

# 学位論文の要旨

## 1 分子観察による DNA 代謝酵素の動態解析と DNA 複製開始に与える超らせん構造の影響

氏名 高橋 俊介 印

これまで多くの生化学的な研究により、DNA に作用するタンパク質群が網羅され、これらのタンパク質-タンパク質間相互作用を中心とするタンパク質機能解析が盛んに行われている。これらの研究の多くは DNA 代謝反応産物をゲル電気泳動法により解析されたものであり、この解析では数百万以上の DNA やタンパク質が含まれているため、多分子の平均的な挙動の情報しか得ることができない。また、試験管内実験では DNA 代謝反応の中間過程が覆い隠されてしまうため、DNA 代謝反応の実態は不明な部分が多い。

上記の問題を解決するためには、個々の DNA やタンパク質の生体高分子を捉えることが可能な 1 分子解析が有効である。そこで、本研究では 1 分子レベルの蛍光観察により DNA 及び DNA 代謝酵素の動態解析を行うために、微細流路装置、蛍光顕微鏡装置を用いることにより DNA 1 分子の形態を制御し、DNA 及びタンパク質を蛍光標識した。DNA の 1 本鎖領域は DNA 複製をはじめとする DNA 代謝反応の中間過程に生じており、その反応過程を捉えるためには、1 本鎖 DNA (ssDNA) を可視化する必要がある。しかし、YOYO-1 や SYTOX Orange などのインターカレーター型蛍光色素は DNA の 2 本鎖領域を染色できるが、1 本鎖領域は染色できない。そこで、本研究では ssDNA 結合能を持つ Replication Protein A (RPA) の 70-kDa サブユニットと黄色蛍光タンパク質 (YFP) との融合タンパク質である蛍光 ssDNA 結合タンパク質 (RPA-YFP) と組換えタンパク質 RecA の ssDNA に結合可能なペプチドに化学的に蛍光化合物を修飾した蛍光 ssDNA 結合ペプチド (ssBP-488) を用いて、ssDNA 1 分子の動的挙動を捉えることに成功し、ssDNA への RPA-YFP の結合の親和性は ssBP-488 の結合の親和性よりも弱いことを明らかにした。本研究は、RPA-YFP や ssBP-488 を用いることにより、DNA 二次構造の変化の過程や DNA 代謝反応の中間過程にて生じる ssDNA 領域を可視化するためのベースとなる結果となった。

次に、私は RPA-YFP による ssDNA の可視化技術を適用することで、鋳型 DNA 1 分子の ssDNA 領域を合成する DNA 合成酵素クレノウ断片 (3'-5'Exo-) の進行過程を捉え、DNA 合成反応を 1 分子レベルにて解析した。実験の結果、DNA 合成反応の間、DNA 合成酵素の進行に伴い ssDNA 領域から RPA-YFP が解離すること、鋳型 DNA の形態を伸張状態とランダムコイル状態に制御したときの DNA 合成酵素による DNA 合成反応の速度が 91 塩基/秒 (伸張状態) と 52 塩基/秒 (ランダムコイル状態) であること、DNA の形態が

DNA 合成反応の速度に影響を与えることを明らかにした。

さらに、本研究は DNA 複製や修復に重要な役割を果たす DNA 分解酵素 T7 Exonuclease (T7 Exo) を用いて、T7 Exo による DNA 分解反応を 1 分子レベルにて直接観察した。実験の結果、T7 Exo による DNA 分解反応の過程は DNA 1 分子の dsDNA 領域と ssDNA 領域と染め分けながら直接観察することにより捉えることができること、T7 Exo 1 分子が DNA 1 分子に結合することによって分解し、さらに、T7 Exo が解離する T7 Exo の挙動を捉えることができること、これらの DNA 分解反応の速度と processivity を決定することに成功し、それらは 5.5 塩基/秒、5882 塩基であることを明らかにした。

これまでに述べてきた私の研究では DNA の形態を伸張状態やランダムコイル状態に制御することにより、DNA の全長鎖をもとに DNA 代謝反応を解析してきた。しかし、細胞核内の染色体 DNA は周期的に核マトリクスに固定されており、超らせんをはじめとする高次構造が形成されている。染色体 DNA の性質を反映させた細胞核内環境に近接した実験系を構築するためには直鎖状 DNA に超らせんを導入させる必要がある。そこで、本研究では微細流路装置、磁気ピンセット装置、蛍光顕微鏡装置の組合せである 1 分子蛍光観察装置を用いて、直鎖状 DNA 1 分子の操作することによって指定した密度の超らせんを導入した DNA を直接観察することが可能な実験系を構築した。実験の結果、負の超らせんは DNA 二重らせんの局所的な開裂を優位に誘導させ、その位置が DNA 複製起点の A+T-rich 領域であること、超らせん密度の増加に伴い局所的な開裂の発生頻度が上昇すること、局所的な開裂が DNA 複製反応の開始の制御に影響を与える可能性があることを明らかにした。

さらに負の超らせんが DNA 複製反応の開始にどのような影響を与えるのかを検証するために、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、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 SV40 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 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ことを強く示唆している。

多分子解析では多分子の挙動の平均値の情報しか得ることができないため、DNA 及び DNA 代謝酵素 1 分子の動態解析や DNA 1 分子の超らせん密度を制御することが事実上、極めて困難である。一方、本研究の 1 分子解析では、DNA 1 分子の形態制御と蛍光観察することによって、DNA 二重らせん構造の変化の過程や DNA 代謝反応の素反応である DNA 合成反応、DNA 分解反応、DNA 鎖巻き戻し反応の中間過程など捉えることができたため、生化学・分子生物学分野の新知見を獲得するための解析ツールとして今後更なる発展に期待できると考えている。

# **Dynamic analyses of DNA metabolic enzymes and effects of DNA supercoiling on the initiation of DNA replication by single-molecule observations**

## **Abstract**

This doctoral thesis entitled as “Dynamic analyses of DNA metabolic enzymes and effects of DNA supercoiling on the initiation of DNA replication by single-molecule observations” described mainly two subjects. One is direct single-molecule observations of dynamic characteristics for DNA and DNA metabolic enzymes. The other is effects of negative supercoiling on the regulation of the initiation of DNA replication. Several millions of molecules have been subjected to conventional biochemistry and molecular biology analytical methods such as agarose gel electrophoresis and two-dimensional gel electrophoresis. The results obtained are averages for a large number of molecules. However, the actual behaviors of individual biomolecules and the elementary processes of DNA metabolic reactions, such as binding and dissociation rates of DNA metabolic enzymes, have not been adequately elucidated using their analytical methods. Such problems can be solved by visualizing the actual behaviors of individual biomolecules and the elementary processes of DNA metabolic reactions in single-molecule level. Thus, this studies have carried out by direct observations for the reaction processes of a DNA synthesis and DNA digestion, and an initiation of DNA replication under a negative supercoil state of DNA.

In this study of chapter 3, I developed two labeling methods for the direct observation of single-stranded DNA (ssDNA), using a ssDNA binding protein and a ssDNA recognition peptide. The first approach involved a protein fusion between the 70-kDa ssDNA-binding domain of replication protein A and enhanced yellow fluorescent protein (RPA-YFP). The second method used the ssDNA binding peptide of *Escherichia coli* RecA labeled with Atto488 (ssBP-488). The labeled single ssDNA molecules with RPA-YFP and ssBP-488 were visualized over time in microflow channels, and furthermore, the RPA-YFP-ssDNA complexes were much more flexible than the rigid ssBP-488-ssDNA complexes. These results characterize the two labeling methods by observing the dynamic behaviors of single ssDNA molecules in microflow channels.

In this study of chapter 4, I directly observed a DNA synthesis reaction as a template single ssDNA labeled with RPA-YFP under a stretched and a random coiled states via buffer flow in microflow channels, and applied to analysis of DNA synthesis reaction by the Klenow Fragment (3'-5' exo-). Because the Klenow Fragment (3'-5' exo-) lacks both 5'-3' and 3'-5' exonuclease activities, DNA digestions due to the exonuclease activities of the DNA polymerase was negligible. The obtained results successfully visualized the DNA synthesis reactions under a stretched and a random coiled states, and their rates were estimated to be 91 bases/sec and 52 bases/sec. In addition,

the DNA synthesis reaction rate under the stretched state was approximately 75% higher than that under random coiled state. The DNA synthesis reaction of the Klenow fragment (3'-5'exo-) was promoted by DNA stretching with buffer flow.

In this study of chapter 5, I directly observed T7 Exonuclease (T7 Exo) DNA digestion reactions by staining double-stranded DNA (dsDNA) regions with SYTOX Orange and staining ssDNA regions with ssBP-488. Furthermore, DNA digestion reactions were directly observed both under pulse-chase conditions and under continuous buffer flow conditions with T7 Exo. These obtained results successfully visualized the DNA digestion reactions, and the average rate and processivity were estimated to be 5.5 bases/sec and 5882 bases. Thus, the labeled ssDNA visualization method by ssBP-488 was an effective analytic method for investigating DNA metabolic processes.

In this study of chapter 3~5, direct observations of DNA metabolic reactions were carried out for both random coil and stretched DNA molecules. For further analysis to reflect of chromosomal DNA in cell nucleus, a supercoil was induced to linear DNA. In this study of chapter 6, I developed a manipulation system to control the superhelicity of single linear DNA molecules using a fluorescent microscope equipped with magnetic tweezers in a flow cell. Using the developed system, I investigated effects of a negative supercoil on the local denaturation of the DNA double helix in single-molecule level. As a results, the local denaturation of  $\lambda$ DNA and SV40ori- $\lambda$ DNA under negative supercoil states was induced at an A+T-rich region in the  $\lambda$  replication origin of  $\lambda$ DNA and an A+T-rich sequence in the SV40 replication origin of SV40ori- $\lambda$ DNA, respectively. The probability of occurrence of the local denaturation increased with negative superhelicity for both  $\lambda$ DNA and SV40ori- $\lambda$ DNA. These results suggested that the induction of local denaturation under negative supercoil states is involved in regulating the initiation of DNA replication.

In this study of chapter 7, I investigated effects of negative supercoiling on the unwinding activity of Simian Virus 40 (SV40) Large Tumor Antigen (TAg) at the single-molecule level. Supercoiling density in linear DNA templates was controlled using magnetic tweezers and monitored using a fluorescent microscope in the flow cell. DNA unwinding by SV40 TAg under relaxed and negative supercoil states was analyzed by direct observation of both single- and double-stranded regions of single DNA molecules. A higher negative superhelicity stimulated DNA unwinding by SV40 TAg more than a relaxed state, and furthermore, a negative superhelicity was associated with increased probability of DNA unwinding by SV40 TAg. These results suggest the involvement of negative superhelicity in regulating the initiation of DNA replication.

In various aspects of biological phenomena, these developed single-molecule analysis techniques will be powerful methods for providing new insights into the elementary processes of DNA metabolic reactions and the physiological roles of supercoiling on the regulations of DNA metabolic reactions, such as DNA replication, repair and recombination.