う。また、従来の DNA 固定技術には、DNA 分子の基板表面への非特異的吸着や流れ

による鋳型 DNA の移動の問題が存在し、これが種々の酵素反応を阻害することが予想される。そのため、顕微鏡視野内において DNA を固定し DNA 鎖を適度な長さまで伸長させるための DNA 形態を制御する技術開発も行った。

## 2. 研究の目的

### (1) 蛍光の選択と標識法

酵素の蛍光標識の手法として、GFP、YFP、CFP 等の蛍光タンパク質と目的酵素の融合タンパク質を作成する手法が考えられた。そこで、得られた融合タンパク質が酵素活性を保持し、観察に適しているか調査した。また、融合タンパク質作成以外に、酵素のアミノ基、カルボキシル基、チオール基等と蛍光化合物を共有結合させる方法も併せて検討した。この方法は酵素を失活させる可能性あるため、活性部位を DNA などで保護して標識を行う必要があるが、その保護手法や反応時間について検討し、失活させない反応条件を探索した。

### (2) DNA ポリメラーゼの調製法

2-1 の方法を用いて、失活しない蛍光標識 DNA ポリメラーゼ種の大量調製法の確立を目指した。

### (3) 鋳型 DNA の片端固定化法

鋳型 DNA をガラス基板に結合させ固定化した。そして、観察に利用可能かどうかを明らかにした。結合方法として、アビジン-ビオチン法、ジクロロジメチルシラン法等を検討した。

### (4) 片端固定化 DNA の観察

従来の DNA 固定技術では DNA 分子の基板表面への非特異的吸着が問題であり、これが種々の酵素反応を阻害することが予想された。そのため、2-3 で作成した固定化 DNA を光ピンセット、電場、溶液の流れ等を用いて DNA 分子の形態制御法を確立させた。さらに、酵素反応に適した形態制御法を明らかにした。

### (5) DNA の 1 本鎖領域の蛍光観察

蛍光標識 DNA 複製因子 A と固定化 DNA を用いて 1 分子蛍光観察を行い、1 本鎖 DNA 領域の可視化し、観察を行った。

### (6) DNA ポリメラーゼによる合成反応観察

DNA ポリメラーゼにより、DNA の 1 本鎖 DNA 領域が 2 本鎖になる過程を 2 本鎖 DNA が染色可能な蛍光色素 YOYO-1 を用いた観察を行った。

### (7) DNA ポリメラーゼの 1 分子蛍光観察

2-4、5、6 で検討した蛍光標識酵素と固定化 DNA を用いて 1 分子蛍光観察を行い、酵素 1 分子の DNA 合成速度の測定や酵素の多分子との入れ替わり等の挙動を明らかにすることを旨とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 蛍光の選択と標識法

GFP、CFP、YFP 等の蛍光タンパク質を用いて、蛍光タンパク質融合 DNA ポリメラーゼ及び蛍光タンパク質融合 DNA 複製因子 A (RPA) を調製し、これらの蛍光タンパク質を用いて観察を行うための条件検討を行った。この時に、蛍光タンパク質による蛍光強度不足や酵素の失活等の問題が出てくる可能性があるため、その対策として、蛍光タンパク質と融合させていない酵素を調製した後、蛍光化合物と酵素のもつアミノ基、カルボキシル基、チオール基等と共有結合法させる方法の検討も併せて行った。この方法は、活性中心の

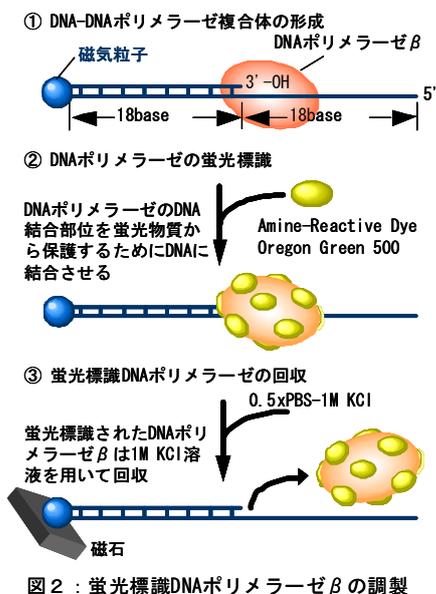


図 2 : 蛍光標識DNAポリメラーゼβの調製

アミノ酸側鎖が修飾されたり、タンパク質の立体構造が変化してしまうと活性が失われる可能性が高いため、活性中心の保護方法や使用する蛍光化合物量、共有結合させる反応時間等の細かな反応条件の検討を行った (図 2)。

### (2) DNA ポリメラーゼの調製法

DNA ポリメラーゼ β、λ の大腸菌大量発現系を確立した。また、TaqDNA ポリメラーゼ、T7 DNA ポリメラーゼ、DNA ポリメラーゼ I については、試薬メーカーから購入した。

### (3) 鋳型 DNA の片端固定化法

ガラス基板表面の非特異的吸着を抑制させる方法を用いて鋳型 DNA を結合させる方法を確立した。方法としては、直接ガラス基板に結合させる方法と、アビジン-ビオチン結合を利用する方法を検討したが、非特異的吸着が少なく DNA の形態制御が容易な手法を 1 分子観察に有効なのは、直接ガラス基板に結合させる方法であり、ガラス基板をチオール修飾することにより表面を疎水性に改質し、チオール化した DNA とジスルフィド結合 (-S-S-) を介して固定する方法であった。

### (4) 片端固定化 DNA の観察

1 本鎖 DNA は非常に壊れやすいため、ガラス基板に片端固定化した鋳型 DNA が DNA ポリメラーゼの鋳型として使用可能かどうか観察を行った。この観察には、1 本鎖 DNA に特異的に結合する蛍光標識 DNA 複製因子 A を用いた。蛍光 RPA を用いて DNA ポリメラーゼが DNA 合成反応を行うための鋳型となる 1 本鎖 DNA 領域に結合させ、鋳型 DNA の状態を調べる。DNA の状態を調べるために、磁気ビーズを結合させた鋳型 DNA を用いた光ピンセット

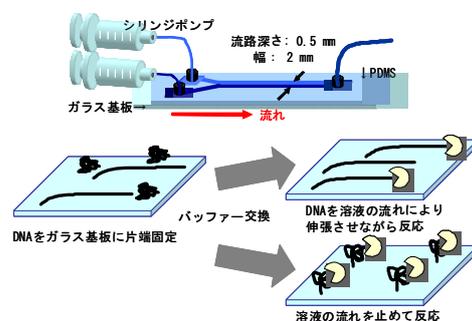


図 3 : シリンジポンプを用いた流路システム

操作、電界、溶液の流れ（図3）を用いてDNAを壊さずに酵素反応を観察できるDNAの形態制御しながら蛍光RPAを結合させ、鋳型DNAと蛍光RPAの結合を観察した。

(5) DNAポリメラーゼの1分子蛍光観察による解析

前年度に引き続き、DNAポリメラーゼβ、λ、T7 DNAポリメラーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、DNAポリメラーゼIをモデル系にして確立させたDNA合成反応の1分子観察法を用いながら、調製可能になった他分子種のDNAポリメラーゼの挙動を解析した。

(6) DNAポリメラーゼβ、λの観察

調製可能なDNAポリメラーゼβ、λをモデル系にしてDNA合成反応の1分子観察系の確立を試みた。

#### 4. 研究成果

(1) 蛍光の選択と標識法

酵素の蛍光標識法は、DNA複製因子Aに関してはYFPタンパク質との融合タンパク質、DNAポリメラーゼについては、蛍光化合物と酵素のもつアミノ基、カルボキシル基、チオール基等と共有結合法させる方法を用いることにより成功した。YFPタンパク質との融合タンパク質の設計図を図4に示す。そのYFP-RPAの精製結果と精製タンパク質を用いた環状1本鎖M13mp18 DNAとのDNA結合活性結果を図5に示す。これらの結果から、YFP-RPAは1本鎖DNA結合活性を保持していることを確認した。

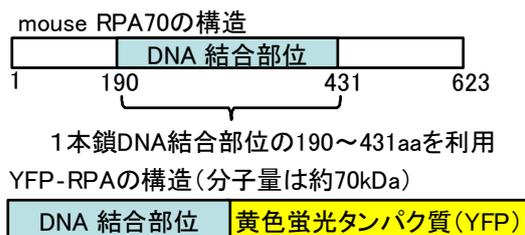


図4: 蛍光DNA複製因子Aの構造

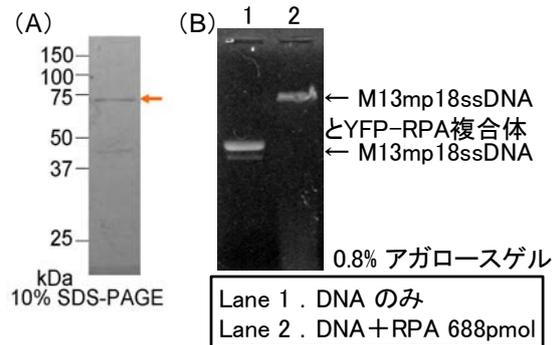


図5: YFP-RPAの精製結果(A)と精製YFP-RPAを用いたゲルシフトアッセイ(B)

(2) 片端固定化DNAの観察

長いDNAは非常に壊れやすいため、ガラス基板に片端固定化した鋳型DNAがDNAポリメラーゼの鋳型として使用可能かどうか観察を行った。この観察には、λDNAとYOYO-1をもちいてマイクロ流路を用いて実験を行った。DNAの片端固定は、ガラス基板表面をチオール化により表面を疎水性に改質し、チオール化したλDNAとジスルフィド結合(-S-S-)を介して固定化することにより、流れにより形態制御に成功した(図6)。

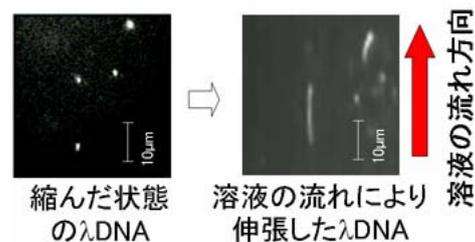


図6: 流れによるDNAの形態制御

(3) DNAの1本鎖領域の可視化

(1)で調製したYFP-RPAを用いて、1本鎖DNA領域の可視化を試みた。使用したDNAは完全に1本鎖化したλDNA(図7)を作成した。このDNAとYFP-RPAを反応させることによりDNAの1本鎖DNA領域の可視化に成功し

た。

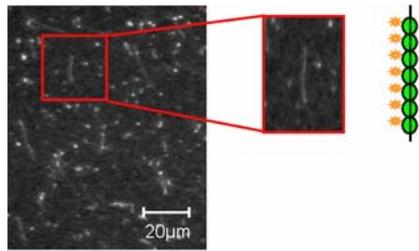


図7:完全に1本鎖化したλ DNAのYFP-RPAによる可視化

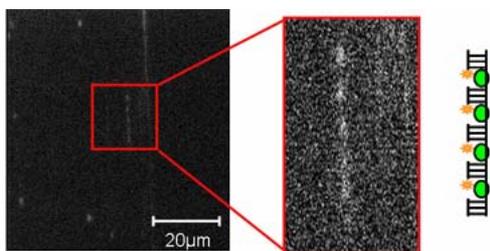


図8:梯子状λ DNAのYFP-RPAによる可視化

#### (4) 各種 DNA ポリメラーゼの反応産物の1分子解析

調製、入手可能であった代表的な各種 DNA ポリメラーゼを用いて解析を行った。使用した DNA ポリメラーゼは、Taq DNA ポリメラーゼ (図 9)、DNA ポリメラーゼ  $\beta$  (図 10)、T7 DNA ポリメラーゼ (図 11)、DNA ポリメラーゼ I (図 12) を使用した。

結果、Taq DNA ポリメラーゼは 800-900 base/min、DNA ポリメラーゼ  $\beta$  は 2000-2100 base/min、DNA ポリメラーゼ I は 1000-1100 base/min、T7 DNA ポリメラーゼは 3000-3200 base/min の合成速度であることが判明した。

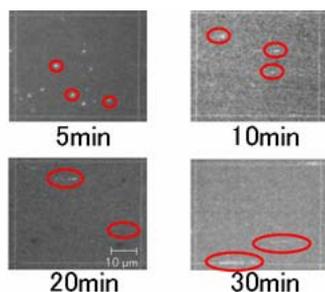


図9:Taq DNAポリメラーゼによる合成反応結果

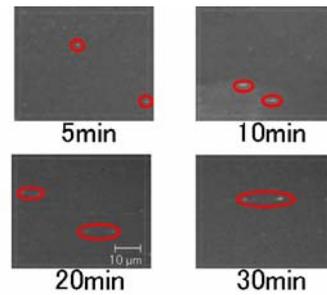


図10:DNAポリメラーゼ $\beta$ による合成反応結果

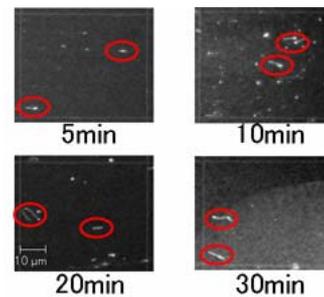


図11:T7 DNAポリメラーゼによる合成反応結果

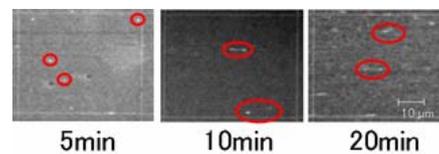


図12:DNAポリメラーゼIによる合成反応結果

(5) DNA ポリメラーゼの1分子解析  
図 1 の解析を行うための条件検討を行っているところである。

#### 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)

①Oshige, M., Katsumata, M., Iwasaki, D., Yamazaki, K., Katsura, S. (1 番目)

Development of nanoparticle array method by using DNA sequence recognition peptide. Kobunshi ronbunshu, 65(7), 493-495, 2008, 査読有

〔学会発表〕（計4件）

①山口晃史、高野宏樹、大重真彦、栗田弘史、坂口謙吾、水野彰、桂進司（標題）1分子観察法を用いたDNA合成反応解析の試み、BMB2008（第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会）、2008.12.11、兵庫県

②高野宏樹、山口晃史、栗田弘史、大重真彦、水野武、坂口謙吾、水野彰、桂進司（標題）蛍光Replication Protein Aを用いた1本鎖DNAの可視化、BMB2008（第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会）、2008.12.11、兵庫県

③中田雅基、湯本和宏、大重真彦、桂進司（標題）転写型タンパク質アレイ作成のための高密度DNAアレイ作成技術の検討、BMB2008（第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会）、2008.12.10、兵庫県

④赤澤祐介、山崎圭樹、大重真彦、桂進司（標題）タンパク質のリフォールディングを目指したエマルジョン調製法、化学工学会第40回秋季大会、2008.9.24、宮城県

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

①名称：核酸固定化担体およびその利用

発明者：桂進司、大重真彦

権利者：国立大学法人群馬大学

種類、番号：特願2009-114614

出願年月日：2009年5月11日

国内外の別：国内

②名称：タンパク質固定化用担体およびその

利用

発明者：桂進司、大重真彦

権利者：国立大学法人群馬大学

種類、番号：特願2008-275763

出願年月日：2008年10月28日

国内外の別：国内

## 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