

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：12301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25650002

研究課題名(和文) DNA 1分子レベルでの形態制御技術を用いたDNA複製反応制御機構の解析

研究課題名(英文) Study of regulation of DNA replication by controlling superhelicities of single DNA molecules

研究代表者

桂 進司 (Shinji, Katsura)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：10260598

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：Simian Virus 40 (SV40)の複製起点を組み込んだ DNAを対象として、磁気ピンセットを用いて負の超らせんを導入し、負の超らせんが局所的なDNA一本鎖領域形成に与える影響を解析した。さらにSV40複製開始タンパク質であるSV40ラージT抗原(SV40TA g)を実験系に加えて、SV40Tagによる複製開始反応に負の超らせんが与える影響についても評価した。

その結果、SV40TA g非存在下でも負の超らせん導入によりSV40複製起点近傍に一本鎖領域が形成されること、SV40TA gを添加すると、負の超らせん導入による一本鎖領域形成頻度およびその長さがさらに増加することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We developed an apparatus based on magnetic tweezers to introduce supercoil on a single DNA molecule, and studied the effects of negative superhelicities on the local DNA denaturation in DNA containing the SV40 origin of DNA replication. Furthermore, we also studied the effects of superhelicities on the local denaturation in the presence of SV40 Large T antigen (SV40TA g), which is an initiation protein of SV40 DNA replication. Even in the absence of SV40TA g, the local denaturation of SV40ori- DNA under a negative supercoil state was observed around the replication origin and the probability of occurrence of the local denaturation increased with negative superhelicity. Furthermore, addition of SV40TA g enhanced the probability of occurrence of the local denaturation and extended the single-stranded region under higher negative superhelicities.

研究分野：1分子生物学

キーワード：1分子観察 DNA 2次構造 超らせん マグネチックツィーザー 磁気ピンセット 微細流路 一本鎖DNA

1. 研究開始当初の背景

DNAの負の超らせんはバブル構造、十字構造、Z型DNAなどの非B型構造を導入することが知られており、転写、DNA複製などのDNA代謝反応に関与することが示唆されていた。このようなDNA代謝反応の中で、転写制御に関しては超らせんの影響があることが実験的に示されており(Hirose, S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol.85,718-722 (1988)),多くの遺伝子で負の超らせんにより転写が活性化することが示されている。ここで、DNA複製に着目すると、真核細胞複製のモデル系であるHeLa細胞の粗抽出液を用いたSV40(Simian Virus 40)DNA in vitro複製系では、環状DNAを鋳型とした場合より直鎖状DNAを鋳型として用いた場合の方が低いDNA合成量を示し、直鎖状DNAの複製の抑制には2つ以上の因子が関与していることが示されている(Katsura, S. et al., Cell Struct. & Func., vol. 17 (1), pp. 19-32, 1993)。直鎖状のDNAには超らせんを導入することができないために、環状DNAと直鎖状DNAとの鋳型活性の違いは超らせん歪の有無の違いで説明できると考えられる。しかし、DNA複製反応は動的に超らせん状態を制御しながら反応が進むために、転写制御解析のように超らせんを導入した鋳型DNAを用いた超らせんの影響の解析は不可能である。また、超らせんを導入するのに必要なエネルギーは比較的小さく、常温の熱擾乱による熱エネルギーの揺らぎ程度でDNAの超らせんが導入される。そのため、常温で反応しているDNAでは、局所的には様々な密度の超らせんが導入されている状態であると推定される。このような状況の下でDNA集団の鋳型活性を測定しても、超らせんとは無関係に複製反応が開始されている)のか、熱擾乱により偶然、超らせんの閾値を超えたDNA分子のみが複製反応が開始されているのかを識別することは困難であった。

2. 研究の目的

DNAの超らせんをはじめとするDNAの高次構造は、転写制御への影響があることが実験的に示されていることから、DNA複製反応をはじめとするDNA代謝反応にも密接に関与していることが推定できる。しかし、複製反応はDNAトポイソメラーゼにより動的に超らせん状態を制御しながら進行する反応であるために、超らせんを導入した鋳型DNAを用いてもDNA複製反応中に超らせん状態は失われてしまうことになる。そのため、超らせん状態が維持されているDNA複製反応の初期段階でしか解析は行えず、超らせん状態がDNA代謝反応に与える影響は極めて限られた知見しかないのが現状である。本研究計画はこの問題を解決するために、1分子レベルでDNAの超らせん状態を常時制御し、超らせん状態がDNA複製

反応に与える影響を解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 微細流路の作製および解析対象のDNAの固定化

熱硬化性高分子であるPolydimethylsiloxane (PDMS)で作製した微細流路装置を用いて、図1に示す微細流路を作製した。

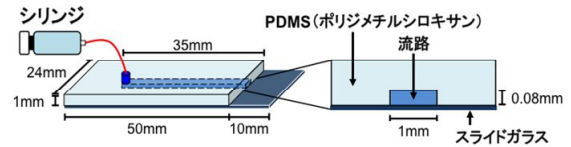


図1 微細流路の構造

この微細流路のスライドガラス表面をアビジンで修飾し、さらにブロッキングした後、解析対象であるビオチン化λDNAまたはSV40の複製起点をファージにクローニングしたビオチン化SV40ori-λDNAを微細流路に導入することにより、アビジン-ビオチン結合により流路底面にこれらのDNAを固定化した。また、これらのDNA分子の他の末端をDigoxigenin (DIG)で標識することにより磁気ビーズと結合させ、磁気ピンセットにより超らせんを導入することを可能にした。

(2) DNA1本鎖領域の可視化法

Replication protein A (RPA)の70kDaサブユニットの1本鎖DNA (ssDNA)結合ドメインとYellow Fluorescent Protein (YFP)の融合タンパク質 (RPA-YFP)を用いて、1本鎖領域を修飾し、その位置を蛍光顕微鏡により観察した。その後、2本鎖DNA領域をインターカラー型蛍光色素 (YOYO-1)で標識することにより、DNA分子の機械的な切断が生じていないことを確認した。

(3) 磁気ピンセットの作製

マイクロコンピュータArduino-Unoを用いて、ネオジム磁石付プーリーの回転数、回転方向、回転速度をステッピングモーターにより制御するシステムを開発した。このシステムにより、流路上方に設置した磁気プーリーを回転させ、磁気ビーズを結合させた固定化DNA分子を回転させた。なお、図2に示すように、規定の超らせんを導入した後に、上部の磁気プーリーを取り除き、他の磁石を側方

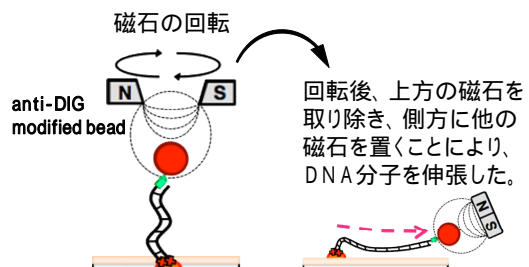


図2 超らせん導入方法

に設置することにより DNA 分子を観察可能な形態で伸張した。

4. 研究成果

(1) 負の超らせん導入による 1 本鎖領域形成

DNA を対象に負の超らせんを導入したところ、強い負の超らせんにより誘導されることにより 1 本鎖領域が誘導され、その領域は DNA の複製起点と一致することが明らかになった (図 3)。また、この 1 本鎖領域の出現確率は、負の超らせんの導入に従って、上昇することも明らかになった (図 4)。

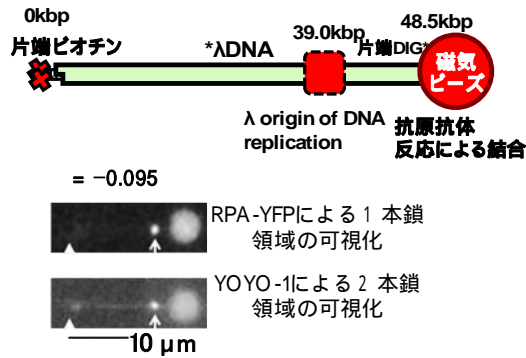


図 3 負の超らせん導入による DNA 上の 1 本鎖領域形成

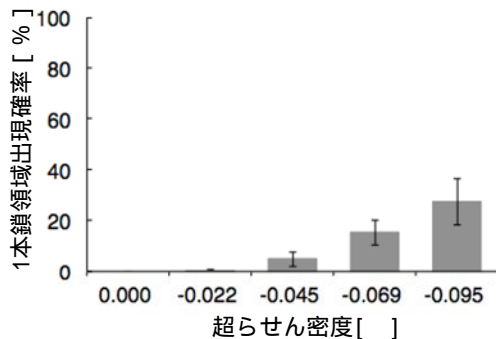


図 4 DNA における超らせん密度と 1 本鎖領域出現確率の相関

また、SV40 の複製起点がクローニングされている SV40ori-λDNA を対象に負の超らせんを導入したところ、SV40 の複製起点近傍に 1 本鎖領域が形成されることが明らかになった (図 5)。このとき、DNA の複製起点の位置に 1 本鎖 DNA が形成されないのは、SV40 複製起点近傍の構造変動により負の超らせんが弛緩されてしまい、DNA の複製起点の 1 本鎖領域を形成するのに必要な超らせん歪みに達しなかったためと考えられる。SV40ori-λDNA においても、負の超らせんの導入に従って、この 1 本鎖領域の出現確率は上昇した (図 6)。

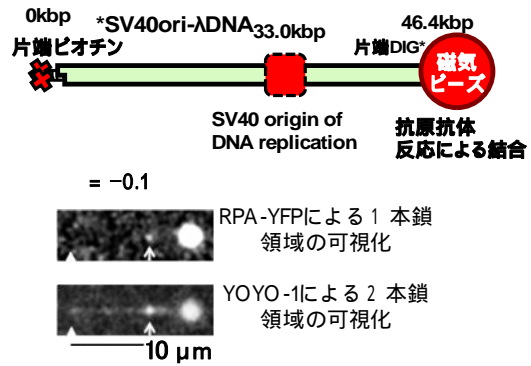


図 5 負の超らせん導入による SV40ori-λDNA 上の 1 本鎖領域形成

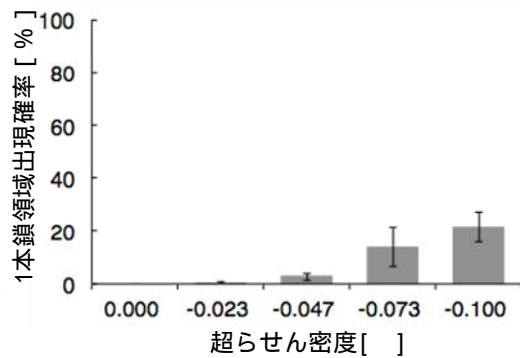


図 6 SV40ori-λDNA における超らせん密度と 1 本鎖領域出現確率の相関

(2) 負の超らせん導入が複製開始反応に与える影響の解析

対象となる DNA 分子を微細流路に固定化した後に、SV40 の複製反応の開始および複製フォークの進行に与える SV40TA g を実験系に加えることにより、負の超らせん導入が複製開始反応に与える影響を解析した。

その結果、負の超らせんが導入により複製起点近傍の巻き戻し (Unwinding) が促進され、1 本鎖領域が高頻度で出現すること (図 7) また TA g 添加時にも負の超らせんが導入に従って巻き戻し反応の観測頻度は増加すること (図 8) また超らせん密度 -0.02 から -0.04 に負の超らせん密度が上昇すると形成された 1 本鎖領域の長さが有意に増加すること (図 9) が明らかになった。このことは、SV40 の複製反応の初期過程において、負の超らせん導入が TA g と協調して、複製反応を促進していることを示しており、ゲノム DNA の複製開始反応制御についても超らせん構造が関与していることを強く示唆している。

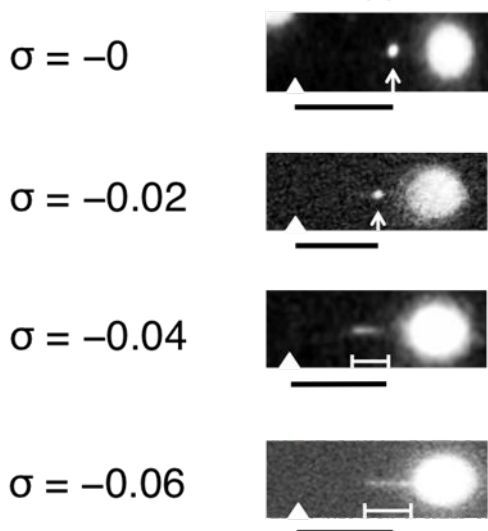
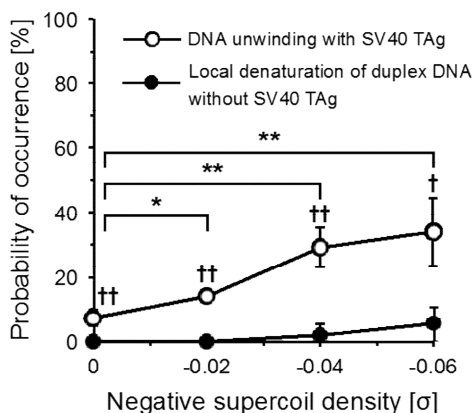


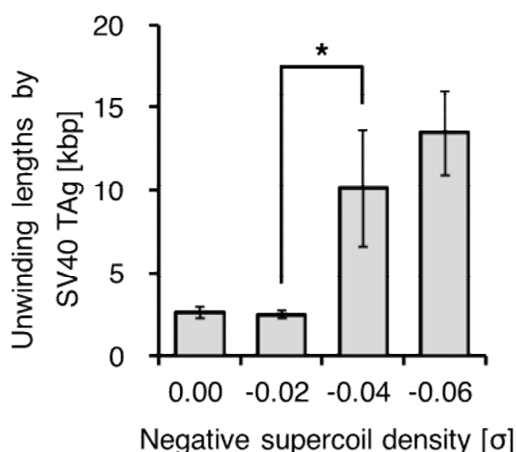
図7 様々な超らせん導入下における TA g による巻き戻し反応の可視化



† $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ vs. supercoil densities without SV40 TA g

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. supercoil density of zero

図8 TA g による巻き戻し反応の観測頻度



* $p < 0.05$, a significant difference

図9 TA g による巻き戻しにより誘導された1本鎖領域の長さ

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4件)

Takahashi, S., Motooka, S., Usui, T., Kawasaki, S., Miyata, H., Kurita, H., Mizuno, T., Matsuura, S.-I., Mizuno, A., Oshige, M., Katsura, S. Direct Single-Molecule Observations of Local Denaturation of a DNA Double Helix under a Negative Supercoil State., Analytical Chemistry, American Chemical Society, 査読あり, vol. 87, pp. 3490-3497, 2015
DOI: 10.1021/acs.analchem.5b00044

Takahashi, S., Usui, T., Kawasaki, S., Miyata, H., Kurita, H., Matsuura, S.-I., Mizuno, A., Oshige, M., Katsura, S. Real-time Single-Molecule Observations of T7 Exonuclease Activity in a Microflow Channel., Analytical Biochemistry, 査読あり, Elsevier, vol. 457, pp. 24-30, 2014
DOI:10.1016/j.ab.2014.04.012

Takahashi, S., Kawasaki, S., Miyata, H., Kurita, H., Mizuno, T., Matsuura, S.-I., Mizuno, A., Oshige, M., Katsura, S. A New Direct Single-Molecule Observation Method for DNA Synthesis Reaction using Fluorescent Replication Protein A., Sensors, 査読あり, Molecular Diversity Preservation International (MDPI), vol. 14, pp. 5174-5182, 2014
DOI:10.3390/s140305174

Takahashi, S., Kawasaki, S., Yamaguchi, K., Miyata, H., Kurita, H., Mizuno, T., Matsuura, S.-I., Mizuno, A., Oshige, M., Katsura, S. Direct Observation of Fluorescently Labeled Single-stranded λ DNA Molecules in a Micro-Flow Channel., Journal of Fluorescence, Springer US, 査読あり, vol. 23, pp. 635-640, 2013
DOI: 10.1007_s10895-013-1210-1

〔学会発表〕(計14件)

Takahashi, S., Kawasaki, S., Kurita, H., Mizuno, T., Matsuura, S.-I., Mizuno, A., Oshige, M., Katsura, S. Direct Single-Molecule Observations of DNA Synthesis and Digestion Reactions. The 11th International Workshop on Radiation Effects on Semiconductor Devices for Space Applications (RASEDA) & the 7th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (AMDE), Poster presentation, P8-39, Kiryu City Performing Arts Center (Kiryu, Gunma, Japan), November 11-13, 2015.

Takahashi, S., Usui, T., Kawasaki, S., Miyata, H., Kurita, H., Matsuura, S.-I.,

Mizuno, A., Oshige, M., Katsura, S. Real-time Single-Molecule Observations of T7 Exonuclease Activity in a Microflow Channel. The 1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation and the 6th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (GUMI & AMDE 2014), Poster presentation, P041, Kiryu City Performing Arts Center (Kiryu, Gunma, Japan), December 5, 2014.

Takahashi, S., Kawasaki, S., Yamaguchi, K., Miyata, H., Kurita, H., Mizuno, T., Matsuura, S.-I., Mizuno, A., Oshige, M., Katsura, S. Direct Observation of Fluorescently Labeled Single-stranded λ DNA Molecules in a Micro-Flow Channel. The 5th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (AMDE), Poster presentation, P23, Kiryu City Performing Arts Center (Kiryu, Gunma, Japan), December 19, 2013.

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)、ポスター発表、1P0643、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)、2015 年 12 月 1 日

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)、ポスター発表、1P0644、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)、2015 年 12 月 1 日

高橋俊介、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 および DNA 代謝酵素の 1 分子蛍光観察による動態解析、化学工学会群馬大会 2015、口頭発表、E 111、桐生市市民文化会館 (群馬県桐生市)、2015 年 11 月 27 日

高橋俊介、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、負の超らせん状態での SV40 ラージ T 抗原による DNA 解鎖の 1 分子観察、第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、ポスター発表、P-34、焼津グランドホテル(静岡県焼津市)、2015 年 10 月 19-21 日

高橋俊介、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、負の超らせんによる二重らせん DNA の局所的な開裂の 1 分子観察、第 23

回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、ポスター発表、焼津グランドホテル(静岡県焼津市)、2015 年 10 月 19-21 日
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、負の超らせん DNA による二重らせんの局所的な開裂の 1 分子観察、2015 年度生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー、ポスター発表、P-07、タナベ名古屋研修センター(愛知県北名古屋市)、2015 年 7 月 11-12 日
高橋俊介、本岡伸也、川崎祥平、宮田英史、栗田弘史、水野武、松浦俊一、水野彰、大重真彦、桂進司、負の超らせん導入による二重らせんの局所的な開裂の 1 分子直接観測、第 37 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2P-0152、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2014 年 11 月 26 日

高橋俊介、碓井智弘、川崎祥平、宮田英史、栗田弘史、松浦俊一、水野彰、大重真彦、桂進司、微細流路中での T7 Exonuclease 活性のリアルタイム 1 分子観測、第 37 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2P-0150、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)、2014 年 11 月 26 日

高橋俊介、川崎祥平、宮田英史、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 A を用いた 1 本鎖 DNA 標識による DNA 合成反応のリアルタイム 1 分子観察、2014 年度生物工学若手研究者の集い(若手会)夏のセミナー、ポスター発表、P-19、神戸セミナーハウス(兵庫県神戸市)、2014 年 7 月 12 日

高橋俊介、川崎祥平、宮田英史、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 A を用いた 1 本鎖 DNA 標識による DNA 合成反応のリアルタイム 1 分子観察、第 36 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、1P-1037、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)、2013 年 12 月 3 日

高橋俊介、川崎祥平、山口晃史、宮田英史、栗田弘史、水野武、松浦俊一、水野彰、大重真彦、桂進司、微細流路中での 1 本鎖 DNA 認識ペプチドを用いた 1 本鎖 DNA の直接観察法、第 35 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、1P-0695、福岡ドーム(福岡県福岡市)、2012 年 12 月 11 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

桂 進司 (KATSURA, Shinji)
群馬大学・大学院理工学府・教授
研究者番号: 10260598

(2)研究分担者

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