

平成28年 7月26日

学位論文の審査要旨

学位論文申請者氏名：高橋 俊介

論文題目：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 (Dynamic analyses of DNA metabolic enzymes and effects of DNA supercoiling on the initiation of DNA replication by single-molecule observations)

論文の概要及び判定理由

本論文では1分子レベルの蛍光観察によりDNA代謝反応を解析し、平均値ではない個々の分子の挙動を明らかにすることを目指しているが、DNA代謝反応の素反応を解析するためには、その中間過程で生じる1本鎖DNA (ssDNA) を可視化する必要がある。本論文は2つの異なる蛍光ssDNA結合タンパク質・ペプチドを用いて、微細流路内にてssDNA1分子の動的挙動を直接観察する手法を開発した。その後、ssDNA領域を可視化したDNA1分子を鋳型としてDNA合成酵素クレノウ断片 (3'-5'Exo-) によるDNA合成反応の速度の決定に成功し、DNA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、同様な手法でDNA複製、修復に重要な役割を果たすT7エキソヌクレアーゼによるDNA分解反応を直接観察することによってDNA分解反応の速度とprocessivityを決定することに成功した。また、DNA超らせん構造がDNA代謝反応に与える影響を解析するために、新たに開発した磁気ピンセット装置を用いて直鎖状DNA1分子を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。これにより、負の超らせん歪みによって局所的な開裂が誘導され、その位置がDNA複製起点内のA+T-rich領域であること、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、負の超らせん歪みがSimian Virus 40 (SV40) 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した結果、負の超らせんがSV40の複製反応開始を促進し、引き続くSV40ラージT抗原によるDNA鎖巻き戻し反応も併せて促進することを明らかにし、負の超らせんがDNA複製開始の制御に重要な役割を果たすこと可能性を示した。

これらの研究は、1分子レベルでのDNA代謝反応およびDNA超らせん構造がDNA代謝反応の制御に果たしている役割について解析したものであり、DNA代謝反応の新しい解析技術の発展に大きく貢献するものである。そこで、博士(理工学)の学位に値するものと判定した。

審査年月日 平成28年 7月26日

審査委員

主査	群馬大学学術研究院	教授	大嶋孝之	印
副査	群馬大学学術研究院	教授	中川紳好	印
副査	群馬大学学術研究院	教授	渡邊智秀	印
副査	群馬大学学術研究院	准教授	箱田 優	印
副査	群馬大学学術研究院	教授	桂 進司	印

関連論文

- 1 著者名 **Takahashi, S.**, Motooka, S., Usui, T., Kawasaki, S., Miyata, H., Kurita, H., Mizuno, T., Matsuura, S.-I., Mizuno, A., Oshige, M., Katsura, S.
論文題目 Direct Single-Molecule Observations of Local Denaturation of a DNA Double Helix under a Negative Supercoil State.
(和訳) 負の超らせん状態における DNA 二重鎖の局所的な開裂の直接1分子観察
雑誌名 *Analytical Chemistry* 第87巻 第6号 3490頁～3497頁
2015年2月
- 2 著者名 **Takahashi, S.**, Usui, T., Kawasaki, S., Miyata, H., Kurita, H., Matsuura, S.-I., Mizuno, A., Oshige, M., Katsura, S.
論文題目 Real-time Single-Molecule Observations of T7 Exonuclease Activity in a Microflow Channel
(和訳) 微細流路中における T7 エキソヌクラーゼ活性のリアルタイム1分子観察
雑誌名 *Analytical Biochemistry* 第457巻 第1号 24頁～30頁 2014年7月
- 3 著者名 **Takahashi, S.**, Kawasaki, S., Miyata, H., Kurita, H., Mizuno, T., Matsuura, S.-I., Mizuno, A., Oshige, M., Katsura, S.
論文題目 A New Direct Single-Molecule Observation Method for DNA Synthesis Reaction using Fluorescent Replication Protein A
(和訳) 蛍光複製タンパク質 A を用いた DNA 合成反応の新しい直接1分子観察法
雑誌名 *Sensors* 第14巻 第3号 5174頁～5182頁 2014年3月
- 4 著者名 **Takahashi, S.**, Kawasaki, S., Yamaguchi, K., Miyata, H., Kurita, H., Mizuno, T., Matsuura, S.-I., Mizuno, A., Oshige, M., Katsura, S.
論文題目 Direct Observation of Fluorescently Labeled Single-stranded λ DNA Molecules in a Micro-Flow Channel
(和訳) 微細流路内における蛍光標識1本鎖 λ DNA分子の直接観察
雑誌名 *Journal of Fluorescence*, 第23巻 第4号 635頁～640頁 2013年7月