

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

高橋俊介

群馬大学

略語一覽

DNA : Deoxyribonucleotide acid

λDNA : DNA of Bacteriophage λ

PDMS : Polydimethylsiloxane

RPA : Replication protein A

GFP : Green Fluorescent Protein

BFP : Blue Fluorescent Protein

CFP : Cyan Fluorescent Protein

YFP : Yellow Fluorescent Protein

DsRed : *Discosoma striata* Red Fluorescent Protein

ssDNA Single-stranded DNA

dsDNA : Double-stranded DNA

T7 Exo : T7 Exonuclease

SV40 : Simian virus 40

TAg : Large Tumor Antigen

DTT : Dithiothreitol

μTAS : Micro-Total Analysis Systems

ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated

ATRIP : ATM and Rad3-Related-Interacting Protein

XPA : Xeroderma Pigmentosum A

FACT : Facilitates Chromatin Transcription

RFC : Replication Factor C

p53bp1 : p53 binding protein 1

BRCA2 : Breast Cancer 2

XPG : Xeroderma Pigmentosum G

XPF : Xeroderma Pigmentosum F

ERCC1 : Excision Repair Cross-Complementation group 1

His : Histidine

IPTG : Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

SDS-PAGE : Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis

APS : Ammonium persulfate

TEMED : Tetramethylethylenediamine

PEEK : Polyetheretherketone

E.coli : *Escherichia coli*

PCR : Polymerase Chain Reaction

EMSA : Electrophoresis Mobility Shift Assay

DSB : Double-Stranded Break

DOPC : 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine

S. pombe : *Schizosaccharomyces pombe*

ORC : Origin Recognition Complex

D. melanogaster : *Drosophila melanogaster*

AAA : ATPases associated with diverse cellular activities

S. cerevisiae : *Saccharomyces cerevisiae*

X. laevis : *Xenopus laevis*

H. sapiens : *Homo sapiens*

目次

第1章 序論.....	1
§ 1.1 研究背景および目的.....	1
§ 1.2 本論文の構成.....	2
§ 1.3 参考文献.....	3
第2章 1分子レベルでの DNA の観察と形態制御.....	4
§ 2.1 核酸塩基と核酸構造.....	4
§ 2.2 DNA の1分子観察.....	6
2.2.1 DNA の2本鎖領域の可視化.....	7
2.2.2 DNA の1本鎖領域の可視化.....	7
§ 2.3 DNA の形態制御.....	9
2.3.1 水溶液の流れを利用した DNA の形態制御.....	10
2.3.2 DNA の1分子操作.....	11
§ 2.4 蛍光顕微鏡装置.....	13
§ 2.5 微細流路装置.....	14
§ 2.6 磁気ピンセット装置.....	15
§ 2.7 蛍光染色した DNA の蛍光退色の抑制.....	16
§ 2.8 蛍光タンパク質.....	17
§ 2.9 参考文献.....	19
第3章 微細流路内での1本鎖 DNA の直接観察.....	22
§ 3.1 序論.....	22
3.1.1 Replication Protein A の機能と構造.....	23
3.1.2 組換えタンパク質 RecA の機能と構造.....	26
§ 3.2 実験手順及び操作.....	28
3.2.1 RPA-YFP 融合タンパク質発現ベクターDNA の構成.....	28
3.2.2 RPA-YFP の培養、発現、精製、ssDNA 結合活性の測定.....	29
3.2.2.1 大腸菌の培養と RPA-YFP タンパク質発現.....	29
3.2.2.2 RPA-YFP タンパク質の精製.....	31
3.2.2.3 RPA-YFP タンパク質の濃度測定.....	32
3.2.2.4 RPA-YFP タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動法 による測定.....	33
3.2.2.5 RPA-YFP の ssDNA Binding-Assay.....	34
3.2.3 微細流路装置の作製.....	36

3.2.3.1	PDMS により作製した微細流路装置.....	36
3.2.3.2	PDMS シートの作製と微細流路装置の作製.....	37
3.2.4	ジクロロジメチルシラン修飾ガラス基板の作製.....	38
3.2.4.1	ジクロロジメチルシランによるガラス基板表面の修飾と 片端チオール化 DNA の固定化	38
3.2.4.2	ジクロロジメチルシラン修飾ガラス基板の作製.....	38
3.2.5	片端チオール化 DNA の作製	40
3.2.6	1 本鎖化 λ DNA の動的挙動の直接観察.....	42
3.2.6.1	ss λ DNA 及び oligo-ss λ DNA の調製	42
3.2.6.2	ssBP-488 による 1 本鎖化 λ DNA の動的挙動の直接観察	44
3.2.6.3	RPA-YFP による 1 本鎖化 λ DNA の動的挙動の直接観察	46
3.2.6.4	塩を含む緩衝液内での ssDNA 領域を含む λ DNA の動的挙動の 直接観察.....	48
§ 3.3	結果及び考察.....	49
3.3.1	RPA-YFP のゲル電気泳動法による測定結果.....	49
3.3.2	1 本鎖化 λ DNA の動的挙動の直接観察.....	50
3.3.3	塩を含む緩衝液内での ssDNA 領域を含む λ DNA の動的挙動の 直接観察.....	51
§ 3.4	第 3 章のまとめ	53
§ 3.5	参考文献.....	54
第 4 章	RPA-YFP を用いた DNA 合成酵素による DNA 合成反応の直接観察.....	56
§ 4.1	序論	56
4.1.1	DNA ポリメラーゼ I の機能と構造.....	58
§ 4.2	実験手順及び操作	60
4.2.1	実験試薬と装置	60
4.2.2	DNA プライマーを付加した λ DNA の 1 本鎖化の調製	61
4.2.3	RPA-YFP を用いた DNA 合成反応のリアルタイム観察	61
§ 4.3	結果及び考察.....	65
§ 4.4	第 4 章のまとめ	69
§ 4.5	参考文献.....	70
第 5 章	エキソヌクレアーゼ活性による DNA 分解反応の直接観察.....	73
§ 5.1	序論	73
5.1.1	Bacteriophage T7 gene 6 protein の構造と機能.....	75
§ 5.2	実験手順及び操作	76

5.2.1	実験試薬と装置	76
5.2.2	微細流路装置の作製	77
5.2.3	微細流路内でのガラス基板修飾法	78
5.2.3.1	改質ガラス基板の作製	78
5.2.3.2	リポソーム溶液の調製	79
5.2.4	片端ビオチン化 λ DNA の調製	80
5.2.5	微細流路内でのガラス基板修飾	82
5.2.6	T7 Exo による DNA 分解反応の直接観察	84
5.2.7	T7 Exo を短時間供給したときの DNA 分解反応の直接観察	86
5.2.8	T7 Exo を連続的に供給したときの DNA 分解反応の直接観察	88
§ 5.3.	結果及び考察	90
5.3.1	T7 Exo による DNA 分解反応の直接観察	90
5.3.2	T7 Exo を短時間ないし連続的に供給したときの DNA 分解反応の直接観察	92
5.3.3	T7 Exo による DNA 分解反応の速度	96
§ 5.4	第 5 章のまとめ	97
§ 5.5	参考文献	98
第 6 章 負の超らせん歪みによる DNA 二重らせんの局所的な開裂の直接観察 ..		100
§ 6.1	序論	100
6.1.1	DNA 二重らせん構造	101
6.1.2	超らせん構造	102
6.1.3	バブル構造	103
6.1.4	十字構造	104
6.1.5	Z 型構造	104
6.1.6	三重らせん構造	104
§ 6.2	実験手順及び操作	105
6.2.1	実験試薬と装置	105
6.2.2	SV40 DNA 複製起点を含む λ DNA の構成	106
6.2.3	片端ビオチン化・他片端ジゴキシゲニン化 λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の作製	107
6.2.3.1	左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の作製	109
6.2.3.2	右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の作製	112

6.2.4	磁気ピンセット装置の開発	114
6.2.5	微細流路内でのガラス基板修飾	115
6.2.6	抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズの調製.....	116
6.2.7	微細流路内での直鎖状 DNA のガラス基板表面と 磁気ビーズの固定	117
6.2.8	DNA の超らせんにより生じた二次構造の直接観察	119
6.2.9	負の超らせん歪みによる DNA 二重らせんの 局所的な開裂の直接観察.....	121
6.2.10	負の超らせん密度を増加したときの DNA の 局所的な開裂の直接観察.....	124
§ 6.3	結果及び考察.....	127
6.3.1	DNA の超らせんにより生じた二次構造の直接観察	127
6.3.2	負の超らせん歪みによる DNA 二重らせんの 局所的な開裂の直接観察.....	128
6.3.3	負の超らせん密度を増加したときの DNA の 局所的な開裂の直接観察.....	131
§ 6.4	第 6 章のまとめ	133
§ 6.5	参考文献.....	134
第 7 章 負の超らせん状態下での DNA 複製開始反応の直接観察.....		137
§ 7.1	序論	137
7.1.1	十字構造の生理学的役割.....	139
7.1.2	Z 型構造の生理学的役割.....	139
7.1.3	三重らせん構造の生理学的役割	139
7.1.4	Simian Virus 40	140
7.1.5	SV40 origin.....	141
7.1.6	SV40 Large Tumor Antigen の機能と構造	141
§ 7.2	実験手順及び操作	144
7.2.1	実験試薬と装置	144
7.2.2	1 分子蛍光観察装置	145
7.2.3	微細流路内でのガラス基板修飾	145
7.2.4	微細流路内での鋳型直鎖状 DNA のガラス基板表面と 磁気ビーズの固定	146
7.2.5	弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察.....	148

7.2.6 負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察.....	152
§ 7.3. 結果及び考察.....	156
7.3.1 弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察.....	156
7.3.2 負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察.....	158
§ 7.4 第 7 章のまとめ.....	166
§ 7.5 参考文献.....	166
<u>第 8 章 総括</u>	170
§ 8.1 本研究の結論.....	170
<u>Appendix</u>	173
<u>研究業績</u>	187
<u>謝辞</u>	198

第 1 章

序論

§1.1 研究背景および目的

ヒトゲノムプロジェクトの完了による塩基配列情報の解読をもとに DNA-タンパク質間及びタンパク質-タンパク質間相互作用の影響を中心とするタンパク質の機能解析が盛んに行われた結果、DNA 複製をはじめとする DNA 代謝反応のモデルが提唱されている [1]。これらの学術研究の成果の多くは、試験管内反応産物を生化学・分子生物学的実験手法であるアガロースゲル電気泳動法や二次元電気泳動法などのゲル電気解析法により解析され、得られた結果である [1]。しかしながら、試験管内の反応溶液には数百万以上の DNA やタンパク質などの生体高分子が含まれているために、そこから得られた結果は多分子の挙動の平均値しか得ることができず、個々の分子の揺らぎの影響を解析することが極めて困難である（多分子解析）。また、試験管内実験では DNA 代謝反応の素反応やその中間過程を解析することが事実上、極めて困難であるために、DNA 代謝反応の素過程の実態を明らかにすることは難しい。これらの要因から、DNA 代謝反応の分子機構には未だ不明な部分が多い。

近年、生化学・分子生物学的実験技術、顕微鏡や様々な光学機器の発展によって DNA 1 分子に作用するタンパク質 1 分子の機能を解析するための手法が考案されている [2]、[3]。従来、1 分子レベルでのタンパク質の機能解析では電子顕微鏡装置や原子間力顕微鏡装置などを用いることにより研究が行われている。しかしながら、この測定法では基板上に非特異的に吸着した個々のタンパク質-タンパク質間相互作用や DNA 上に結合したタンパク質の位置を解析することしかできないため、DNA に作用するタンパク質の動的挙動をリアルタイムに測定することが極めて困難である。一方、蛍光色素や蛍光化合物を用いた蛍光観察では、DNA やタンパク質などの生体高分子を蛍光標識することにより水溶液中の個々の DNA やタンパク質の挙動を捉えることが可能となる。また、蛍光観察では動画によるイメージング解析が可能である高感度カメラを装備した蛍光顕微鏡装置、DNA を 1 分子操作・計測することが可能である磁気ピンセット装置・光ピンセット装置、微小反応場を制御することが可能である微細流路装置などの複数の装置を複合的に組み合わせることによって 1 分子解析装置を構成させることができるという大きな利点もある。このこと

から、1分子レベルの蛍光観察はDNAに作用するDNA代謝酵素の動的挙動やDNA代謝反応の素反応やその中間過程などの新知見を得ることができる有効な方法である [4]、[5]、[6]、[7]。さらに、DNA 1分子を操作することが可能なマニピュレーション技術のひとつである磁気ピンセット装置は直鎖状 DNA に任意の超らせん密度の超らせんを導入することができる。これにより、超らせんが転写、DNA複製、修復、組換えなどの DNA 代謝反応の制御に果たす役割を解明することができると期待されている[3]、[6]。

本研究では、「1分子レベルでの蛍光観察による DNA 及び DNA 代謝酵素の動態挙動の解明」と「負の超らせんや負の超らせん歪みにより生じる非 B 型 DNA 二次構造が DNA 複製反応の開始の制御に果たす役割の解明」を研究目的として研究を遂行してきた。本研究では、はじめに微細流路装置と蛍光顕微鏡装置を用いて、DNA の形態制御技術と DNA 及びタンパク質の蛍光標識技術を適用することによって、DNA 合成反応や DNA 分解反応などの DNA 代謝反応の反応過程を明らかにすることを試みた。その後、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から構成された1分子蛍光観察装置を用いることによって、直鎖状 DNA 1分子に指定した密度の超らせんを導入し、その超らせん状態の DNA を直接観察することによって、B 型 DNA から非 B 型 DNA 二次構造への変化の過程や超らせんが DNA 複製反応の開始の制御に与える影響を明らかにすることを試みた。

§1.2 本論文の構成

本博士論文は1分子レベルでの蛍光観察により DNA 合成反応、DNA 分解反応などの DNA 代謝反応や超らせん及び超らせん歪みにより生じる非 B 型 DNA 二次構造が DNA 複製反応の開始の制御に与える影響を解析することによって、得られた研究成果をまとめたものである。

第1章では、本博士論文の序論として研究の背景及び目的について述べた。第2章では、1分子レベルでの DNA の観察と形態制御について述べる。第3章では、蛍光1本鎖 DNA 結合タンパク質を用いた1本鎖 DNA の可視化により得られた研究成果について述べる。第4章では、1分子レベルでの DNA 合成反応の直接観察により得られた研究成果を述べる。第5章では、1分子レベルでの DNA 分解反応の直接観察によって得られた研究成果を述べる。第6章では、負の超らせん歪みにより生じた DNA 二重らせんの局所的な開裂の直接観察によって得られた研究成果を述べる。第7章では、DNA の負の超らせん状態下での Simian Virus 40 (SV40) ラージ T 抗原による DNA 複製反応の開始を直接観察により得られた研究成果を述べる。

最終章である第8章では、本博士論文の総括について述べる。

§1.3 参考文献

- [1] Yeeles, J. T., Deegan, T. D., Janska, A., Early, A., and Diffley, J. F.
Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins.
Nature, 2015, **519**, 431-435.
- [2] Walter, N. G., Huang, C. Y., Manzo, A. J., and Sobhy, M. A.
Do-it-yourself guide: how to use the modern single-molecule toolkit.
Nature Methods, 2008, **5**, 475-489.
- [3] Bustamante, C., Bryant, Z., and Smith, S.B.
Ten years of tension: single-molecule DNA mechanics.
Nature, 2003, **421**, 423-427.
- [4] Robinson, A., and van Oijen, A. M.
Bacterial replication, transcription and translation: mechanistic insights
from single-molecule biochemical studies.
Nature Reviews Microbiology, 2013, **11**, 303-315.
- [5] Duzdevich, D., Redding, S., and Greene, E.C.
DNA Dynamics and Single-Molecule Biology.
Chemical Review, 2014, **114**, 3072-3086.
- [6] Neuman, K.C., Nagy, A.
Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and
atomic force microscopy.
Nature Methods, 2008, **5**, 491-505.
- [7] Heller, I., Hoekstra, T. P., King, G. A., Peterman, E. J., and Wuite, G. J.
Optical tweezers analysis of DNA–protein complexes.
Chemical Reviews, 2014, **114**, 3087-3119.

第 2 章

1 分子レベルの DNA の観察と形態制御

§2.1 核酸塩基と核酸構造

ヌクレオチドは糖、リン酸、塩基から構成され、DNA は異なる 4 種類のヌクレオチドの組合せにから構成されている。ヌクレオチドの糖とリン酸の構造は等しいが、塩基 (アデニン [A]、グアニン [G]、シトシン [C]、チミン [T]) の構造は異なっている (RNA ではチミンがウラシル [U] に変わる)。塩基の構造はプリン環を基本骨格とする塩基性物質 (プリン塩基) のアデニン [A]、グアニン [G] とピリミジン核を基本骨格とする塩基性物質 (ピリミジン塩基) のウラシル [U]、チミン [T]、シトシン [C] に分けられている [1]、[2] (図 2-1 A)。

DNA を構成する 2 本のポリヌクレオチドは水素結合を通して擬 2 回転対称軸の Watson-Crick 型の相補的塩基対で結ばれており、その塩基対間の回転・ねじれを通して塩基がスタッキング相互作用により積み重なることによって右巻きの二重らせん構造をとる。DNA 二重らせん構造の形成に働く相互作用において、相補的なポリヌクレオチドの塩基対間の相互作用は水素結合によって静電力が大きく働いており、その他に分散力や分極なども働いている。一方、塩基同士のスタッキング相互作用は塩基間のポリヌクレオチドの積層によって生じる電子的な分極の誘起双極子相互作用、London 分散力、疎水性塩基対間での疎水性相互作用が働いている。また、DNA 二重らせん構造は塩濃度や相対湿度の変化により A 型、B 型、C 型、D 型、E 型、Z 型 (左巻の二重らせん構造) などの DNA 構造に変化することが知られている [2]。とりわけ、水溶液内 (低イオン溶液内など) での DNA 二重らせん構造は B 型 DNA 構造をとることが知られている。

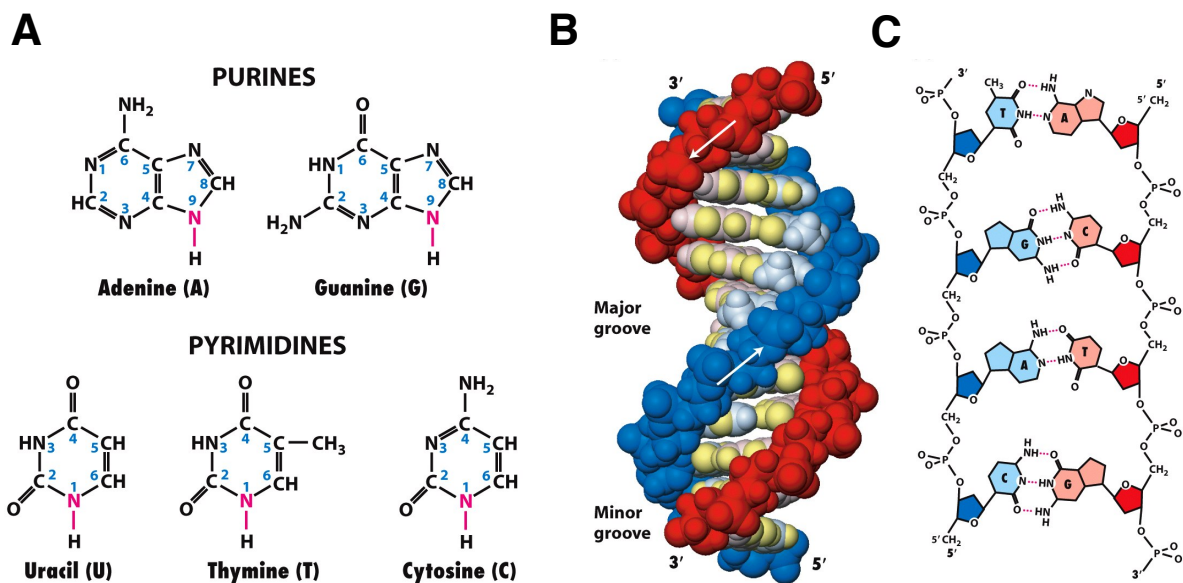


図 2-1. 核酸と DNA の構造 [1]

A DNA、RNA を構成する 2 つのプリン塩基 (図上) と 3 つのピリミジン塩基 (図下) の芳香環の構造

B B 型 DNA 構造の二重らせん構造

B 型 DNA 構造は 1 回転あたり 10.4 ~ 10.6 塩基対のらせん構造とり、主溝の幅が副溝の幅に比べ広い。

C 2 本のポリヌクレオチド鎖の Watson-Crick 型塩基対の構造

2 本のポリヌクレオチド鎖は、水素結合を通して擬 2 回転対称軸の Watson-Crick 型の相補的塩基対で結ばれ、その塩基対間の回転・ねじれなどを通して塩基がスタッキング相互作用により積み重なることによって右巻きの二重らせん構造をとる。

B 型 DNA 構造は 1 回転あたり 10.4 ~ 10.6 塩基対の DNA 二重らせん構造をとり、主溝が広く、副溝が狭い。また、主溝と副溝の溝の深さは等しい。B 型 DNA 構造の塩基対間のスタッキング相互作用は同一鎖内でのスタッキング相互作用である鎖内スタッキング相互作用が働いている。一方、A 型 DNA 構造の塩基対間のスタッキング相互作用は鎖内スタッキング相互作用と鎖間スタッキング相互作用が働いている。このため、B 型 DNA 構造のスタッキング相互作用は A 型 DNA 構造のスタッキング相互作用よりも弱い。従って、B 型 DNA 構造は開裂構造、十字構造、Z 型構造などの非 B 型 DNA 二次構造を誘導しやすいことが知られている [2]。

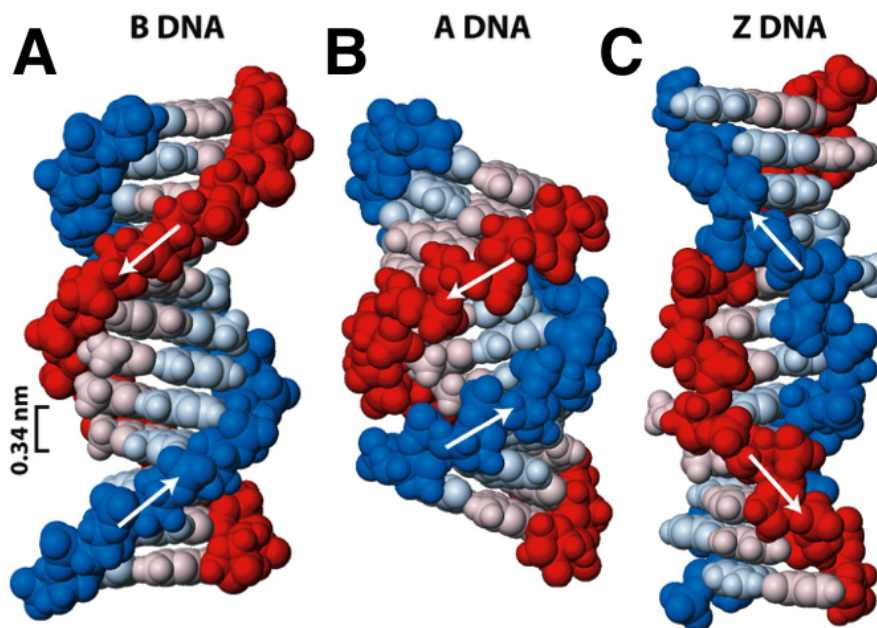


図 2-2. DNA 二重らせん構造とその種類 [1]

- A B 型 DNA 構造
- B A 型 DNA 構造
- C Z 型 DNA 構造

§2.2 DNA の 1 分子観察

1 分子レベルにて DNA やタンパク質などの生体高分子を観察する方法は大きく分けて 2 つある [3]。そのひとつは、観察対象となる生体高分子に可視光線・電子線などの照射ないし物理的に接触することにより観察対象物を物理的・直接的に観測する方法である。この観測装置には高い分解能を備えている電子顕微鏡や原子間力顕微鏡が用いられている。電子顕微鏡による観測では真空状態下にて基板表面に非特異的吸着された観察対象物に対して電子線を照射することによってナノメートルオーダーの微細な観察対象物の表面構造を捉えることができる。しかしながら、この観測では水溶液内にて動的に振る舞う DNA やタンパク質などの生体高分子の挙動を捉えることが困難である。また、原子間力顕微鏡による観測では、大気中から水溶液中、低温から高温など様々な測定環境にてマイカ（雲母）基板表面全体にカンチレバーを 1 点 1 点直接接触することによってマイカ基板表面からナノメートルオーダーレベルの観察対象物の高さ情報を得ることができる [4]。しかしながら、この観測には時間がかかること、鋭い探針であるカンチレバーの生体高分子への直接的な接触が生体高分子の破壊の原因となること、マイカ基板表面に観察対象物を非特

異的吸着させる必要があることなど欠点があるために、原子間力顕微鏡による観測では DNA やタンパク質などの生体高分子の動的挙動を捉えることが困難である。これらの理由から、電子顕微鏡や原子間力顕微鏡の測定では DNA に作用する DNA 代謝酵素の動態解析や DNA 代謝反応の中間過程を捉えることができず、DNA 代謝反応の素過程の実態を捉えることが事実上、できない（ただし、安藤らのグループが開発している高速原子間力顕微鏡では水溶液内の DNA やタンパク質の動的挙動を観察することが可能である [5]）。

DNA やタンパク質などの分子を観察するもうひとつの方法は、観察対象となる分子を蛍光標識することにより観察対象物を直接的・間接的に捉える方法である（蛍光観察）。蛍光観察は動画による撮影が可能である高感度カメラを装備した蛍光顕微鏡装置を用いることで、水溶液内の蛍光色素や蛍光化合物により蛍光標識した DNA やタンパク質などの生体高分子の動的挙動を捉えることが可能である [3]。このため、蛍光観察は DNA に作用する DNA 代謝酵素の動的挙動や DNA 代謝反応の素反応やその中間過程を捉えることができると考えられている。以下に、DNA を観察対象物としたときの観察方法について述べる。

2.2.1 DNA の 2 本鎖領域の可視化

水溶液内の DNA はインターカレーター型蛍光色素、グロブバインダー（DNA の副溝に特異的に結合することができる）などの蛍光色素を用いることによって蛍光染色することが可能となる。とりわけ、インターカレーター型蛍光色素は、速い拡散速度で DNA 二重らせんの外側に結合した後、ミリ秒単位で Watson-Crick 型塩基対間の水素結合を破壊することなく塩基対間に挿入される。

本研究では、インターカレーター型蛍光色素である YOYO-1（励起波長：491 nm、蛍光波長：509 nm）や SYTOX Orange（励起波長：547 nm、蛍光波長：570 nm）を用いることによって DNA の 2 本鎖領域を観察した。YOYO-1 や SYTOX Orange は蛍光染色した 2 本鎖 DNA（double-stranded DNA、dsDNA）の蛍光強度を 1000 倍以上に増大するという利点がある。図 2-3A は、YOYO-1 により蛍光染色した DNA の蛍光画像を示す。

2.2.2 DNA の 1 本鎖領域の可視化

DNA の dsDNA 領域はインターカレーター型蛍光色素を用いることにより容易に蛍光観察できるようになった。一方、この色素は 1 本鎖 DNA（single-stranded

DNA、ssDNA) を染色することができない。ssDNA は DNA 複製をはじめとする DNA 代謝反応の中間過程にて生じており、DNA 代謝反応の反応過程の詳細を解析するためには ssDNA を可視化する必要がある。しかしながら、ssDNA を可視化する有効な方法は未だに確立されていないのが実情である。ssDNA は ssDNA に対して特異的に結合するタンパク質である ssDNA 結合タンパク質を蛍光標識することによって可視化できると考えられる。ssDNA 結合タンパク質の蛍光標識の方法には ssDNA 結合タンパク質と緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein、GFP)、黄色蛍光タンパク質 (Yellow Fluorescent Protein、YFP) などの蛍光タンパク質との融合タンパク質の融合タンパク質発現系を利用する方法、ssDNA 結合タンパク質の ssDNA 結合部位を ssDNA で保護し、蛍光化合物により ssDNA 結合タンパク質の表面を化学標識する方法、ssDNA 結合タンパク質や ssDNA 結合タンパク質に融合したエピトープタグ (タグ融合タンパク質) を利用する直接・間接蛍光抗体法などが考えられる。

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 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) を開発した。蛍光 ssDNA 結合タンパク質の作製には大腸菌によるタンパク質発現系を利用した。このタンパク質発現系は簡便でまた迅速かつ安価に高い発現量の目的タンパク質を得ることができる非常に有効な方法である。また、蛍光 ssDNA 結合タンパク質の融合タンパク質発現系は ssDNA 結合タンパク質の蛍光化合物や蛍光抗体などによる蛍光標識を行うための操作が必要ないために、ssDNA 結合タンパク質の蛍光標識の操作に必要な時間や蛍光化合物、蛍光抗体、架橋剤、脱塩カラム、精製カラムなどの試薬の費用、さらに、蛍光標識化による ssDNA 結合タンパク質の濃度の低下を抑えることができるなどの多くの利点がある。図 2-3B は RPA-YFP により標識した ssDNA 1 分子を可視化したときの蛍光画像を示す (第 3 章) [6]。

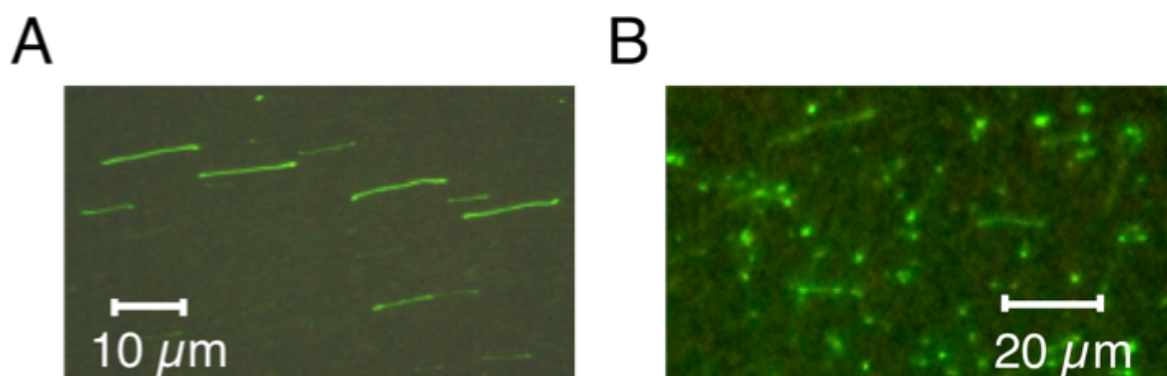


図 2-3. 2 本鎖 DNA と 1 本鎖 DNA の直接観察

A インターカレーター型蛍光色素 YOYO-1 により標識した 2 本鎖 DNA

B RPA-YFP により標識した 1 本鎖 DNA

DNA には Bacteriophage λ DNA (λ DNA、NCBI Reference Sequence、NC001416.1、48,502 塩基対) を用いた。

§2.3 DNA の形態制御

「§2.2 DNA の 1 分子観察」にて述べたように、蛍光観察は DNA に作用する DNA 代謝酵素の動的挙動や DNA 代謝反応の素反応やその中間過程を捉えることができると考えられている。しかしながら、水溶液内の DNA の形態はブラウン運動によってランダムに変化している。このような状態では、直鎖状 DNA は末端間距離を短くすることによりエントロピーを上昇させるように振る舞うために、蛍光顕微鏡視野内での蛍光染色した直鎖状 DNA は輝点として観察されることが多い。従って、直鎖状 DNA を伸張させる操作を行わない場合では、直鎖状 DNA の全長鎖をもとに DNA に作用する DNA 代謝酵素の動的挙動や DNA 代謝反応の中間過程を捉えることが困難である。この理由から、1 分子レベルの蛍光観察によって DNA 代謝酵素の動態挙動や DNA 二次構造の変化の過程を解析するためには DNA を伸張させる必要がある [7]、[8]、[9]。

DNA の形態制御技術にはマイクロシリンジポンプを用いた微細流路装置の流路内の水溶液の流れを利用する方法 (図 2-4A) [8]、電極を設置したガラス基板を用い直流電界を利用する方法 [10]、磁石ピンセット装置や光ピンセット装置などの DNA の 1 分子操作を利用する方法などが考案されている (図 2-4B、C) [4]、[7]、[9]、[11]。以下、水溶液の流れを利用する直鎖状 DNA の形態制御と光ピンセット装置や磁石ピンセット装置などの直鎖状 DNA の 1 分子操作について述べる。

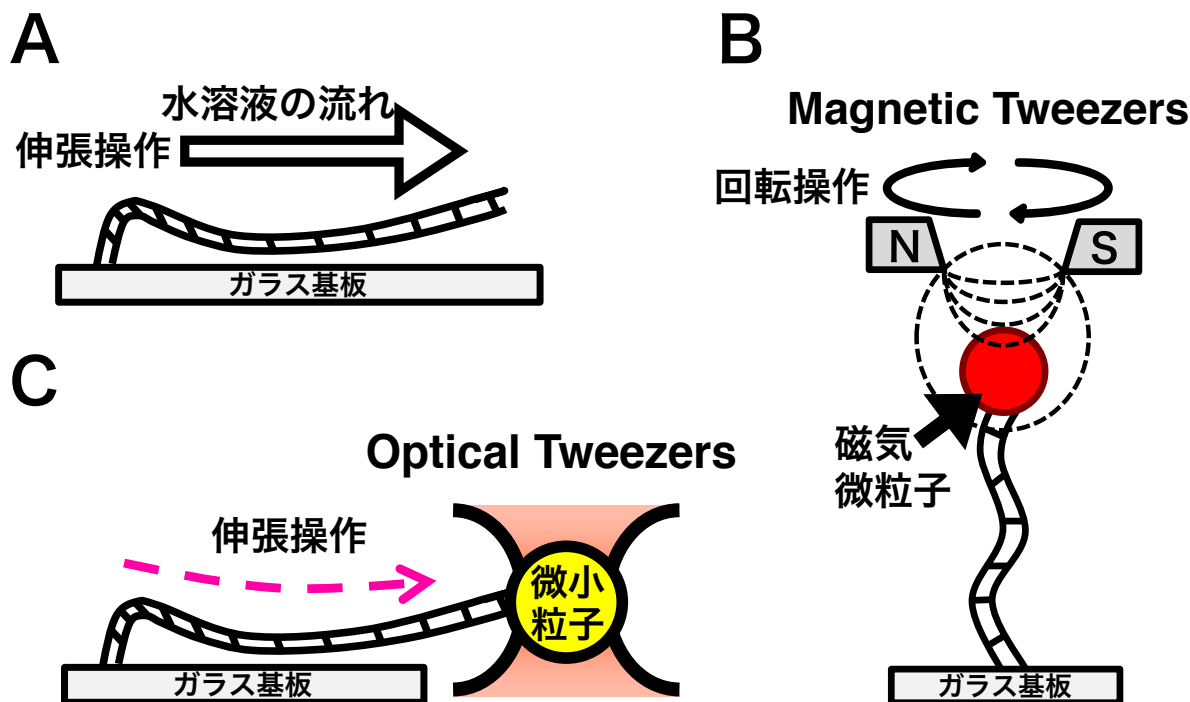


図 2-4. 直鎖状 DNA の形態制御。

- A 水溶液の流れを利用した直鎖状 DNA の形態制御
- B 磁気ピンセット装置による直鎖状 DNA の 1 分子操作
- C 光ピンセット装置による直鎖状 DNA の 1 分子操作

2.3.1 水溶液の流れを利用した DNA の形態制御

水溶液の流れを利用する直鎖状 DNA の形態制御では、マイクロシリンジポンプを用いることで、微細流路装置の流路内の水溶液の流れを操作することによって DNA の形態制御を実現している。流路内の水溶液の流れは直鎖状 DNA の形態を弛緩状態から伸張状態へと変化させるための外力となるため、直鎖状 DNA を伸張させることができる。また、微細流路装置は流路内に注入する調製試薬液の制御や微小反応場を制御することが可能である。また、1 度の観察で複数の DNA 分子の観察も可能であるために、ハイスループット検出にも適用することができることから、効率よく DNA に作用する DNA 代謝酵素の動態挙動などを解析することができる。

このように微細流路装置には多くの利点があることから、本研究では DNA の伸張操作に微細流路装置を用いた。本実験では微細流路装置の流路内のガラス基板表面に直鎖状 DNA の片端を固定した後、マイクロシリンジポンプを用いることで、流路内の水溶液の流れを利用することによって直鎖状 DNA を伸張させた (図 2-5)。

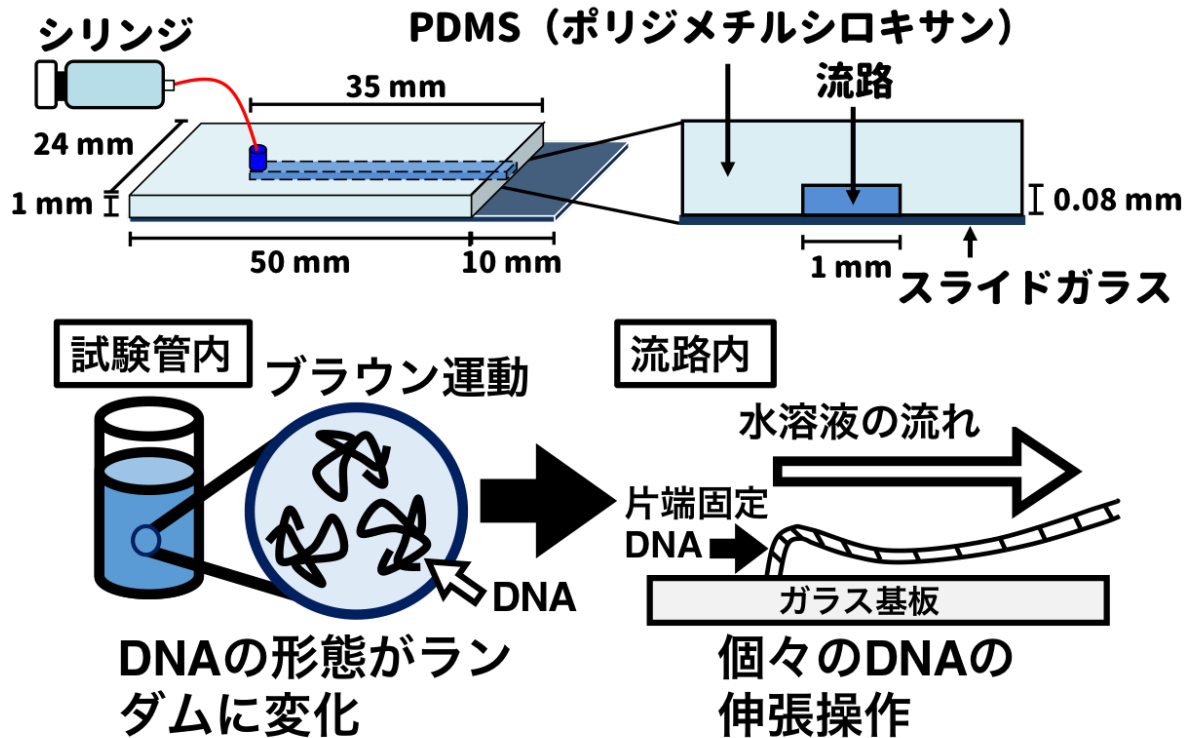


図 2-5. 本研究にて開発した微細流路装置と水溶液の流れを利用した DNA の伸張操作

2.3.2 DNA の 1 分子操作

光ピンセット装置や磁気ピンセット装置などのマイクロマニピュレーション技術は DNA 1 分子を操作することが可能である。光ピンセット装置はレーザービームの放射圧を利用してポリスチレンビーズを捕捉することによりポリスチレンビーズに付加した細胞や DNA などの分子を非接触にて操作することが可能である [9]。また、これまでに開発されてきた磁気ピンセット装置は磁石を用いることにより任意の方向に一定の磁場を発生させることで、磁気ビーズを付加した細胞や DNA を非接触にて操作することが可能である [4]、[7]、[11]。磁気ピンセット装置は磁石の回転操作を行うことより回転磁界を発生させることが可能であるために、磁気ビーズを付加した直鎖状 DNA に指定した超らせん密度の超らせんを導入することができる。しかしながら、磁気ピンセット装置による DNA の 1 分子操作では、磁石の回転操作によって生じた回転磁界に対して動く磁気ビーズの挙動を追跡することしかできないため、磁気ビーズが付加している DNA の末端間距離の変化しか測定することができない。このため、磁気ピンセット装置によって直鎖状 DNA に超らせんが導入されたかどうかは、DNA の末端間距離の変化をもとに解析することが可能である

が、超らせん状態の直鎖状 DNA を直接観察することができないため、「超らせん歪みにより生じる開裂構造、グアニン四 (G4) 重鎖、Z型構造などの非 B 型 DNA 構造二次構造 (非 B 型構造) が DNA 上のどの位置に誘導されるのか？」や「超らせんや非 B 型構造が DNA 代謝反応の制御にどのような影響を与えるのか？」などの詳細な情報は得ることができないのが実情である。

そこで本研究では、直鎖状 DNA の片端を微細流路装置の流路内のガラス基板表面に固定した後、他片端に磁気ビーズを結合させた。その後、磁気ピンセット装置を用いることで、磁石の回転操作を制御することにより直鎖状 DNA に指定した超らせん密度の超らせんを導入した。さらに、磁石を用いることによる任意の側方方向に一定の磁場を発生させることにより、超らせん状態の直鎖状 DNA を伸張させた (図 2-6)。これらの DNA の 1 分子操作によって、蛍光顕微鏡視野内にて超らせんを導入した直鎖状 DNA 1 分子の全長鎖を観測することが可能となるため、超らせん歪みから生じる非 B 型 DNA 二次構造の変化の過程やその位置の解析や超らせんや非 B 型構造が DNA 複製をはじめとする DNA 代謝反応の制御に与える影響を解析することがはじめて可能となる。

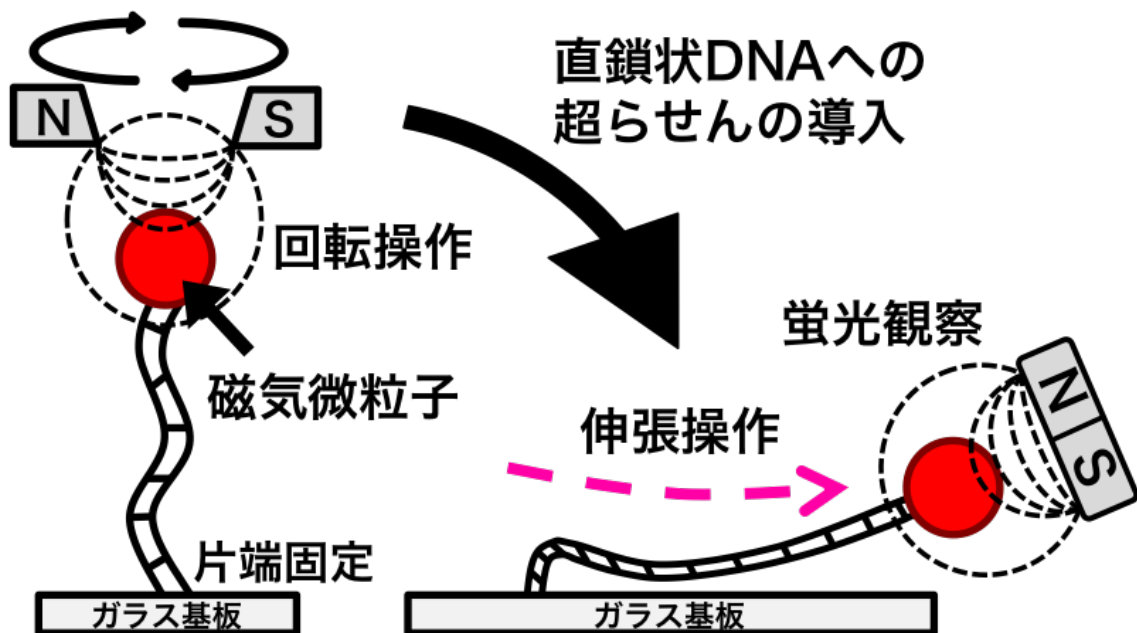


図 2-6. 磁気ピンセット装置を用いた DNA の形態制御の概要図 磁気ピンセット装置は磁石を任意の方向に回転操作することが可能であるために、直鎖状 DNA に指定した超らせん密度の超らせんの導入することが可能である。

以上のように本研究では、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から構成された1分子蛍光観察装置を用いることで、DNAの形態制御とDNA及びタンパク質の蛍光標識をすることによって、DNA合成反応(第4章)、DNA分解反応(第5章)非B型DNA二次構造の変化の過程(第6章)そしてDNA鎖巻き戻し反応(第7章)を直接観察することにより解析した。

§2.4 蛍光顕微鏡装置

本研究では倒立型蛍光顕微鏡(ECLIPSE TE2000-U、Nikon)と高感度カメラであるwatec Monochrome CCD camera(WAT-120+、watec、Yamagata、Japan)を用いることによって蛍光観察を行った(図2-7)。画像解析はImage processing softwareであるImageJ(<http://rsbweb.nih.gov/ij/index.html>、ver. 1.48、NIH)を用いた。励起光の光源には高圧水銀ランプ(C-LHG1 [100W]、Nikon)を用いた。フィルターセットは吸収フィルター(励起光用フィルター、蛍光用フィルター)とダイクロイックミラーで構成されている。光源からの光量はNDフィルターを用いることによって調整した。水銀ランプからの光源は、励起光の光路に対し45度に傾けたダイクロイックミラーによって励起光の吸収フィルターを通過した励起光を反射させた後、対物レンズを通過して蛍光染色したDNAを含む溶液試料を励起させる。蛍光染色したDNAから発光した蛍光は対物レンズを通過した後、ダイクロイックミラーを透過し、さらに、蛍光の吸収フィルターを通過することによって結像される。本研究ではB-2A(Blue excitation light、EX470/40、DM505、EM520、Nikon)とG-2A(Green excitation light、EX535/50、DM575、EM590、Nikon)のフィルターセットを用いた。これらのフィルターセットは蛍光物質から発光した蛍光を効率良く識別することができる。本研究は100 x 1.3 N.A. (Nikon)の油浸対物レンズを用いることにより個々の蛍光染色したDNAの蛍光領域を捉えることが可能となった。

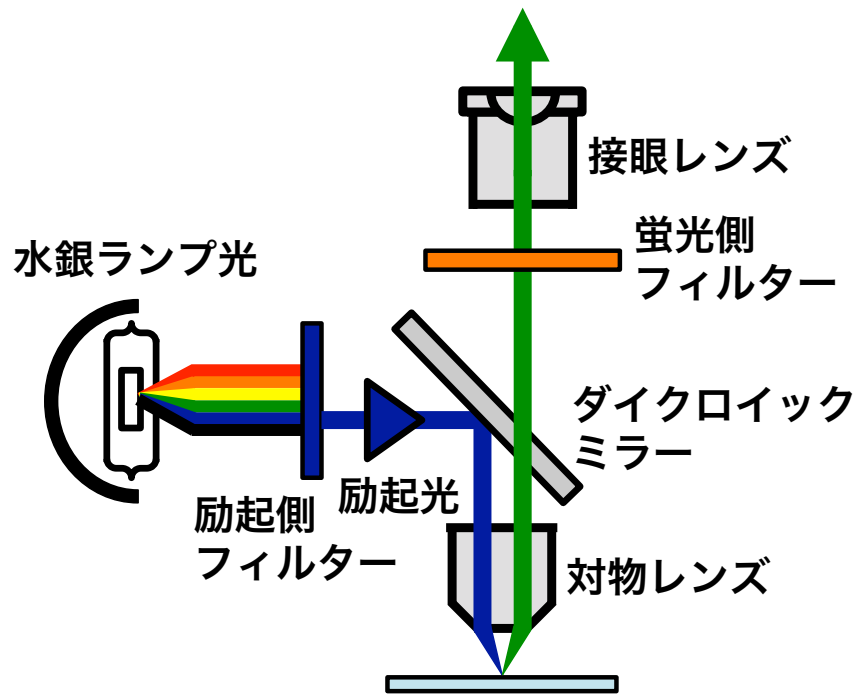


図 2-7. 本研究で使用した倒立型蛍光顕微鏡 ECLIPSE TE2000-U の蛍光顕微鏡装置の概要図

§2.5 微細流路装置

近年、マイクロ化学チップや Micro-Total Analysis Systems (μ TAS) に代表されるように、微小反応場を利用している分析デバイスが注目されている [12]。微細加工技術の最大な利点のひとつは、解析対象となる DNA やタンパク質などの生体試料の使用量を削減することが可能なことである。特に、微細加工技術のひとつである微細流路装置は流路内への調製試薬液の段階的な注入を制御することが可能であるため、反応場を厳密に制御することが可能となる。反応場の制御を再現良くできれば、DNA に作用する DNA 代謝酵素の動的挙動などの有益な情報が得ることができ。現在、マイクロ化学チップや μ TAS の分野では微細流路装置の作製に熱硬化性樹脂である Polydimethylsiloxane (PDMS) が用いられている [12]。PDMS はエストラマーのため、非常に弾性に優れ、自己吸着性もある。さらに、安価であり、簡単に PDMS の作製が可能である。また、PDMS は疎水性であるため、生体試料との相互作用も非常に少ない。本研究では、多くの利点をもつ PDMS を用いることによって DNA 代謝反応の反応場の制御の分析デバイスとして微細流路装置を作製し、実験に用いた。図 2-8 は PDMS によって作製した微細流路の作成手順を示す。本研究で用いた PDMS のシリコンラバーから作製した微細流路装置は加工が容易かつ再使用も可能であり、再現よく実験を遂行できるなど多くの利点を持つ。

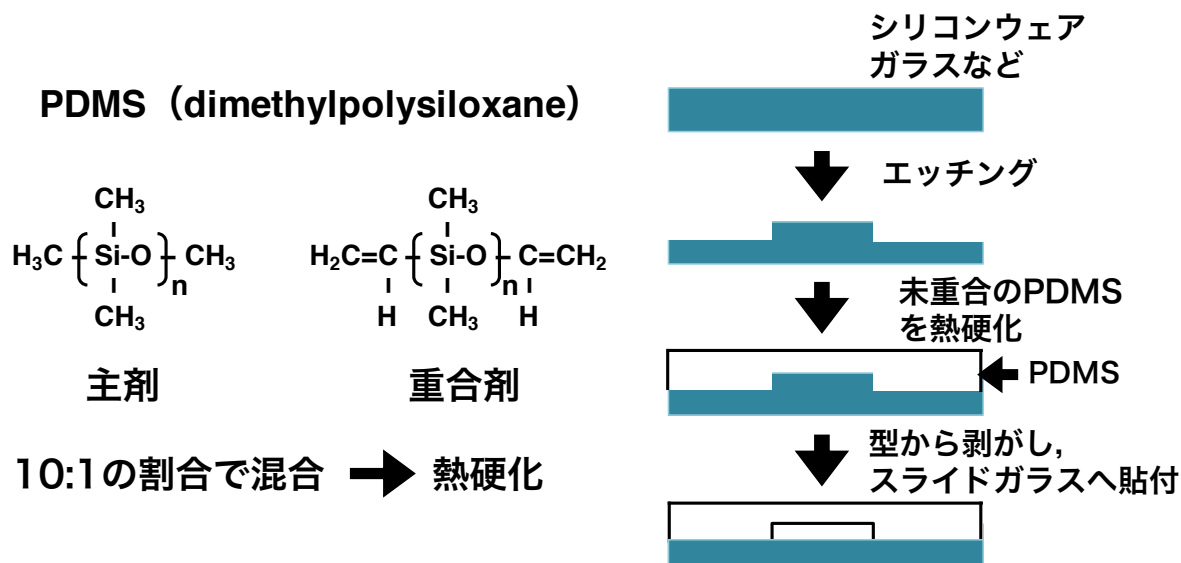


図 2-8. Polydimethylsiloxane (PDMS) による微細流路の作製手順

§2.6 磁気ピンセット装置

本研究では直鎖状 DNA に超らせんを導入するために、マイクロコンピューターである Arduino-Uno board (ARDUINO-A000066、SmartProjects、Scarmango、Torino、Italy) とステッピングモータードライバ (SFE-ROB-10267、Spark Fun Electronics、Boulder、CO、USA) を伴うステッピングモーター (AA-ATM15、Asakusagiken、Chiba、Japan) との組合せから構成された磁気ピンセット装置を開発した。ステッピングモーターは滑車 (直径 20 mm x 高さ 12 mm) を通して一对のネオジウム磁石 (厚さ 4 mm x 幅 4 mm x 長さ 8 mm、Sangyo Supply、Miyagi、Japan) を回転することができる。ステッピングモーターの回転数と回転速度は Arduino-Uno board に接続した液晶ディスプレイ (LCD Shield Kit-Black on Green、Switch Science、Tokyo、Japan) 上に表示させた。図 2-9 は、磁気ピンセット装置の概要図を示す。直鎖状 DNA の片端は微細流路装置の流路内のガラス基板表面に固定し、他片端には磁気ビーズを結合させた。開発した磁気ピンセット装置を用いることによって磁石の回転操作が可能となるため、直鎖状 DNA に任意のタイミングにて任意の超らせん密度の超らせんを導入させることが可能になった。

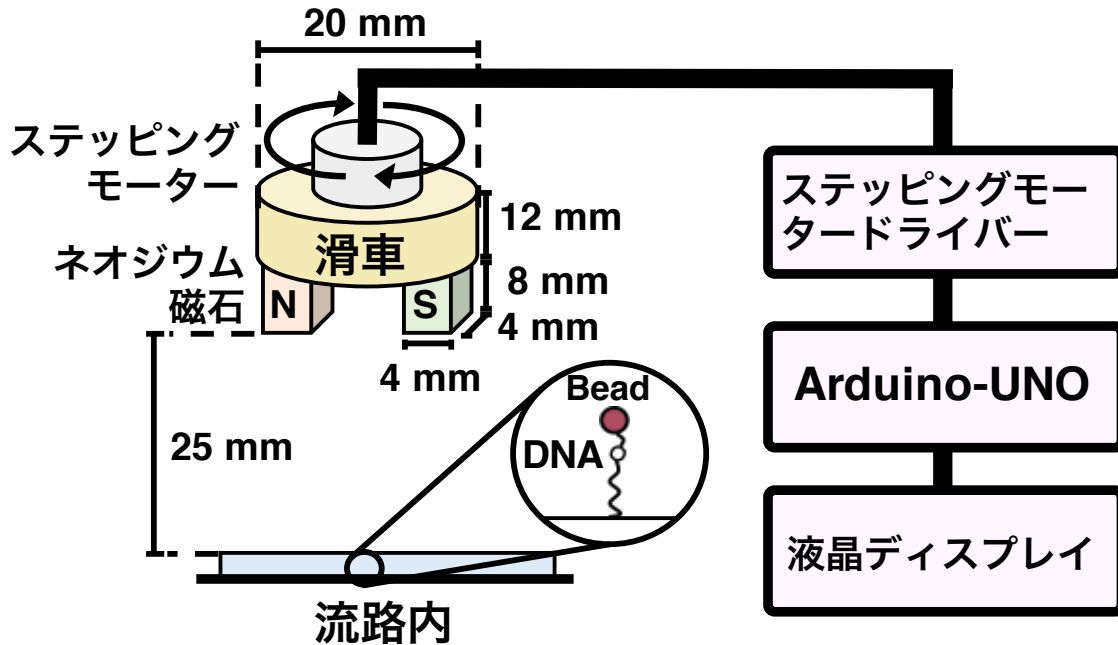


図 2-9. 本研究にて開発した磁気ピンセット装置

§2.7 蛍光染色した DNA の蛍光退色の抑制

水溶液内の蛍光染色した DNA は時間の経過とともに DNA の蛍光像が退色するため、長時間 DNA を蛍光観察することが困難である。蛍光染色した DNA を含む水溶液は蛍光顕微鏡による励起光を照射することによって光励起する。このとき、蛍光色素からエネルギーを受け取った水溶液内の溶存酸素は低いエネルギー準位から高いエネルギー準位に移動することによって一重項酸素 (O_2) OH ラジカル ($OH\cdot$) などの活性酸素種を発生する原因となる [13]。活性酸素種は DNA のホスホジエステル結合を切断することにより DNA の蛍光を退色させる。活性酸素種の生成は水溶液内の溶存酸素を除去することによって抑制することが期待できる。溶存酸素を除去するための方法には真空ポンプを用いて、溶媒を減圧することによって溶存酸素を脱気する方法や水溶液内に抗酸化試薬を添加する方法がある。その他の方法として、2-Mercaptoethanol、Dithiothreitol (DTT) などの還元剤は退色防止に有効な試薬である。しかしながら、これらの還元剤試薬はタンパク質のチオール基を保護する反面、ジスルフィド結合 (S-S 結合) を切断するために、タンパクの酵素活性を低下させる原因となる。また、還元剤以外の蛍光退色の防止には Glucose、Glucose Oxidase、Catalase による生化学的反応を利用することによって水溶液内の溶存酸素を除去する方法が用いられることが多い (Oxygen-Scavenging System) [13]。本研

究では、試薬の水溶液に含まれる溶存酸素量の減少を促す脱気操作、試薬調製における還元剤 2-Mercaptoethanol や Oxygen-Scavenging System の試薬液の添加を組み合わせることにより蛍光観察による DNA の蛍光像の退色を防ぎながら、観察を行った。以下に、Oxygen-Scavenging System の反応機構を示す (図 2-10)。

① **Glucose Oxidase は glucose の酸化を触媒**



② **Catalase は1で生成したH₂O₂を分解**



全体の反応としては、次式のようにO₂除去機構を与える。



↓↑

D-gluconic acid

図 2-10. Oxygen-Scavenging System による溶存酸素除去の反応機構 水溶液内の溶存酸素の除去は活性酸素種が DNA のホスホジエステル結合の切断による DNA の蛍光の退色を防ぐ。

§2.8 蛍光タンパク質

オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) から単離された分子量約 27 kDa である緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein、GFP) (励起波長 : 395 nm、蛍光波長 : 509 nm) は、はじめて発見された蛍光タンパク質である (図 2-11A)。GFP は 283 のアミノ酸残基から構成されており、そのアミノ酸残基の 65~67 番残基のセリン 65、チロシン 66、グリシン 67 のトリペプチドが緑色蛍光団として *p*-hydroxybenzylideneimidazolinone を形成することにより発光する。野生型 GFP において、GFP 単体では蛍光を発光することはできないが、その後の GFP の研究の進展によって GFP 単体でも蛍光特性を有する改変型 GFP が開発された。現在では、野生型 GFP を遺伝子工学的に蛍光強度、波長特性、至適温度、発色団形成速度など遺伝子改変した改変型 GFP が開発されている。これらの改変型 GFP は蛍光イメー

ジング、レポーター遺伝子、遺伝子導入マーカー、遺伝子発現マーカー、タンパク質融合タグなど生物学分野や医学分野の研究に広く用いられている [14]、[15]。

近年では、野生型 GFP と異なる波長を発光する改変型 GFP が開発されている。具体的には、野生型 GFP のチロシン 66 をヒスチジン 66 に置換した改変型 GFP である青色蛍光タンパク質 (Blue Fluorescent Protein、BFP) (励起波長：380 nm、蛍光波長：440 nm)、野生型 GFP のチロシン 66 をトリプトファン 66 に置換した改変型 GFP である青緑色蛍光タンパク質 (Cyan Fluorescent Protein、CFP) (励起波長：433 nm、蛍光波長：475 nm)、野生型 GFP の 203 番残基であるアミノ酸残基トレオニンをチロシンなどの芳香族アミノ基に変換することにより励起波長や蛍光波長が長波長側にシフト (発色団のフェノール基の電子配置の影響) する改変型 GFP である黄色蛍光タンパク質 (Yellow Fluorescent Protein、YFP) (励起波長：513 nm、蛍光波長：527 nm) などがある。これらの改変型 GFP は生物学分野や医学分野の研究で広く利用されている [14]、[15]。

他の生物由来の蛍光タンパク質では、造礁サンゴ (*Discosoma striata*) 由来の赤色蛍光タンパク質 (*Discosoma striata* Red Fluorescent Protein、DsRed) (励起波長：558 nm、蛍光波長：583 nm) が発見されている (図 2-11B)。DsRed は分子量約 26 kDa の蛍光タンパク質であり、改変型 GFP から得られていない赤色蛍光タンパク質であるために、改変型 GFP との多重染色や組織の蛍光観察の実験に用いられている。DsRed には野生型 DsRed の数カ所のアミノ酸残基の突然変異により可溶性の上昇した変異型 DsRed-Express が発見されている。しかしながら、4 量体の野生型 DsRed や変異型 DsRed-Express では融合タンパク質タグなどに利用することが困難であった。近年では、4 量体である野生型 DsRed のアミノ酸残基を遺伝子工学的に 45 個の他のアミノ酸残基に置換した単量体の改変型 DsRed (DsRed-Monomer) が開発された。DsRed-Monomer は DsRed-Express タンパク質に似た特性を持つことから、融合タンパク質タグなどに用いられている [16]。

本研究では、ssDNA 結合能を持つ RPA の 70kDa サブユニットと YFP との融合タンパク質である蛍光 1 本鎖 DNA 結合タンパク質の融合タンパク質発現系を用いることによって DNA の ssDNA 領域の可視化を行った。

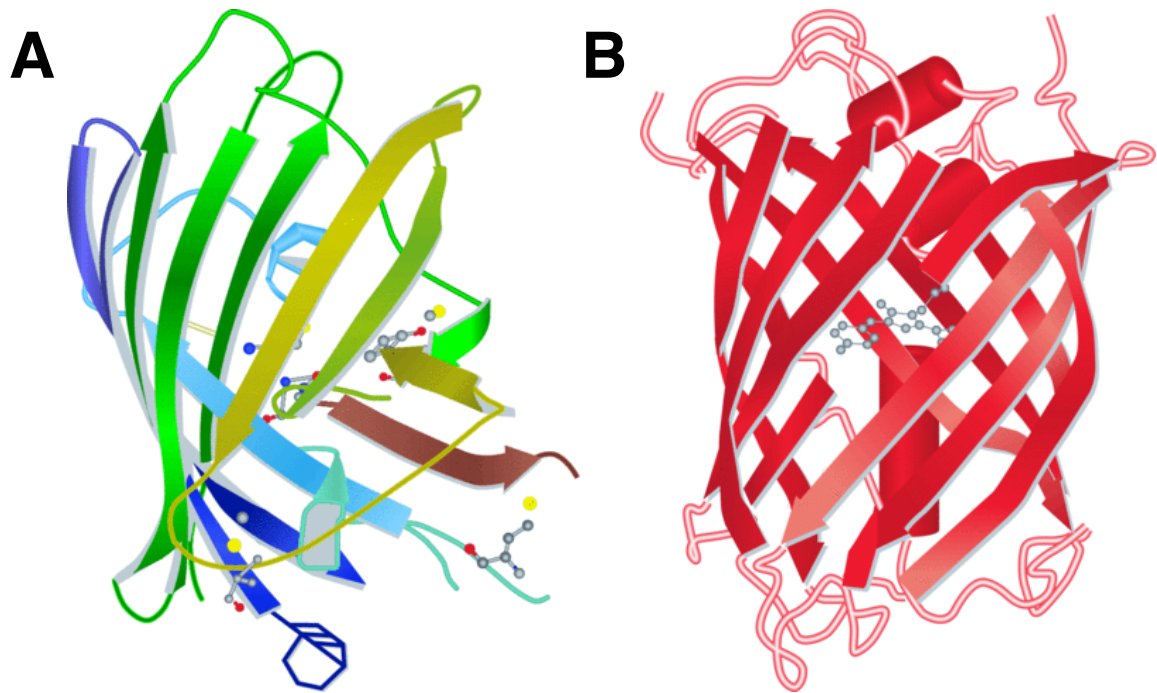


図 2-11. 蛍光タンパク質の立体構造 [17]

- A オワンクラゲ (*Aequorea victoria*) から単離された分子量約 27 kDa の緑色蛍光タンパク質 (Green Fluorescent Protein、GFP) の分子構造
- B 造礁サンゴ (*Discosoma striata*) から単離された分子量約 26 kDa の赤色蛍光タンパク質 (*Discosoma striata* Red Fluorescent Protein、DsRed) の分子構造

§2.9 参考文献

- [1] Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., and Walter, P.
Molecular Biology of the Cell (Sixth edition).
Garland Science, New York, 2014.
- [2] Saenger, W.
Principles of Nucleic Acid Structure.
Springer-Verlag, New York, 1984.
- [3] Walter, N. G., Huang, C. Y., Manzo, A. J., and Sobhy, M. A.
Do-it-yourself guide: how to use the modern single-molecule toolkit.
Nature Methods, 2008, **5**, 475-489.
- [4] Neuman, K. C., and Nagy, A.

- Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy.
Nature Methods, 2008, **5**, 491-505.
- [5] Kodera, N., Yamamoto, D., Ishikawa, R., and Ando, T.
Video imaging of walking myosin V by high-speed atomic force microscopy.
Nature, 2010, **468**, 72-76.
- [6] Oshige, M., Kawasaki, S., Takano, H., Yamaguchi, K., Kurita, H., Mizuno, T., Matsuura, S-I., Mizuno, A., and Katsura, S.
Direct observation method of individual single-stranded DNA molecules using fluorescent replication protein A.
Journal of Fluoresce., 2011, **21**, 1189-1194.
- [7] Robinson, A., and van Oijen, A. M.
Bacterial replication, transcription and translation: mechanistic insights from single-molecule biochemical studies.
Nature Reviews Microbiology, 2013, **11**, 303-315.
- [8] Duzdevich, D., Redding, S., and Greene, E.C.
DNA Dynamics and Single-Molecule Biology.
Chemical Reveiw, 2014, **114**, 3072-3086.
- [9] Heller, I., Hoekstra, T. P., King, G. A., Peterman, E. J., and Wuite, G. J.
Optical tweezers analysis of DNA–protein complexes.
Chemical Reviews, 2014, **114**, 3087-3119.
- [10] Matsuura, S. I., Komatsu, J., Hirano, K., Yasuda, H., Takashima, K., Katsura, S., and Mizuno, A.
Real-time observation of a single DNA digestion by λ exonuclease under a fluorescence microscope field.
Nucleic Acids Research, 2001, **29**, e79-e79.
- [11] Koster, D. A., Crut, A., Shuman, S., Bjornsti, M. A., and Dekker, N. H.
Cellular strategies for regulating DNA supercoiling: a single-molecule perspective.
Cell, 2010, **142**, 519-530.
- [12] Culbertson, C. T., Mickleburgh, T. G., Stewart-James, S. A., Sellens, K. A., and Pressnall, M.
Micro total analysis systems: Fundamental advances and biological applications.

- Analytical Chemistry*, 2013, **86**, 95-118.
- [13] Aitken, C. E., Marshall, R. A., and Puglisi, J. D.
An oxygen scavenging system for improvement of dye stability in single-molecule fluorescence experiments.
Biophysical Journal, 2008, **94**, 1826-1835.
- [14] Tsien, R. Y.
The green fluorescent protein.
Annual Review of Biochemistry, 1998, **67**, 509-544.
- [15] Zimmer, M.
Green fluorescent protein (GFP): applications, structure, and related photophysical behavior.
Chemical Reviews, 2002, **102**, 759-782.
- [16] Shaner, N. C., Campbell, R. E., Steinbach, P. A., Giepmans, B. N., Palmer, A. E. and Tsien, R. Y.
Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma sp.* red fluorescent protein.
Nature Biotechnology, 2004, **22**, 1567-1572.
- [17] Greb, C.
Fluorescent Proteins—Introduction and Photo Spectral Characteristics.
Leica Science Lab., 2012; <http://www.leica-microsystems.com/science-lab/fluorescent-proteins-introduction-and-photo-spectral-characteristics/>

第 3 章

微細流路内での 1 本鎖 DNA の直接観察

§ 3.1 序論

蛍光顕微鏡視野内にて DNA やタンパク質を観察するためには、DNA やタンパク質を蛍光色素や蛍光化合物によって蛍光標識する必要がある。YOYO-1、SYTOX Orange などのインターカレーター型蛍光色素は DNA の 2 本鎖領域の塩基対間に入り込むことができるため、DNA の 2 本鎖領域を染色することが可能であることから、1 分子レベルの蛍光観察も含め広く利用されてきた。しかしながら、インターカレーター型蛍光色素は DNA の 1 本鎖領域に入り込むことができないために、DNA の 1 本鎖領域を染色することができないのが実情である。しかしながら、1 本鎖 DNA (single-stranded DNA、ssDNA) 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、1 分子レベルにて DNA 代謝反応の中間過程を捉えるためには ssDNA を可視化する必要がある。しかしながら、これまでの研究では ssDNA を可視化するための技術は確立されておらず [1]、[2]、[3]、[4]、ssDNA を可視化することが可能になれば、DNA 代謝反応の中間過程のより詳細な情報を得ることができると考えられることから、生化学・分子生物学分野の研究に極めて重要な意義があると考えている。

本研究では、ssDNA を可視化するために、DNA 複製や修復に関与する Replication Protein A (RPA) と組換え修復や相同組換えに関与する RecA タンパク質の 2 つの ssDNA 結合タンパク質に着目した。RPA は 70 kDa、32 kDa、14 kDa のヘテロ 3 量体のサブユニットから構成されており、ssDNA のリン酸基側に静電的に結合する真核生物の ssDNA 結合タンパク質である。また、RecA は 38 kDa の単量体から構成されており、ATPase 活性により ssDNA に対してフィラメント上に結合することができる大腸菌の組換えタンパク質である。本研究では、はじめに ssDNA 結合能を持つ RPA70 kDa サブユニットと蛍光黄色タンパク質 (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) の融合タンパク質発現系を開発した [5]。一方、RecA は ssDNA と 2 本鎖 DNA (double-stranded DNA、dsDNA) を交換する機能を持っており、dsDNA に対しても結合することから、ssDNA のみの可視化に RecA を適用することは困難である。そこで本研究では、リアルタイムにてタンパク質の相互作用をモニタリングできるシステムである Biacore によって ssDNA に対して特異的に結合することが示されている RecA の 24

のアミノ酸残基から構成されている ssDNA 認識領域のペプチド（ペプチド配列：IRMKIGVMFGNPETTTGGNALKFY）を用いた [6]。そして、この RecA の ssDNA 認識領域のペプチドに対して蛍光化合物 Atto488 を化学標識することによって蛍光 ssDNA 結合ペプチド（single-stranded DNA Binding Peptide Atto488, ssBP-488）を開発した。

本研究では、2つの異なる方法により開発した RPA-YFP と ssBP-488 を用いることで、微細流路装置の流路内のガラス基板表面に片端固定した 1 本鎖化 λ DNA（single-stranded λ DNA, ss λ DNA）を蛍光標識した。その後、動画の撮影が可能である高感度カメラを装備した蛍光顕微鏡装置を用いることにより蛍光標識した 1 本鎖化 λ DNA の動的挙動の直接観察を試みた。さらに、塩濃度の変化や微細流路内の緩衝液の流れを停止したときの 1 本鎖化 λ DNA の動的挙動の変化を直接観察することを試みた。これにより、1分子レベルにて DNA 複製や修復に関与する RPA-YFP と組換え修復や相同組換えに関与する ssBP-488 による ssDNA の動態特性の違いを明らかにすることができた。

3.1.1 Replication Protein A の機能と構造

RPA は 70kDa、32kDa、14kDa のヘテロ3量体のサブユニットから構成されており、ssDNA のリン酸基側に対して静電的に結合することができる真核生物の ssDNA 結合タンパク質である。図 3-1 は *Homo sapiens* RPA (HsRPA) のドメイン構造と立体構造を示す [8]。RPA は4つの A、B、C、D の ssDNA Binding Domain (DBD) がある。そのなかでも RPA70 は DBD-A、DBD-B、DBD-C の3つの DBD を持ち合わせており、柔軟なリンカーを通してお互いに繋がっている。また、RPA32 は DBD-D の1つの DBD を持つ。RPA は3つの異なる ssDNA 結合モデルが存在すると考えられており、RPA を構成する4つの DBD の柔軟なリンカーの特徴的な配置が ssDNA への結合に影響すると考えられている。ssDNA への RPA の結合のモデルは、DBD-A と DBD-B を通して 8 ~ 10 ヌクレオチドと結合する1番目のモデル、DBD-A、DBD-B、DBD-C を通して 12 ~ 23 ヌクレオチドと結合する2番目のモデル、DBD-A、DBD-B、DBD-C、DBD-D を通して 28 ~ 30 ヌクレオチドと結合する3番目のモデルが考えられている。

RPA はゲノム安定化維持に重要な役割を果たしている。DNA 複製反応において、RPA は姉妹複製フォーク上の DNA の ssDNA 領域に対して特異的に結合することによって DNA の 1 本鎖領域から生じるヘアピン構造やセルフアニーリングの形成を防ぎ、DNA 合成反応の進行を円滑にする効果がある [7]。また、DNA 修復反応において、RPA は紫外線照射等により生じた損傷 DNA の修復過程で産出した ssDNA に結合することで、ssDNA を保護し、DNA 修復反応を円滑に進行させる [7]、[8]。従って、RPA を

蛍光標識することによって ssDNA1分子の可視化することが可能になれば、1分子レベルでの DNA 複製反応や修復反応などの素反応やその中間過程を直接観察することができることが考えられるため、蛍光 RPA による ssDNA の可視化は DNA 複製反応をはじめとする DNA 代謝反応中間過程のより詳細な理解を深めるための極めて有効な手法である。図 3-2 は DNA 複製、修復、癌抑制遺伝子などに関与するタンパク質と相互作用する RPA の領域を示す [7]、[8]。

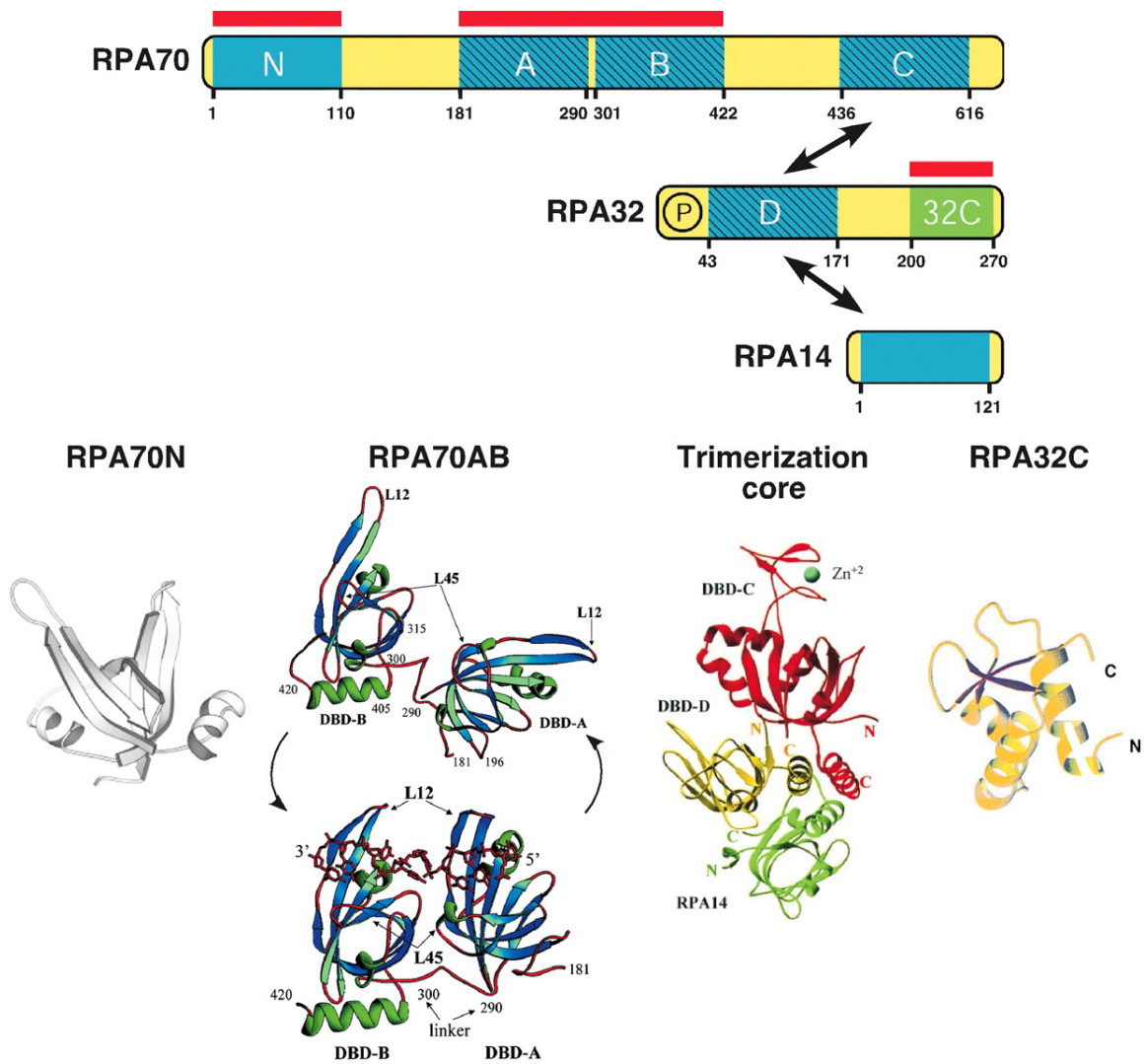


図 3-1. HsRPA のドメイン構造と立体構造 [8]

HsRPA のドメイン構造 (図上)

赤線：タンパク質結合ドメイン領域

青斜線領域 (A、B、C、D)：ssDNA 結合ドメイン

青領域：オリゴヌクレオチド結合フォールド

黄領域：リンカー

緑領域 : winged-helix-turn-helix フォールド

環状 P : ホスホアミノ酸クラスター

HsRPA の立体構造 (下図 左から)

RPA70 のアミノ基末端領域の構造

RPA70 の DBD-A、DBD-B 領域の構造

RPA70 の DBD-C、DBD-D、RPA14 の相互作用領域の構造

RPA32 のカルボキシル基末端領域の構造

Protein	RPA残基	Protein残基
Activation induced Cytidine Deaminase	RPA32	不明
Uracil-DNA glycosylase	RPA32 (163-217)	29-75, N末端
Rad52	RPA70 (169-326)	221-280
	RPA32 (224-271)	
SV40 T antigen	RPA70 (181-327), RPA32C	origin結合ドメイン131-249
XPA	RPA70 (183-296), RPA32C	20-46
p53	RPA70N, 1-120	38-58
ATRIP	RPA70N	1-107, その他?
FACT	RPA70N	Pob3, 327-477
Rad51	RPA70 (181-291)	1-93
Werner syndrome helicase	RPA70 (168-308)	N末端酸性領域、C末端
Bloom syndrome helicase	RPA70 (168-308)	N末端酸性領域、C末端
Papillomavirus E1	RPA70 (181-291)	不明
Parvovirus NS1	RPA70, RPA32	不明
Pol-Prim	RPA70 (1-327), RPA32/14	Primase p48/58
RFC	RPA70	p140, p40, p28
Rad9	RPA70, RPA32	不明
Rad17	RPA70, RPA32/14	不明
p53BP1	RPA70, RPA32	不明
Nucleolin	RPA14	645-707
BRCA2	不明	N末端
XPG	不明	不明
XPF-ERCC1	不明	不明
Mre11-Rad50-Nbs1	不明	不明

図 3-2. DNA 複製、修復、癌抑制遺伝子などに関与するタンパク質と相互作用する HsRPA の領域 [8]
Xeroderma Pigmentosum A (XPA)

Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) and Rad3-Related-Interacting Protein (ATRIP)

Facilitates Chromatin Transcription (FACT)

Replication Factor C (RFC)

p53 binding protein 1 (p53bp1)

Breast Cancer 2 (BRCA2)

Xeroderma Pigmentosum G (XPG)

Xeroderma Pigmentosum F (XPF)

Excision Repair Cross-Complementation group 1 (ERCC1)

アミノ基末端 (N 末端)

カルボキシル基末端 (C 末端)

3.1.2. 組換えタンパク質 RecA の機能と構造

大腸菌 RecA タンパク質は ssDNA にフィラメント上に結合する ATPase 活性、DNA 鎖交換反応による ssDNA と dsDNA の DNA アニール活性、相同組換え反応による D-ループ構造やホリデイ構造の形成などの機能を合わせ持つタンパク質であり、組換え修復や相同組換えに重要な役割を果たしている。RecA の組換えタンパク質ファミリーは RecA-like タンパク質である真核生物 Rad51、古細菌 RadA、真正細菌 RecA が同定されており、これらの遺伝子には ATPase 活性に対応するコアドメインが保存されている。図 3-3 は組換えタンパク質である真正細菌 RecA、真核生物 Rad51、古細菌 RadA のドメイン構造と立体構造を示す。RecA はカルボキシル基末端に DNA 結合部位が存在し、Rad51 と RadA はアミノ基末端に DNA 結合部位が存在する。核タンパク質フィラメントの構造は、RecA と RecA-like タンパク質 (Rad51、RadA) とで同様な構造であることが考えられている。活性型の核タンパク質フィラメントは ssDNA と dsDNA の3つの塩基のペアのらせんピッチが形成されており、このペアは B 型 DNA 構造と同様な DNA 構造であることが知られている。また、核タンパク質フィラメントにより形成した DNA は引き延ばされた構造をとることから、ssDNA と dsDNA がアニールすることにより塩基対を形成することができると考えられている。そのため、相同組換えの DNA 鎖交換反応が円滑に進行することができると考えられている [10]、[11]。

RecA による組換え修復や相同組換えは体細胞分裂期と減数分裂期にて起こっている。体細胞分裂期での組換え修復は、放射線照射による2本鎖切断などの損傷ゲノムを修復するために働く。一方、減数分裂期での相同組換えは、母由来の染色体と父由来の染色体を交叉させることによって両親の遺伝情報を混じり合わせるために働く。以下、RecA による組換え修復による DNA 鎖交換反応の反応機構について述べる。エキソヌクレアー

ゼ活性の機能を持つ DNA 分解酵素は、放射線・紫外線照射などにより損傷・切断した dsDNA を削り込むことによって ssDNA 領域の 3'末端を産出する。その後、RecA タンパク質はその産出した ssDNA にフィラメント上に結合することによって核タンパク質フィラメントを形成する。この核タンパク質フィラメントは損傷を逃れた DNA の dsDNA 領域を検索することが可能であるため、相同鎖の検索後、その相同鎖領域内へ入り込むことができる。これにより、DNA の ssDNA 領域と dsDNA 領域が交換される。

本研究では、RecA の ssDNA 認識領域のペプチドに対して化学的に蛍光化合物 Atto488 を修飾した蛍光 ssDNA 結合ペプチド (ssBP-488) を開発した。

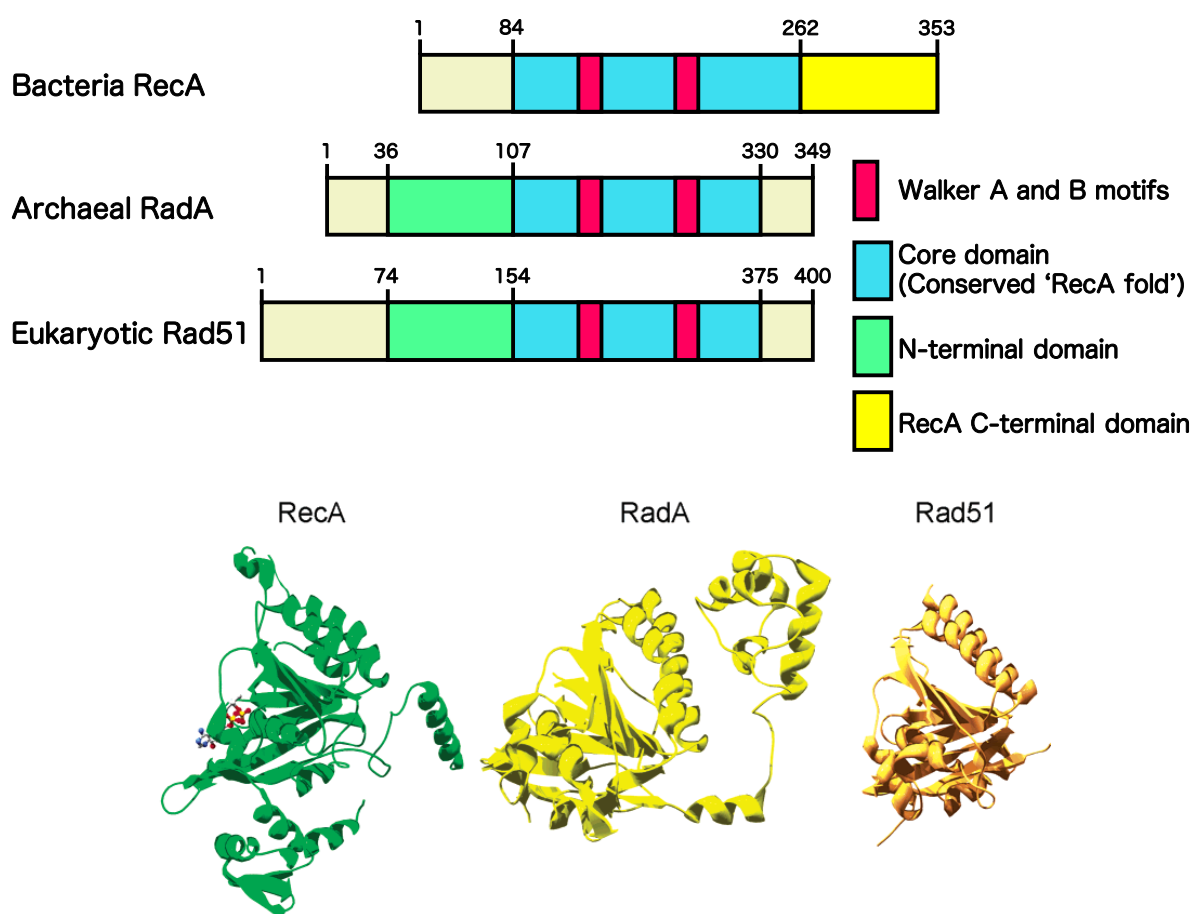


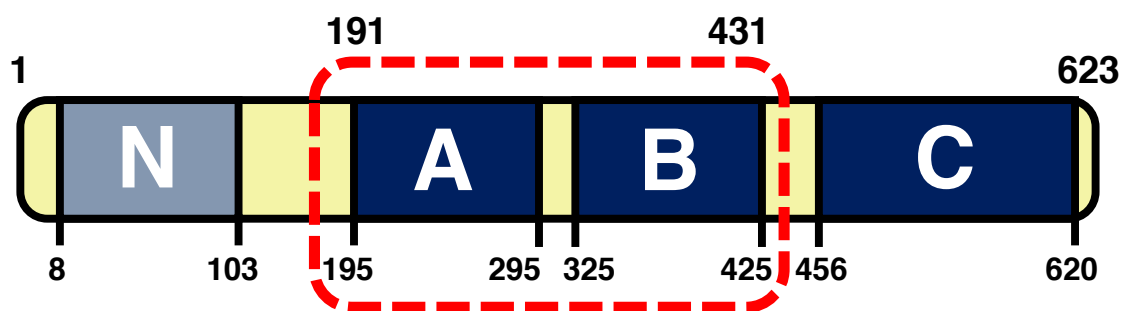
図 3-3. 組換えタンパク質である真正細菌 RecA、真核生物 Rad51、古細菌 RadA のドメイン構造と立体構造 [10]

§ 3.2 実験手順及び操作

3.2.1 RPA-YFP 融合タンパク質発現ベクターDNA の構成

本研究では、蛍光タンパク質の一種である黄色蛍光タンパク質 (YFP) 遺伝子がクローニングされた pET 系タンパク質発現システムの pET32a タンパク質発現ベクターDNA である pET32a-eYFP に対して、アミノ酸残基の 191 ~ 431 番残基である DBD-A、DBD-B の ssDNA 結合ドメインを含む mouse RPA70 kDa サブユニット遺伝子を挿入することによって RPA-YFP 融合タンパク質発現ベクターDNA を設計した [5]。図 3-4 は mouse RPA のドメイン構造を示す。図 3-5 は RPA-YFP 融合タンパク質発現ベクターDNA のベクターマップを示す。

Mouse (*Mesocricetus auratus*) RPA70



A : ssDNA Binding Domain (DBD) A

B : DBD-B

C : DBD-C

N : アミノ基末端領域 (オリゴヌクレオチド結合フォールド)

図 3-4. mouse RPA70 のドメイン構造 赤点線は本研究にて設計したアミノ酸残基の 191 ~ 431 番残基である DBD-A、DBD-B の ssDNA 結合ドメインを含んだ mouse RPA 70 kDa サブユニットの RPA 遺伝子である。

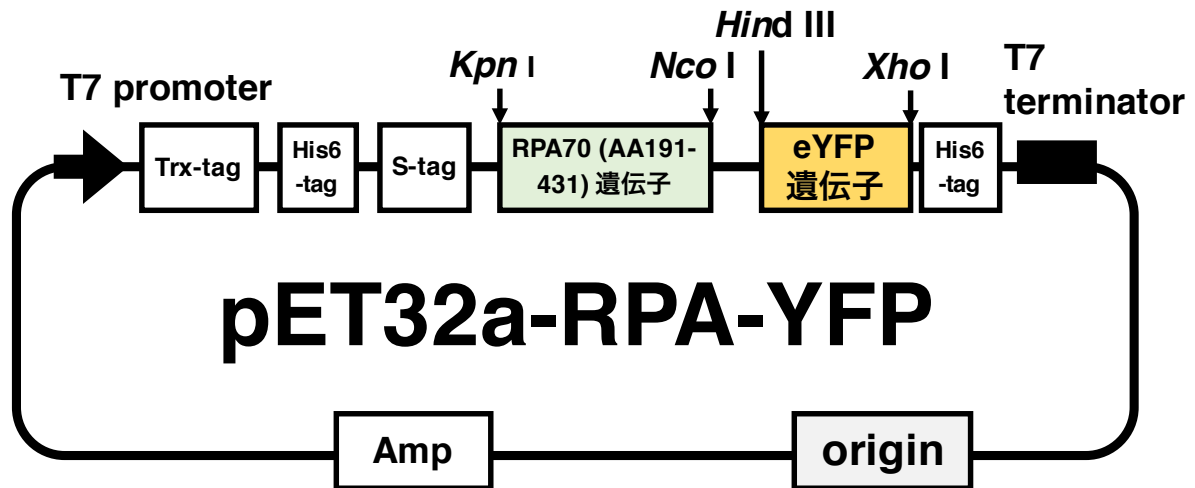


図 3-5. RPA-YFP 融合タンパク質発現ベクターDNA のベクターマップ RPA-YFP 融合タンパク質発現ベクターDNA は左から T7 プロモーター配列、Trx タグ、His6 タグ、S タグ、ssDNA 結合能を持つ RPA70-kDa サブユニット、YFP、His6 タグ、最後に T7 ターミネーター配列となるように設計した。

3.2.2 RPA-YFP の培養、発現、精製、ssDNA 結合活性の測定

3.2.2.1 大腸菌の培養と RPA-YFP タンパク質発現

本研究にて使用した pET 系のタンパク質発現システムは T7 RNA ポリメラーゼと T7 プロモーターによりタンパク質の発現量を高める目的として設計されている。pET 系タンパク質発現システムでは、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子が L8-UV5 lac プロモーターの支配下に組み込まれたバクテリオファージ λ DE3 の溶原菌を宿主として用いる必要がある。このため、本研究では宿主細胞として大腸菌 B 株 Rossetta(DE3) を用いた。遺伝子発現誘導剤である Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) の添加により Lac リプレッサーが L8-UV5 lac プロモーター下流の lac オペレーターから解離することで、T7 RNA ポリメラーゼ遺伝子の転写が開始される。L8-UV5 lac プロモーターとは L8 と UV5 に対して変異を導入した lac プロモーターである。具体的には L8 は培地中のグルコース量減少により転写の活性化への応答が著しく低下する変異であり、タンパク質発現誘導時の lac プロモーター活性は極めて低くなる。また、UV5 は L8 変異のサプレッサーとして単離された変異であり、マイナス 10 領域がコンセンサス配列 (5'-TATAAT-3') TATA ボックスとなるため、タンパク質発現誘導時のプロモーター活性が回復する。このため、L8-UV5 変異により IPTG 添加時の lac プロモーターからの転写が強く促進され、T7 RNA ポリメラーゼが発現する。この T7 RNA ポリメラーゼは T7 プロモーターのみ作用するために、プラスミド上

にある T7 プロモーター支配下のクローニング遺伝子のみを選択的に転写することが可能となり、大量に目的のタンパク質を発現することができる [9]。本研究では、大腸菌宿主細胞である Rosetta(DE3)pLysS へ形質転換した RPA-YFP 融合タンパク質発現ベクター-DNA の培養と発現の操作を行った。

1. RPA-YFP 融合タンパク質発現ベクター-DNA を取込むことにより形質転換した Rosetta(DE3)pLysS を用いて、滅菌済み 10 mL の試験管内に 1% グルコース、1 x クラムフェニコール、1 x 抗生物質（アンピシリン）、8.98 mL Luria-Bertani (LB) 培地（全量 10 mL）を加え、試験管内に形質転換した形質転換後の大腸菌を植菌することによって 30°C で一晩振とう培養した（前培養）。

【試薬調製表 3-1】

Sample	Volume (Vol.)	Final Conc.
LB 培地	8.98 mL	
1,000 x アンピシリン	10 μ L	1 x アンピシリン
1,000 x クロラムフェニコール	10 μ L	1 x クロラムフェニコール
10% グルコース	1 mL	1%

2. 培養した菌体溶液の濁度を目視にて確認後、滅菌済み LB 培地（全量 100 mL）を含む滅菌済み 300 mL のフラスコ内に最終濃度 1% グルコース、1 x クロラムフェニコール、1 x アンピシリンとなるように加え、さらに、300 mL のフラスコ内に実験操作 1 にて前培養した菌体溶液を加えた後、30°C、60 分間程度振とう培養した。

【試薬調製表 3-2】

Sample	Vol.	Final Conc.
LB 培地	100 mL	
1,000 x アンピシリン	110 μ L	1 x アンピシリン
1,000 x クロラムフェニコール	110 μ L	1 x クロラムフェニコール
10% グルコース	10 mL	1%

3. 実験操作 2 の振とう培養した菌体溶液内に最終濃度 1 mM IPTG（110 μ L の 1 M IPTG）を加え、30°C、3時間程度、再度振とう培養した。
4. 35 mL のボトル（50PP ボトルクミ、Hitachi koki、Tokyo、Japan）に実験操作 3 の

菌体溶液を加え、4℃、5,000 r.p.m.、10 分間に高速冷却遠心機 (Himac, CR21、Hitachi, Tokyo, Japan) を設定し、菌体溶液を含む 35 mL ボトルを遠心することによって菌体を回収後、80℃のフリーザー (VT-78, Nihon Freezer, Tokyo, Japan) に保存した。

5. 菌体回収後の溶液は、滅菌処理後に捨てた。

3.2.2.2 RPA-YFP タンパク質の精製

RPA-YFP 融合タンパク質発現ベクターDNA にはアミノ基末端領域とカルボキシル基末端領域にヘキサヒスチジンタグ (His6 タグ) が融合されている。His6 タグは6つのヒスチジンが連なるアミノ酸配列 (HHHHHH) であり、pH 8 以上の条件下にて金属イオンをキレートすることにより6つのヒスチジン残基が Ni-NTA 担体に結合する。Nitrilotriacetic acid (NTA) はニッケルイオン (Ni²⁺) の6つの結合箇所の4箇所と結合することから、残りの2箇所は結合してないために、ヒスチジンが NTA のフリーの2箇所に結合する。自然界において、His6 タグのような構造を持つタンパク質は非常に稀であるため、His6 タグが融合されたタンパク質を精製することが可能である。本研究では Ni-NTA spin kit (QIAGEN) を用いることにより RPA-YFP タンパク質を精製した。

1. 「3.2.3.1 大腸菌培養と RPA-YFP タンパク質発現」にて菌体回収した 35 mL のボトルに 3 mL の Purification A Buffer (PA Buffer) (50 mM リン酸緩衝液 pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM イミダゾール, 10% glycerol) を加え、再懸濁した。その後、5 分間ごとにタッピングし、30 分間氷上で静置した。
2. 超音波破碎機である超音波式ホモジナイザー (VP-050, TAITEC, Tokyo, Japan) を超音波 Power 30% に設定し、1 秒 ON、3 秒 OFF の間隔にて 10 回超音波を実験操作 1 のボトル内の菌体懸濁液にあてることを 1 セットとして定義したとき、この操作を 10 セット繰り返し超音波処理することによって菌体を粉碎した。
3. 4℃、12,000 r.p.m.、10 分間に高速冷却遠心機を設定し、実験操作 2 の菌体を粉碎した溶液を含む 35 mL のボトルを遠心することによって粉碎した菌体の上清を回収した。回収した上清は氷上で扱った。
4. Ni-NTA スピнкаラムに 600 μL の PA Buffer を加え、5 分間静置後、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機 (Himac, CT 13R, Hitachi, Tokyo, Japan) を設定し、Ni-NTA スピнкаラムを遠心することによって Ni-NTA スピнкаラムを平衡化した。
5. 実験操作 3 にて、600 μL ごとに Ni-NTA スピнкаラムに回収した上清を加えた後、2,000 r.p.m.、5 分間に卓上遠心機を設定し、Ni-NTA スピнкаラムを遠心した。このと

- き、上清の菌体破碎溶液が無くなるまで遠心を繰り返した。
6. 実験操作 5 の Ni-NTA スピнкаラムに 600 μL の PA Buffer を加えた後、2,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定し、Ni-NTA スピнкаラムを遠心することにより洗浄処理した。この洗浄作業は 2 回繰り返した。
 7. 実験操作 6 の Ni-NTA スピнкаラムに 300 μL の Purification B Buffer (PB Buffer) (50 mM リン酸緩衝液 pH 8.0、150 mM NaCl、500 mM イミダゾール、10% glycerol) を加え、2,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定し、Ni-NTA スピнкаラムを遠心することによって目的タンパク質を溶出した。この時、Ni-NTA スピнкаラムに蓋を切除した 1.5 mL のマイクロチューブをのせ、目的タンパク質を溶出した。
 8. 1.5 mL の遮光マイクロチューブに溶出した RPA-YFP タンパク質の 20 μL の溶液を分注し、 -80°C のフリーザー内に保存した。

3.2.2.3 RPA-YFP タンパク質の濃度測定

タンパク質濃度の定量法として Bradford 法がある。Bradford 法は分光光度計 (UVmini-1240、Shimadzu、Kyoto、Japan) を用いて、Bradford 色素を結合させたタンパク質の吸光度の差を測定することによってタンパク質濃度を計測することができる。本実験では既知の濃度である 2 mg/mL 牛血清アルブミン (BSA) (Bio-Rad、Hercules、CA、USA) 溶液を指標として検量線を作成し、精製した RPA-YFP の濃度を測定した。なお、吸光度計の測定波長は $\lambda = 595 \text{ nm}$ に設定した。

1. 4本の 1.5 mL のマイクロチューブにて、1 mL の Bradford 溶液 (Bio-Rad) を加えた後、0、0.1、0.3、0.5 mg/mL BSA をそれぞれ加え、ボルテックスミキサーによって攪拌した後、5 分間静置した。
2. 1.5 mL のプラスチックセル (As One、Osaka、Japan) に全量投入し、分光光度計 (UVmini-1240、Shimadzu) を用いて各々の吸光度を測定した。
3. 4本の 1.5 mL のマイクロチューブにて、1 mL Bradford 溶液を加えた後、0、3、6、9 μL の精製 RPA-YFP タンパク質をそれぞれ加えた。その後、ボルテックスミキサーによって攪拌し、5 分間静置した。
4. プラスチックセルに全量投入し、吸光光度計を用いることによって各々の吸光度を測定した。この時、タンパク質定量の吸光度波長 $\lambda = 595 \text{ nm}$ に設定した。
5. 吸光度測定後、検量線を用いることにより吸光度により得られた精製 RPA-YFP タンパク質の濃度を算出した。

3.2.2.4 RPA-YFP タンパク質のポリアクリルアミドゲル電気泳動法による測定

ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis, SDS-PAGE) はタンパク質の質量を分離することができる。タンパク質の荷電は種類によって大きく異なる。タンパク質は陰イオン系界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (Sodium Dodecyl Sulfate, SDS) により変性し、ミセルを作るため、負に荷電する。陰性に荷電したタンパク質は陽極方向に移動させることが可能であるため、タンパク質の分子量を分離することができる。本研究では SDS-PAGE によるポリアクリルアミド電気泳動により精製した RPA-YFP タンパク質の分子量を測定した。

1. アクリルアミド電気泳動用ゲル板 (NA-1010, Nihon Eido, Tokyo, Japan) を組み立てた。
2. 50 mL のガラスビーカー (Iwaki, Tokyo, Japan) 内にて、分離ゲル液 (10% アクリルアミド溶液 [Nacalai Tesque, Kyoto, Japan]、Tris-HCl pH 8.8、0.1% SDS、0.1% 過硫酸アンモニウム [Ammonium persulfate, APS, Nacalai Tesque]、0.1% テトラメチルエチレンジアミン [Tetramethylethylenediamine, TEMED, Wako, Osaka, Japan]) を調製 (全量 10 mL) 後、組み立てたアクリルアミド電気泳動用ゲル板に流し込んだ後、1時間程度重合させた。このとき、過硫酸アンモニウムと TEMED はゲル板に分離ゲル液を流し込む直前に加えた。

[試薬調製表 3-3]

分離ゲル		
Sample	Vol.	Final conc.
30% アクリルアミド溶液	3.3 mL	10%
1.5 M Tris-HCl pH 8.8	3.4 mL	510 mM
10% SDS	0.1 mL	0.1%
ミリ Q 水	3.1 mL	-
10% 過硫酸アンモニウム	100 μ L	0.1%
TEMED	10 μ L	0.1%

3. 分離ゲルを固めるとき、50 μ L の水和ブタノールを加えることにより界面を平坦化した。分離ゲルが重合した後、50 mL のガラスビーカー内にて、濃縮ゲル (10% アクリルアミド溶液、Tris-HCl pH 6.8、0.1% SDS、0.1% APS、0.1% TEMED) を調製 (全

量 5 mL) 後、組み立てたアクリルアミド電気泳動用ゲル板に流し込んだ後、1時間程度重合させた。このとき、過硫酸アンモニウムと TEMED はゲル板に分離ゲル液を流し込む直前に加えた。

[試薬調製表 3-4]

濃縮ゲル		
Sample	Vol.	Final conc.
30% アクリルアミド溶液	0.83 mL	10%
1 M Tris-HCl pH 6.8	1.26 mL	257 mM
10% SDS	0.05 mL	0.1%
ミリ Q 水	2.77 mL	
10% 過硫酸アンモニウム	50 μ L	0.1%
TEMED	5 μ L	0.1%

4. 分離ゲル及び濃縮ゲルの重合が確認できた後、泳動槽に 1 x SDS 泳動槽用緩衝液を浸した。
5. コームを外し、ピペッティングにより試料溝を洗浄した。
6. 試料を調製した。測定する試料タンパク質に 5 x SDS Sample Buffer (SSB) を投入後、タンパク質が持つ高次構造由来のシフトを防ぐために、95°C、5 分間にて恒温槽 (HB-100、TAITEC) を設定することによって RPA-YFP タンパク質を熱変性処理した。
7. 試料溝に試料を投入した後、30 mA 一定にて電気泳動用電源 (Bio-Rad) を設定することによって電気泳動した。
8. 電気泳動後、ゲル板からポリアクリルアミドゲルを取り出した後、クマシーブリリアントブルー (CBB) 色素にポリアクリルアミドゲルを1時間程度浸した。その後、10% メタノールにてポリアクリルアミドゲルを脱色した。脱色を行う際、溶液にプロワイプを浸した。

3.2.2.5 RPA-YFP の ssDNA Binding-Assay

本研究ではゲル電気泳動移動度シフトアッセイ (Electrophoresis Mobility Shift Assay、EMSA) によって RPA-YFP が ssDNA に結合する活性を確認した。RPA-YFP と Alexa488 修飾 30 mer の合成オリゴヌクレオチド (5'-Alexa488 GAT

CCC TGC CTG CTA TCG ATA GAT TCA GGA-3') を用いることにより Native-PAGE によって RPA-YFP の ssDNA 結合活性を測定した。下記にその手順を述べる。

1. アクリルアミド電気泳動用ゲル板を組み立てた。
2. 50 mL のガラスビーカー内にて、6% アクリルアミド溶液、1 x TBE (89 mM Tris-borate、2 mM EDTA)、0.1% 過硫酸アンモニウム、0.1% TEMED を含むアクリルアミド溶液) を調製 (全量 15 mL) 後、組み立てたアクリルアミド電気泳動用ゲル板に流し込み、コームを差し込んだ後、1時間程度重合させた。このとき、過硫酸アンモニウムと TEMED はアクリルアミドゲル溶液を流し込む直前に投入した。

[試薬調製表 3-5]

Sample	Vol.	Final conc.
30% アクリルアミド溶液	3 mL	6%
5 x TBE	3 mL	1 x TBE
Milli Q	9 mL	-
10%過硫酸アンモニウム	200 μ L	0.1%
TEMED	200 μ L	0.1%

3. アクリルアミドゲルの重合が確認できた後、泳動槽に 1 x TBE 泳動槽用緩衝液を浸した後、コームを取り除くことによりピペッティングにより試料溝を洗浄した。
4. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、9 μ g の RPA-YFP、20 pmol の Alexa488-合成オリゴヌクレオチドを含む緩衝液 (50 mM HEPES pH 8.0、1 mM EDTA、10% Glycerol、0.1% Tween 20、0.02% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 20 μ L) 後、30 分間、室温にてインキュベートした後、調製溶液を含む 0.6 mL のマイクロチューブ内に 2 μ L の 10 x Loading buffer (TaKaRa) を加えた。

[試薬調製表 3-6]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1M HEPES pH 8.0	0.5	50 mM
50mM EDTA	0.4	1 mM
50% glycerol	4	10%
1% Tween 20	2	0.1%
0.2% 2-Mercaptoethanol	2	0.02%

10 pmol/ μ L Alexa488 合成オリゴヌクレオチド	2	1 pmol/ μ L
1 μ g/ μ L RPA-YFP	9	0.45 μ g/ μ L
滅菌水	Up to 20 μ L	

5. 試料溝に調製試料を投入後、100 V 一定にて電気泳動用電源 powerpac 3000 (Bio-Rad) を設置し、4°C、2～3 時間程度電気泳動した。
6. 電気泳動後、ゲル板からポリアクリルアミドゲルを取り出し、UV イルミネーター (TFML-20、UVP、Upland、California、USA) にて RPA-YFP と Alexa488 修飾合成オリゴヌクレオチドとの蛍光をもとに RPA-YFP の ssDNA 結合活性のバンドを確認した。

3.2.3 微細流路装置の作製

3.2.3.1 PDMS により作製した微細流路装置

本研究にて使用した微細流路装置は polydimethylsiloxane (PDMS) から作製した。PDMS はエストラマーであるため、非常に弾性に優れ、自己吸着性があり、簡便で安価に作製することが可能である。マイクロ化学分析に PDMS を利用する際の利点としていくつかの点が挙げられる。(1) PDMS はサブミクロンオーダーの精度で鋳型の形状を転写できる。(2) PDMS の表面が粘着性を持つため、ガラス基板表面に PDMS を接合する工程が不要である。(3) PDMS は無色透明であることから、流路内の観察や化学物質の検出に有利である。(4) PDMS は生体物質との相互作用がほとんど無い。本研究では PDMS による微細流路装置を作製するために、鋳型となるガラス基板を作製した [12]、[13]。以下にその手順を述べる。

1. 鋳型となるガラス (Micro slide glass 76 x 26 mm、Matsunami Glass、Osaka、Japan) の両面にプラスチックシール (PCR プレートシール、As One) を貼った。
2. 事前に流路が印刷してある台紙を置き、プラスチックシールに切れ込みを入れた。その後、流路になる部分を残しプラスチックシールを剥がした。
3. 500 mL のフッ酸緩衝液 (1 M HF [フッ化水素]、2 M NH₄F [フッ化アンモニウム]) に作製したガラスを浸漬した。このとき、テフロン製ビーカーを使用した。
4. 数十分おきにガラスの厚さを測定しながらガラスをエッチングした。エッチングレートの目安は 1 μ m/min 程度であり、今回、50 μ m 程度の厚みでエッチングした。
5. エッチング完了後、水道水でガラスを良く濯ぎ、プラスチックシールを剥がした。

3.2.3.2 PDMS シートの作製と微細流路装置の作製

1. エタノールでガラスの型を洗浄した後、プロワイプで水気を取った。
2. 主剤 (Sylgard 184 silicone elastomer base、Dow corning、midland、MI、USA) : 重合剤 (Sylgard 184 silicone elastomer curing agent CURING AGENT、Dow corning) = 10 : 1 (2 g の主剤、0.2 g の重合剤) の割合にて採取した後、よく混合し、微細流路のガラス型に流し込み 100°C に設定したインキュベーター内にて2時間以上バークすることによって硬化させた。
3. 硬化した PDMS シートは丁寧にガラスの型から取り外した後、ステンレスパイプ (SUS304、外径 3.06 mm、厚さ 0.21 mm、長さ 500 mm、Nilaco) を用いることによって NanoPort (N-124S、Upchurch、Oak Harbor、WA、USA) を設置する部分に穴を開けた。
4. NanoPort (メス) の底面にシリコン接着剤 (Shin-Etsu Chemical、Tokyo、Japan) を適量塗布することによって PDMS シートを貼り付けた後、室温で一晩放置した。このとき、接着剤の量が多いと PDMS シートに開けた穴が塞がるので注意した。
5. Polyetheretherketone (PEEK) チューブ (内径 100 μm 、外径 360 μm 、1571-12X、Upchurch) に NanoPort (オス) を差し込んだ後、シリコン接着剤を用いることによって接着した後、室温にて一晩放置した。

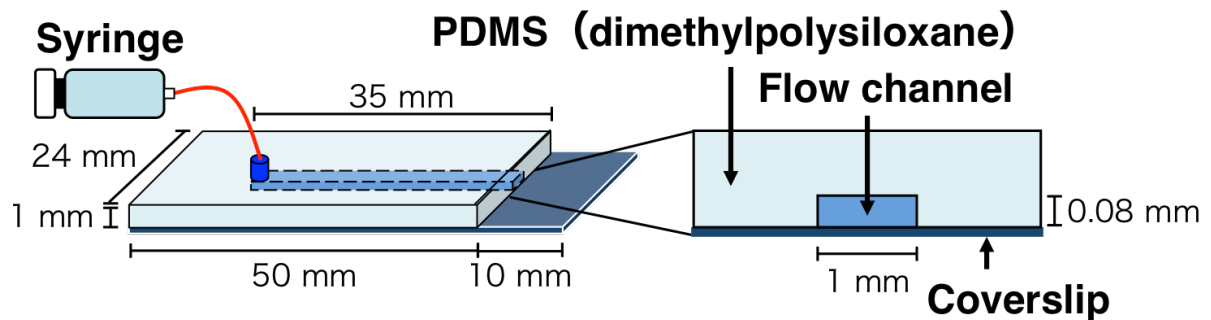


図 3-6. 本研究にて開発した微細流路装置の概要図

3.2.4. ジクロロジメチルシラン修飾ガラス基板の作製

3.2.4.1 ジクロロジメチルシラン修飾ガラス基板表面の修飾と片端チオール化

DNA の固定化

本研究ではジメチルジクロロシラン修飾処理をしたガラス基板表面と DNA の片端へチオール修飾した λ DNA (片端チオール化 λ DNA) を用いることで、片端チオール化 λ DNA の片端はジメチルジクロロシラン修飾ガラス基板表面に固定した。以下にガラス基板表面での反応機構を示す [7、8]。

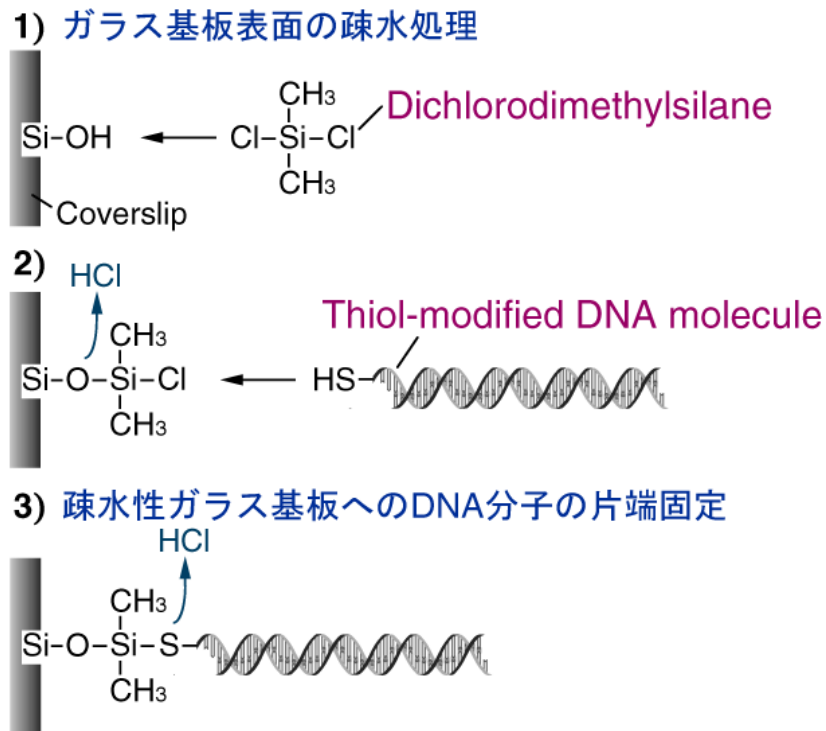


図 3-7.ジメチルジクロロシラン修飾ガラス基板と片端チオール化 DNA の片端固定の概要図

3.2.4.2 ジメチルジクロロシラン修飾ガラス基板の作製

微細流路内のガラス基板表面に DNA の片端を固定するためには、ガラス基板表面を修飾する必要がある。本研究ではジメチルジクロロシランを用いることによってガラス基板表面にジメチルジクロロシランを蒸着した [12]、[13]。以下にその手順を述べる。

1. スライドガラス用カゴにスライドガラス (24 x 60 mm、Matsunami Glass) を差し込み、1% (V/V) コンタミンオン US (Wako) を含む 200 mL のミリQ水を調製、投入した後、30 分間超音波洗浄した。
2. アセトン、エタノール、ミリQ水の順番で 2 回程度、実験操作 1 の処理済みのスライドガラスを洗浄した後、スライドガラスが入ったスライドガラス用ガラスケースに 30% 過酸化水素水 (18411-25、Nacalai Tesque) を浸した。その後、4°C、一晩、スライドガラスを放置した。
3. 大型ビーカーに 200 mL 程度のミリQ水を投入した後、実験操作 2 の処理をした改質スライドガラスを投入することにより洗浄した。この時、ゆっくり引き上げることによって水滴がつかないように注意した。
4. 小型薬瓶に 1 mL のジメチルジクロロシラン (LS-130、Shin-Etsu Chemical) を投入し、ジメチルジクロロシラン専用の真空デシケーター内に改質したスライドガラスとジメチルジクロロシランを置いた後、水流アスピレーター (AS-01、As One) を使い、真空デシケーター内の気圧を減圧することによってガラス基板表面にジメチルジクロロシランを蒸着させた。
5. ガラス基板に 30 分間程度ジメチルジクロロシランを蒸着した後、100°C、2~3 時間程度ジメチルジクロロシラン蒸着ガラス基板表面をベークすることによってガラス基板表面にジメチルジクロロシランを定着させた。その後、ガラスケース内で保存した。

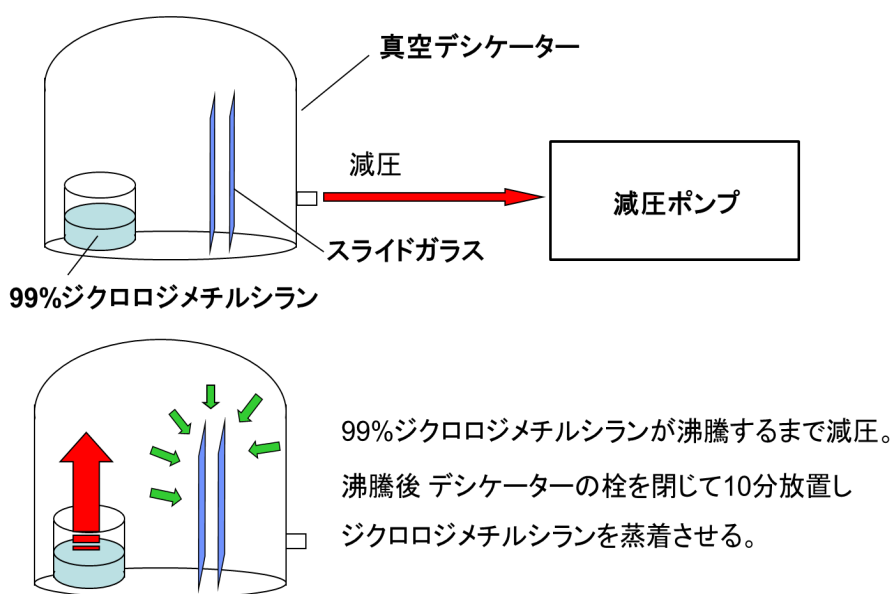


図 3-8. ジクロロジメチルシラン蒸着法によるガラス基板表面修飾の概要図

3.2.5 片端チオール化 DNA の作製

ジメチルジクロロシラン修飾ガラス基板表面に直鎖状 DNA の片端を固定するためには直鎖状 DNA の片端をチオール化修飾する必要がある。本研究では直鎖状 DNA である λ DNA (Nippon Gene、Tokyo、Japan) の片端をチオール化修飾することによって片端チオール化 λ DNA を作製した。下記にその手順を述べる [12]、[13]。

1. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、39.6 μ g の λ DNA、400 pmol のチオール化合成オリゴヌクレオチド 1 (チオール修飾-5'-CGT AGT GTC CTA TCT-3'、Sigma)、400 pmol のチオール化合成オリゴヌクレオチド 2 (5'-リン酸-GGG CGG CGA CCT AGA TAG GAC ACT ACG-3'-チオール修飾、Sigma) を全量 155 μ L の溶液を調製した。

[試薬調製表 3-7]

Sample	Vol. (μ L)	投入量
440 ng/ μ L λ DNA	90	39.6 μ g
100 pmol/ μ L チオール化合成オリゴヌクレオチド 1	2	200 pmol
100 pmol/ μ L チオール化合成オリゴヌクレオチド 2	2	200 pmol
滅菌水	Up to 155 μ L	

2. λ DNA のコンカテマー形成を防ぐために、恒温槽内 (TAITEC) を用いて、65°C、5 分間、実験操作 1 の調製溶液を含む 0.6 mL マイクロチューブを加熱処理した。その後、氷上で急冷した。
3. 実験操作 2 の 0.6 mL マイクロチューブ内に T4 DNA リガーゼ (TaKaRa) 付属の 10 x Ligation buffer (660 mM Tris-HCl pH 7.6、66 mM MgCl₂、100 mM DTT、1 mM ATP、TaKaRa) を 1 x Ligation buffer となるよう加えた後、2,450 U の T4 DNA リガーゼ (350 U/ μ L、TaKaRa) をさらに加えて、恒温槽内にて 16°C、12 時間程度インキュベートした (全量 180 μ L)。
4. T4 DNA リガーゼを失活させるために、恒温槽内にて 65°C、5 分間、実験操作 3 の調製溶液を含む 0.6 mL のマイクロチューブをインキュベートした後、室温まで自然冷却した。
5. 4 本のマイクロスピニングカラム S-400 (GE Healthcare、Little Chalfont、Buckinghamshire、England) を準備した。3,000 r.p.m.、1 分間に卓上遠心機

を設定し、マイクロスピнкаラム S-400 を遠心することによってマイクロスピ
ンカラム S-400 内の内容液を除去した。

6. 2本のマイクロスピнкаラム S-400 に実験操作 4 の DNA 溶液を半量ずつ (90 μL) 加え、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピнкаラム S-400 を遠心することによって DNA を精製した。その後、残りの 2 本のマイクロスピнкаラム S-400 に精製した DNA 溶液を移した後、再度 3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピнкаラム S-400 を遠心することによって再度 DNA を精製した。
7. 精製した DNA 溶液の収量を測った。その後、新たな 1.5 mL のマイクロチューブ内にまとめた。
8. チオール化合物オリゴヌクレオチドのチオール基には酸化防止のために、保護基が付加されていることから、0.6 mL のマイクロチューブ内にて、精製した片端チオール化 λ DNA 溶液、167 mM リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.0、40 mM DTT を調製した後、恒温槽内にて 25°C、16 時間、脱保護基反応を実行した。

[試薬調製表 3-8]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1M リン酸ナトリウム緩衝液 pH 8.0	50	167 mM
1M DTT	12	40 mM
滅菌水	Up to 100 μL	

9. 脱気した 10 mL の 1 x TE にて NAP-5 カラム (GE Healthcare) を平衡化した。これ以降の操作は 4°C で行った。
10. 実験操作 8 の脱保護基反応した片端チオール化 λ DNA 溶液量が全量 500 μL になるように、1 x TE にてメスアップした。その後、NAP-5 カラムに DNA 溶液を加えた。この時、NAP-5 カラムを通して排出された溶液は回収しなかった。
11. NAP-5 カラムに脱気した 100 μL の 1 x TE を加えた。この時の NAP-5 カラムを通して排出された溶液は回収しなかった。
12. NAP-5 カラムに 1 mL の 1 x TE を加えた後、1.5 mL のマイクロチューブ内にて、NAP-5 カラムを通して溶出した片端チオール化 λ DNA 溶液を回収した。
13. 各 30 μL に精製 DNA 溶液を分注後、-20°C にて保存した。精製片端チオール化 λ DNA 溶液は分光光度計 (UVmini-1240、Shimadzu) を用いることにより吸光度の計測し、さらにアガロースゲル電気泳動法によって片端チオール化 λ DNA の濃度を算出した。

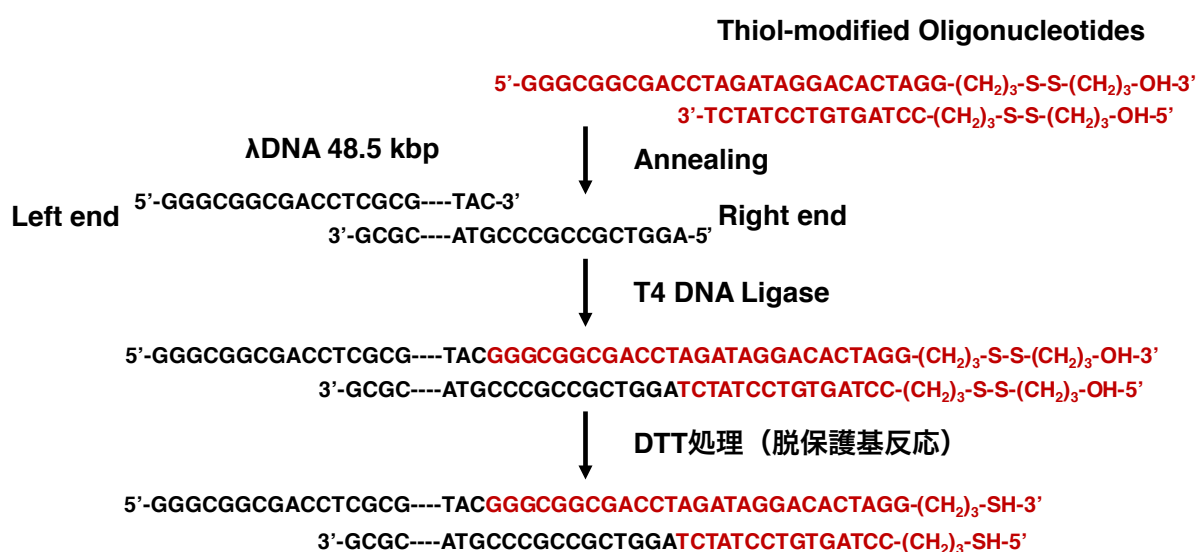


図 3-9. 片端チオール化 λDNA の調製

3.2.6 1 本鎖化λDNA の動的挙動の直接観察

個々の1本鎖化λDNA (single-stranded λDNA、ssλDNA) の片端は微細流路装置の流路内のガラス基板表面に固定した。本研究では RPA-YFP および ssBP-488 (Sigma Aldrich、AT. Louis、MO、USA) により標識した ssλDNA の直接観察を試みた。なお、特に指定しない限り片端チオール化 λDNA は λDNA として記載した。本研究で用いたマイクロシリンジポンプは KD Scientific 社製 KDS-100 (Holliston、MA、USA) を用いた。マイクロシリンジは、ハミルトン社製 250 μL のマイクロシリンジ (Reno、NV、USA) を用いた。以下にその手順を述べる。

3.2.6.1 ssλDNA 及び oligo-ssλDNA の調製

1. λDNA の片端にオリゴヌクレオチドを付加した ssλDNA (oligo-ssλDNA) は、0.2 mL マイクロチューブ内にて、160 ng の片端チオール化 λDNA、100 pmol の合成オリゴヌクレオチド (5'-CGT AAC CTG TCG GAT CAC CGG AAA G-3'、Japan Bio Services、Saitama、Japan)、1 x Polymerase Chain Reaction (PCR) Buffer (TaKaRa)、1 x TE を加え、全量 30 μL にて調製した。

[試薬調製表 3-9]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
8 ng/ μL 片端チオール化 λDNA	20	5.3 ng/ μL
100 pmol/ μL 合成オリゴヌクレオチド	1	3.33 pmol/ μL
10 x PCR Buffer	3	1 x PCR Buffer
5 x TE	6	1 x TE
脱気滅菌水	Up to 30 μL	

2. 0.2 mL のマイクロチューブ内にオリゴヌクレオチドを付加しない ss λDNA (ss λDNA) は 160 ng の片端チオール化 λDNA 、1 x PCR Buffer、1 x TE を加え、全量 30 μL にて調製した。

[試薬調製表 3-10]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
8 ng/ μL 片端チオール化 λDNA	20	5.3 ng/ μL
10 x PCR Buffer	3	1 x PCR Buffer
5 x TE	6	1 x TE
脱気滅菌水	Up to 30 μL	

3. PCR 装置である TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (TP600、TaKaRa) に調製溶液を含む 0.2 mL のマイクロチューブを設置した後、以下のプログラムを実行することにより熱変性によって片端チオール化 λDNA を 1 本鎖化した (ss λDNA 、oligo-ss λDNA)。

表 3-1. 温度制御プログラム

	cycle 数	時間[秒]	温度[$^{\circ}\text{C}$]
First Step	1 cycle	60	95 $^{\circ}\text{C}$
Second Step	1 cycle	360	58 $^{\circ}\text{C}$
Third Step	1 cycle	∞	4 $^{\circ}\text{C}$

3.2.6.2 ssBP-488 による 1 本鎖化λDNA の動的挙動の直接観察

1. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、320 ng (dsDNA = 2 x ssDNA) の oligo-ssλDNA を含む緩衝液 (25 mM HEPES pH 8.0、1 mM EDTA、10% glycerol、0.1% Tween 20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによってジメチルジクロロシラン基板表面に oligo-ssλDNA の片端を固定した。

[試薬調製表 3-10]

Sample	Vol. (μL)		Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	5	5	25 mM
50 mM EDTA	4	4	1 mM
50 % glycerol	40	40	10 %
1 % Tween 20	20	20	0.1 %
10 % 2-Mercaptoethanol	50	50	2.5 %
10.6 ng/μL oligo-ssλDNA	30	-	1.59 ng/μL
10.6 ng/μL ssλDNA	-	30	1.59 ng/μL
脱気滅菌水	Up to 200 μL		

2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、40 μg の BSA を含む緩衝液 (25 mM HEPES pH 8.0、1 mM EDTA、10% glycerol、0.1% Tween 20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによってガラス基板表面をブロッキングした。

[試薬調製表 3-11]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	5	25 mM
50 mM EDTA	4	1 mM
50% glycerol	40	10%
1% Tween 20	20	0.1%
10% 2-Mercaptoethanol	50	2.5%
2 mg/mL BSA	20	0.2 μg/μL

脱気滅菌水	Up to 200 μ L	
-------	-------------------	--

3. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、11 pmol の ssBP-488 を含む緩衝液 (25 mM HEPES pH 8.0、1 mM EDTA、10% glycerol、0.1% Tween 20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによって oligo-ss λ DNA に ssBP-488 を結合させた (ssBP-488-oligo-ss λ DNA)。

[試薬調製表 3-12]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	5	25 mM
50 mM EDTA	4	1 mM
50% glycerol	40	10%
1% Tween 20	20	0.1%
10% 2-Mercaptoethanol	50	2.5%
2.68 pmol/ μ L ssBP-488	4	0.055 pmol/ μ L
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

4. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、緩衝液 (25 mM HEPES pH 8.0、1 mM EDTA、10% glycerol、0.1% Tween 20、2.5% 2-Mercaptoethanol、全量 200 μ L) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによって微細流路内のフリーな ssBP-488 による余剰な蛍光を取り除いた。その後、5 分間ごとに 45 分間、ssBP-488-oligo-ss λ DNA を観察した。

[試薬調製表 3-13]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	5	25 mM
50 mM EDTA	4	1 mM
50% glycerol	40	10%
1% Tween 20	20	0.1%
10% 2-Mercaptoethanol	50	2.5%
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

5. ssBP-488-ss λ DNA の観察は ssBP-488-oligo-ss λ DNA の観察と同様な実験操作で実験を行なった。
6. 同一の顕微鏡視野内にて、ssBP-488-ss λ DNA 及び ssBP-488-oligo-ss λ DNA をビデオレートでの撮影後、画像化した。ssDNA 領域の蛍光領域をもとに ImageJ を用いることによって ssBP-488-ss λ DNA 及び ssBP-488-oligo-ss λ DNA の長さを解析した。

3.2.6.3 RPA-YFP による 1 本鎖化 λ DNA の動的挙動の直接観察

1. 0.6 mL マイクロチューブ内にて、320 ng の oligo-ss λ DNA を含む緩衝液 (25 mM HEPES pH 8.0、1 mM EDTA、10% glycerol、0.1% Tween 20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによってジメチルジクロロシラン基板表面に oligo-ss λ DNA の片端を固定した。

[試薬調製表 3-14]

Sample	Vol. (μ L)		Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	5	5	25 mM
50 mM EDTA	4	4	1 mM
50 % glycerol	40	40	10 %
1 % Tween 20	20	20	0.1 %
10 % 2-Mercaptoethanol	50	50	2.5 %
10.6 ng/ μ L oligo-ss λ DNA	30	-	1.59 ng/ μ L
10.6 ng/ μ L ss λ DNA	-	30	1.59 ng/ μ L
脱気滅菌水	Up to 200 μ L		

2. 0.6 mL マイクロチューブ内にて、40 μ g の BSA (Bio-Rad) を含む緩衝液 (25 mM HEPES pH 8.0、1 mM EDTA、10% glycerol、0.1% Tween 20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによってガラス基板表面をブロッキングした。

[試薬調製表 3-15]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
--------	-----------------	-------------

1 M HEPES pH 8.0	5	25 mM
50 mM EDTA	4	1 mM
50% glycerol	40	10%
1% Tween20	20	0.1%
10% 2-Mercaptoethanol	50	2.5%
2 mg/mL BSA	20	0.2 µg/µL
脱気滅菌水	Up to 200 µL	

3. 0.6 mL マイクロチューブ内にて 20 µg の RPA-YFP を含む緩衝液 (25 mM HEPES pH 8.0、1 mM EDTA、10% glycerol、0.1% Tween 20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を 0.6 mL のマイクロチューブ内にて調製 (全量 200 µL) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによって oligo-ssλDNA に RPA-YFP を結合させた (RPA-YFP-oligo-ssλDNA)。

[試薬調製表 3-16]

Sample	Vol. (µL)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	5	25 mM
50 mM EDTA	4	1 mM
50% glycerol	40	10%
1% Tween 20	20	0.1%
10% 2-Mercaptoethanol	50	2.5%
1 µg/µL RPA-YFP	20	0.1 µg/µL
脱気滅菌水	Up to 200 µL	

4. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、緩衝液 (25 mM HEPES pH 8.0、1 mM EDTA、10% glycerol、0.1% Tween 20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 200 µL) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによって微細流路内のフリーな RPA-YFP による余剰な蛍光を取り除いた。その後、5 分間ごとに 45 分間、RPA-YFP-oligo-ssλDNA を観察した。

[試薬調製表 3-17]

Sample	Vol. (µL)	Final conc.
--------	-----------	-------------

1 M HEPES pH 8.0	5	25 mM
50 mM EDTA	4	1 mM
50% glycerol	40	10%
1% Tween 20	20	0.1%
10% 2-Mercaptoethanol	50	2.5%
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

5. RPA-YFP-ss λ DNA の観察は RPA-YFP-oligo-ss λ DNA の観察と同様な実験操作で実験を行なった。
6. 同一の顕微鏡視野内にて、RPA-YFP-ss λ DNA 及び RPA-YFP-oligo-ss λ DNA をビデオレートでの撮影後、画像化した。ssDNA 領域の蛍光領域をもとに ImageJ を用いることによって RPA-YFP-ss λ DNA 及び RPA-YFP-oligo-ss λ DNA の長さを解析した。

3.2.6.4 塩を含む緩衝液内での λ DNA の ssDNA 領域の動的挙動の直接観察

1. 上記に同様な実験操作にて、ssBP-488-oligo-ss λ DNA 及び RPA-YFP-oligo-ss λ DNA を可視化した。
2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、100 mM、200 mM、500 mM、1 M、2 M NaCl を含む緩衝液 (25 mM HEPES pH 8.0、1 mM EDTA、10% glycerol、0.1% Tween20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジへ充填し、微細流路内に注入することにより各塩濃度によって ssBP-488-oligo-ss λ DNA 及び RPA-YFP-oligo-ss λ DNA の動的挙動を観察した。

[試薬調製表 3-18]

Sample	Vol. (μ L)					Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	5	5	5	5	5	25 mM
50 mM EDTA	4	4	4	4	4	1 mM
50% glycerol	40	40	40	40	40	10%
1% Tween 20	20	20	20	20	20	0.1%
10% 2-Mercaptoethanol	50	50	50	50	50	2.5%
2 M NaCl	10	-	-	-	-	0.1 M
2 M NaCl	-	20	-	-	-	0.2 M

5 M NaCl	-	-	20	-	-	0.5 M
5 M NaCl	-	-	-	40	-	1 M
5 M NaCl	-	-	-	-	80	2 M
脱気滅菌水	Up to 200 μ L					-

3. マイクロシリンジポンプによる流路内の水溶液の流れを停止した時の ssBP-488-oligo-ss λ DNA 及び RPA-YFP-oligo-ss λ DNA の動的挙動を観察した。
4. 同一の顕微鏡視野内にて、ssBP-488-oligo-ss λ DNA 及び RPA-YFP-oligo-ss λ DNA をビデオレートでの撮影後、画像化した。ssDNA 領域の蛍光領域をもとに ImageJ を用いることによって ssBP-488-oligo-ss λ DNA 及び RPA-YFP-oligo-ss λ DNA の長さを解析した。

§3.3 結果及び考察

3.3.1 RPA-YFP のゲル電気泳動法による測定結果

RPA-YFP タンパク質の分子量はポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) によって測定した。測定の結果、RPA-YFP のバンドが約 70 kDa の位置に示された (図 3-10)。設計した RPA-YFP の分子量は約 70 kDa であり、その目的の位置に RPA-YFP のバンドが示された。また、RPA-YFP の ssDNA 結合活性を評価した結果、RPA-YFP が ssDNA に対して結合することによって DNA バンドが上部に大きくシフトしたことから、ssDNA への RPA-YFP の結合の活性があることが示された [5]。

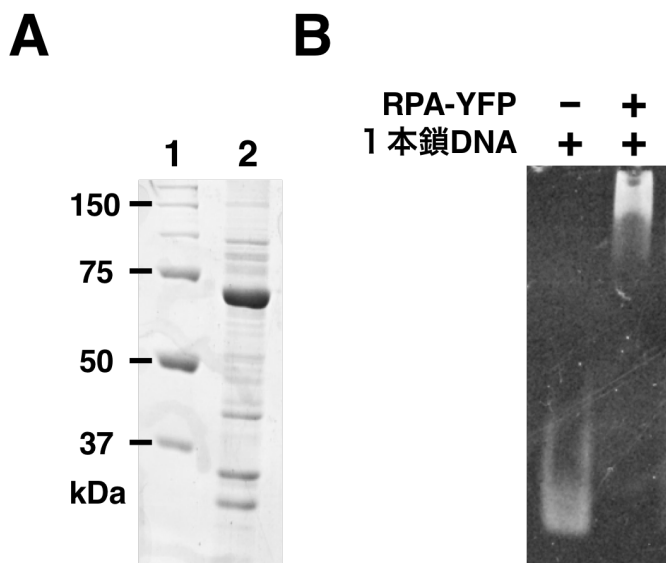


図 3-10. RPA-YFP の分子量と RPA-YFP の ssDNA 結合活性の測定

- A レーン 1:タンパク質マーカー
 レーン 2:RPA-YFP
- B レーン左:Alexa-488-ssDNA のみ
 レーン右:RPA-YFP-Alexa-488-ssDNA 複合体

3.3.2 1 本鎖化 λ DNA の動的挙動の直接観察

本研究では微細流路装置の流路内のガラス基板表面に1本鎖化 λ DNA (ss λ DNA) の片端を固定後、流路内に ssBP-488 を含む緩衝液を注入することによって ssBP-488-ss λ DNA 複合体を形成させた。また、流路内に RPA-YFP を含む緩衝液を注入することにより RPA-YFP-ss λ DNA 複合体を形成させた。観察の結果、ssBP-488-ss λ DNA 複合体は伸張状態を維持した (図 3-11A)。ssBP-488 が ssDNA に対して密に結合した結果、ssDNA-ssBP-488 複合体が剛体棒のように振る舞っていることを示唆している。従って、ssBP-488 による修飾は ssDNA の長さの計測を容易にすることを示している。また、この複合体の形成には ATP が不要であった。一方、RPA-YFP-ss λ DNA 複合体の直接観察の間、40 分間の時間経過に付き RPA-YFP-ss λ DNA 複合体の蛍光領域は自由端側から約 4 μ m まで徐々に短くなった (図 3-11B)。RPA-YFP が ss λ DNA から脱離したか、あるいは ss λ DNA が切断したのかもしれない。

次に、本研究では λ DNA の 3'末端に対して 25-mer のオリゴヌクレオチドを付加した oligo-ss λ DNA を用いることによって oligo-ss λ DNA に ssBP-488 が結合した ssBP-488-oligo-ss λ DNA 複合体と oligo-ss λ DNA に RPA-YFP が結合した RPA-YFP-oligo-ss λ DNA 複合体を直接観察した。観察の結果、ssBP-488-oligo-ss λ DNA 複合体はオリゴヌクレオチドを付加していない ssBP-488-ss λ DNA 複合体と同様な挙動をすることが示された。一方、RPA-YFP-oligo-ss λ DNA 複合体は 45 分間 RPA-YFP が脱離することなく、全長の伸張状態を維持した (図 3-11C)。この結果、ss λ DNA にオリゴヌクレオチドを付加することによって RPA-YFP の脱離を防ぐことが示された。ssDNA に結合する ssBP-488 と RPA-YFP のゲルシフトアッセイから得られる ssDNA 結合活性の結果では、数百万以上の多分子の平均値の挙動の応答でしか反映されず、ssBP-488 と RPA-YFP が結合した ssDNA1分子の形態の挙動などの情報は得られないのに対して、本研究では組み換え修復、相同組換えに関与する大腸菌 RecA タンパク質由来の ssBP-488 と DNA 複製、修復に関与する RPA-YFP が結合した ssDNA の動態挙動の違いを明らかにすることができた。

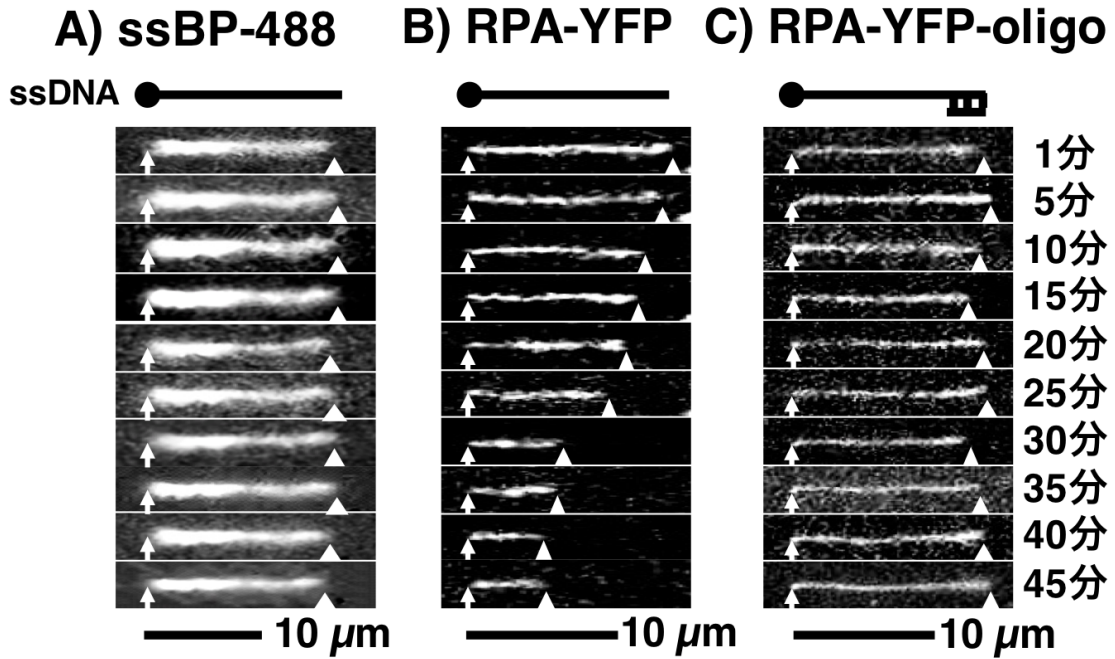


図 3-11. 経過時間あたりの ssBP-488-ssDNA 複合体、ssBP-488-ssDNA 複合体、RPA-YFP-oligo-ssDNA 複合体の蛍光領域

- A 経過時間あたりの ssBP-488-ssDNA 複合体の蛍光領域
- B 経過時間あたりの RPA-YFP-ssDNA 複合体の蛍光領域
- C 経過時間あたりの RPA-YFP-oligo-ssDNA 複合体の蛍光領域

白矢印:固定端

白三角:自由端

黒線:10 μm のスケールバー

3.3.3 塩を含む緩衝液内での ssDNA 領域を含む DNA の動的挙動の直接観察

塩化ナトリウムなどの塩を含む水溶液は DNA-タンパク質間の静電的な相互作用を遮蔽することにより DNA からタンパク質を脱離させることが可能である。そのため、DNA へのタンパク質の結合の性質は塩を含む緩衝液を用いることによって評価することができる。そこで本研究では、流路内にて ssBP-488-oligo-ssDNA 複合体及び RPA-YFP-oligo-ssDNA 複合体を形成させた後、流路内に 0.1 M、0.2 M、0.5 M、1 M、2 M の塩濃度を含む緩衝液を注入したときの ssBP-488-oligo-ssDNA 複合体及び RPA-YFP-oligo-ssDNA 複合体を直接観察することにより ssDNA と ssBP-488 及び RPA-YFP との結合の性質を評価した。さらに、流路内の流れを停止したときのこれらの複合体の動態挙動の違いについても調査した。

0 ~ 2 M の各塩濃度を含む緩衝液内の ssBP-488-oligo-ss λ DNA 複合体の観察の結果、驚くことに ssDNA に対して ssBP-488 が 2 M の高塩によって脱離することなく、高塩のときと塩を含まないときの ssBP-488-oligo-ss λ DNA 複合体の形態が同じであることが示された (図 3-12A)。また、緩衝液の流れを停止したときの ssBP-488-oligo-ss λ DNA 複合体の形態は剛体棒の状態を維持したことから、ssBP が ssDNA に対して重合している可能性が示唆された (図 3-12A)。一方、RPA-YFP-oligo-ss λ DNA 複合体の蛍光領域は流路内に 0.2 M の塩濃度を含む緩衝液を注入することによって5秒程度で急速に消失し (図 3-12B)、さらに、流路内に再度 RPA-YFP を含む緩衝液を注入することにより再度可視化された。観察の結果、RPA-YFP-oligo-ss λ DNA 複合体が λ DNA の ssDNA 領域の切断や蛍光の消光による消失ではないことが示されたことから、塩による影響により ssDNA から RPA-YFP が脱離することが示された。また、緩衝液の流れを停止したときの RPA-YFP-oligo-ss λ DNA 複合体の形態が伸張状態からランダムコイル状態へと変化することから、RPA-YFP は ssDNA に対して柔軟に結合することが示された (図 3-12B)。以上の結果から、ssDNA への RPA-YFP の結合の親和性が ssDNA への ssBP-488 の結合の親和性よりも弱いことが明らかになった。

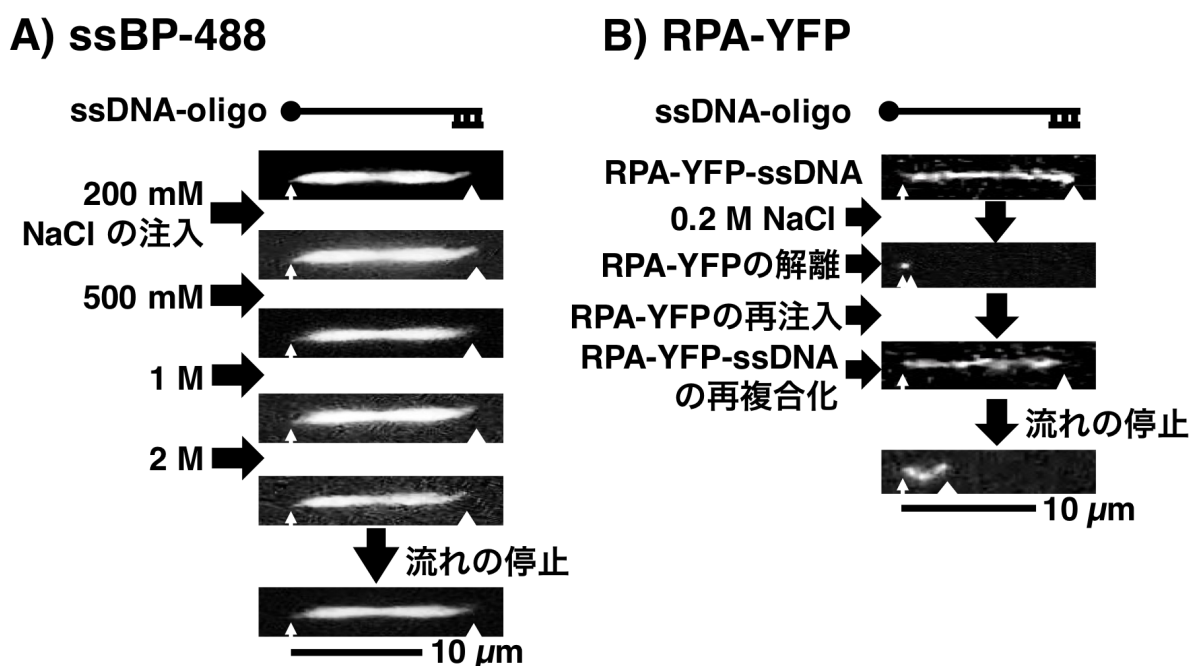


図 3-12. 流路内へ塩を含む緩衝液を注入したときの ssBP-488-oligo-ss λ DNA 複合体、RPA-YFP-oligo-ss λ DNA 複合体の蛍光画像と水溶液の流れを停止したときの ssBP-488-oligo-ss λ DNA 複合体、RPA-YFP-oligo-ss λ DNA 複合体の蛍光画像

A 流路内に 0 M ~ 2 M までの塩濃度を含む緩衝液を注入したときの ssBP-488-oligo-ss λ DNA 複

合体の蛍光画像 ssBP-488-oligo-ss λ DNA 複合体は高塩条件でも維持した。また、流路内の水溶液の流量を停止したときの ssBP-488-oligo-ss λ DNA 複合体の形態は剛体棒の状態を維持した。

- B 流路内に 0.2 M の塩濃度を含む緩衝液内を注入したときの RPA-YFP-oligo-ss λ DNA 複合体の蛍光画像 RPA-YFP-oligo-ss λ DNA 複合体は 0.2 M の塩濃度にて RPA-YFP が解離し、さらに、流路内に再度 RPA-YFP を含む緩衝液を注入することにより再複合化した。また、流路内の水溶液の流量を停止したときの RPA-YFP-oligo-ss λ DNA 複合体の形態は伸張状態からランダムコイルの状態へと変化した。

白矢印:固定端

白三角:自由端

黒線:10 μ m のスケールバー

§3.4 第3章のまとめ

本研究は数百万分子以上の平均値の測定では得ることができない ssBP-488 と RPA-YFP による ssDNA 1 分子の動態挙動を明らかにすることができた。ssBP-488-oligo-ss λ DNA 複合体は ssBP-488 が ss λ DNA と oligo-ss λ DNA に結合することによって安定的に形成された。また、高塩の条件や流路内の流れ停止しても、ssBP-488-oligo-ss λ DNA 複合体の形態は剛体棒の状態を維持した。以上の結果、ssDNA への ssBP-488 の結合の親和性は極めて高いことが示された。ssBP-488-ss λ DNA 複合体は脱塩操作なく直接観察することが可能であるため、ssBP-488 は RecA が機能する組換え修復、相同組換え、DNA 分解反応などの DNA 代謝反応の反応過程の直接観察に応用することができると考えている。

一方、RPA-YFP-oligo-ss λ DNA 複合体の観察結果では塩を含む緩衝液によって oligo-ss λ DNA からの RPA-YFP が解離すること、流路内に RPA-YFP を含む緩衝液を注入することによって RPA-YFP-oligo-ss λ DNA が再複合化すること、さらに、流れを停止することによって RPA-YFP-oligo-ss λ DNA の形態が伸張状態からランダムコイル状態へと変化する事が示された。RPA-YFP-oligo-ss λ DNA 複合体は形態が変化するために、直接観察しながら力による ssDNA の長さの関係性を評価することができると考えている。また、RPA-YFP は ssDNA に対して柔軟に結合することが示された。この複合体の動的挙動は水溶液内でのランダムコイル状態の DNA と似た動的挙動をすることが示されたことから、RPA-YFP は RPA が機能する DNA 複製反応をはじめとする DNA 代謝反応の反応過程の直接観察に応用することが可能であると考えている。

§3.5 参考文献

- [1] Yao, N. Y., Georgescu, R. E., Finkelstein, J., and O'Donnell, M. E.
Single-molecule analysis reveals that the lagging strand increases replisome processivity but slows replication fork progression.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, **106**, 13236-13241.
- [2] Georgescu, R. E., Kurth, I., and O'Donnell, M. E.
Single-molecule studies reveal the function of a third polymerase in the replisome.
Nature Structural & Molecular Biology, 2012, **19**, 113-116.
- [3] Matsuura, S. I., Komatsu, J., Hirano, K., Yasuda, H., Takashima, K., Katsura, S., and Mizuno, A.
Real-time observation of a single DNA digestion by λ exonuclease under a fluorescence microscope field.
Nucleic Acids Research, 2001, **29**, e79-e79.
- [4] Tanner, N. A., Loparo, J. J., Hamdan, S. M., Jergic, S., Dixon, N. E., and van Oijen, A. M.
Real-time single-molecule observation of rolling-circle DNA replication.
Nucleic Acids Research, 2009, **37**, e27-e27.
- [5] Oshige, M., Kawasaki, S., Takano, H., Yamaguchi, K., Kurita, H., Mizuno, T., Matsuura, S-I., Mizuno, A., and Katsura, S.
Direct observation method of individual single-stranded DNA molecules using fluorescent replication protein A.
Journal of Fluoresce., 2011, **21**, 1189-1194.
- [6] Sugimoto, N.
DNA recognition of a 24-mer peptide derived from RecA protein.
Biopolymers, 2000, **55**, 416-424.
- [7] Sakaguchi, K., Ishibashi, T., Uchiyama, Y., and Iwabata, K.
The multi-replication protein A (RPA) system—a new perspective.
FEBS Journal, 2009, **276**, 943-963.
- [8] Fanning, E., Klimovich, V., and Nager, A. R.
A dynamic model for replication protein A (RPA) function in DNA processing pathways.

- Nucleic Acids Research*, 2006, **34**, 4126-4137.
- [9] 東端啓貴
大腸菌を宿主とした異種タンパク質高発現のイロハ
生物工学会誌, 2013, **91**, 96-100.
- [10] Roca, A. I., Cox, M. M., and Brenner, S. L.
The RecA Protein: Structure and Functio.
Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1990, **25**, 415-456.
- [11] Ishino, Y., Nishino, T., and Morikawa, K.
Mechanisms of maintaining genetic stability by homologous recombination.
Chemical Review, 2006, **106**, 324-339.
- [12] Matsuura, S., Kurita, H., Nakano, M., Komatsu, J., Takashima, K., Katsura, S., and Mizuno, A.
One-end immobilization of individual DNA molecules on a functional hydrophobic glass surface.
Journal of Biomolecular Structure and Dynamics, 2002, **20**, 429-436.
- [13] Kurita, H., Torii, K., Yasuda, H., Takashima, K., Katsura, S., and Mizuno, A.
The effect of physical form of DNA on exonucleaseIII activity revealed by single-molecule observations.
Journal of Fluorescence, 2009, **19**, 33-40.

第 4 章

RPA-YFP を用いた DNA 合成酵素による DNA 合成反応の直接観察

§4.1 序論

近年、分子生物学・生化学・細胞生物学分野の研究の進展によって DNA ポリメラーゼは原核生物で 6 種類（大腸菌は 5 種類）、真核生物で 15 種類ほど発見されており、DNA 複製、塩基除去修復、損傷乗り越えなどの様々な機能が明らかになった結果、多種類の DNA ポリメラーゼによる DNA 合成のモデルが提唱されるまでに至っている（図 4-1）[1]、[2]。

これらの DNA ポリメラーゼの機能解析の研究の多くは、DNA 合成反応産物をアガロース電気泳動法やポリアクリルアミドゲル電気泳動法などのゲル電気泳動法により解析することによって行われている。試験管内の DNA 合成反応溶液には数百万以上の DNA や DNA ポリメラーゼが含まれているために、そこから得られる結果は DNA を合成する DNA ポリメラーゼの挙動の平均値の情報しか得られない。このため、DNA ポリメラーゼの挙動の揺らぎの影響を解析することが困難である。また、試験管内実験では、DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応の中間過程を解析することが困難であるために、各種の DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応の反応過程の実態を明らかにすることは難しい（図 4-2）。これらの要因から、多分子による解析では鋳型 DNA に対して DNA ポリメラーゼが結合・合成・解離・停止する DNA 合成反応の中間過程、DNA 合成反応の間で生じる DNA ポリメラーゼ同士の入れ替わり、DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応の速度や processivity など 1 分子レベルの DNA ポリメラーゼの動的挙動や機能分担は未だ不明な部分が多く残されている。

これらの問題は、個々の DNA やタンパク質の動的挙動を捉えることができる 1 分子解析を適用することにより解決することができると考えられている。特に、DNA 1 分子に作用する DNA 代謝酵素の動態挙動や DNA 代謝反応の素反応やその中間過程を捉えることができる 1 分子レベルの蛍光観察は非常に有効である [4]。1 分子レベルの蛍光観察により DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応の素反応やその中間過程を捉えることができれば、DNA ポリメラーゼ 1 分子の動態や DNA 合成反応の反応過程の実態を明らかにすることが可能であると考えている。そこで本

研究では、RPA-YFP (第3章) を用いることで、1本鎖 DNA (single-stranded DNA、ssDNA) を可視化することにより、DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応を直接観察することを試みた。本実験では、大腸菌 DNA ポリメラーゼ I の変異体である Klenow Fragment (3'-5'Exo-) を DNA 合成反応の可視化のモデルとして用いた。この DNA ポリメラーゼは 3'-5' と 5'-3' のエキソヌクレアーゼ活性を欠失されたものであり [5]、[6]、[7]、DNA ポリメラーゼ I に含まれるエキソヌクレアーゼ活性が鋳型 DNA を分解する可能性は排除されているため、DNA 合成反応のみを観察することが可能であるような実験系となっている。

本研究では、調製試薬液の注入や微小反応場の制御が可能である微細流路装置を用いることで、流路内のガラス基板表面に ssDNA 領域を含む λ DNA の片端を固定した。次に、 λ DNA の ssDNA 領域は RPA-YFP によって蛍光標識された。その後、1分子レベルの蛍光観察によって Klenow Fragment (3'-5'Exo-) による DNA 合成反応をリアルタイムにて捉えた。このとき、マイクロシリンジポンプによる流路内の緩衝液の流れを利用することによって伸張状態とランダムコイル状態に ssDNA 領域を含む鋳型 λ DNA の形態を制御した。また、DNA 合成反応のリアルタイム観察により得られた結果を解析することにより DNA 合成反応の速度を決定した。

A 大腸菌DNAポリメラーゼ

種類		機能
B型	II	DNA複製・修復
C型	III	DNA複製
Y型	IV	DNA損傷乗り越え
	V	DNA損傷乗り越え
A型	I	DNA複製・修復

B 真核生物DNAポリメラーゼ

種類		機能	KOマウス
B型	α	DNA複製	胎生致死
	δ	DNA複製・修復	胎生致死
	ϵ	DNA複製・修復	胎生致死
	ζ	DNA損傷乗り越え	胎生致死
	β	DNA修復	出生後致死
X型	γ	DNA修復・組換え	生存
	μ	DNA修復・組換え	生存
	TDT	免疫多様性	生存
	rev1	DNA損傷乗り越え	生存不能
Y型	η	DNA損傷乗り越え	生存
	ι	DNA損傷乗り越え	生存
	κ	DNA損傷乗り越え	生存
	ν	ミトコンドリアDNA複製・修復	胎生致死
A型	θ	電離放射線DNA損傷修復	生存
	ν	DNA鎖間架橋修復	不明

図 4-1. DNA ポリメラーゼの種類とその機能 [1]、[2]

A 大腸菌の DNA ポリメラーゼの種類とその機能

B 真核生物の DNA ポリメラーゼの種類とその機能、また、DNA ポリメラーゼを欠失したノックアウトマウス (KO マウス) の生存致死

DNA合成反応の試験管内実験では多分子の平均値の情報

→ DNA合成反応の反応過程の実態を明らかにできない

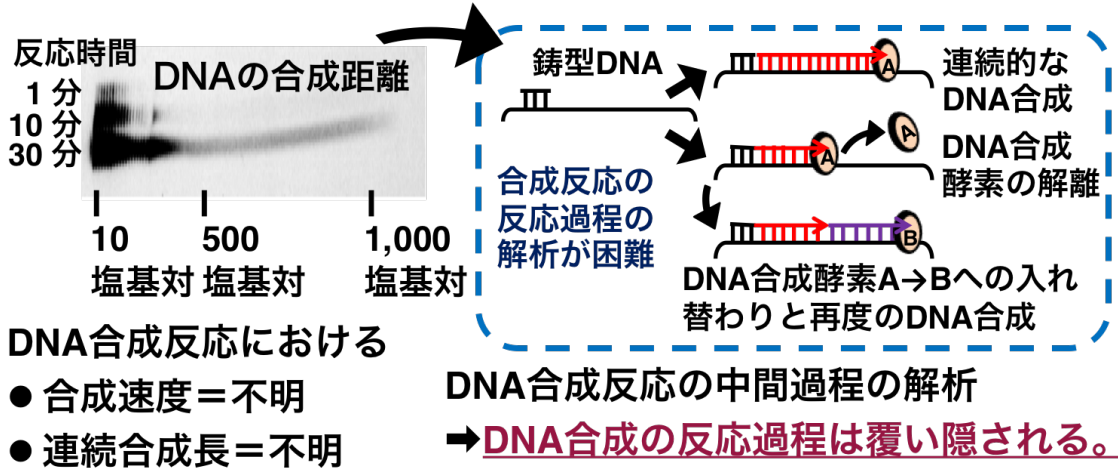


図 4-2. 多分子による解析における DNA ポリメラーゼの DNA 合成反応の解析の問題点 [3] 多分子による解析では DNA 合成反応の反応過程は中間過程を解析することが極めて困難である。そのため、DNA 合成反応の反応過程は覆い隠されてしまうことから、DNA ポリメラーゼの DNA 合成反応の実態は未だ不明な部分が多く残されている。

4.1.1 DNA ポリメラーゼ I の機能と構造

大腸菌の DNA ポリメラーゼは DNA ポリメラーゼ I、II、III、IV、V の 5 種類が同定されており、DNA 複製、修復、相同などの機能が明らかになっている [1]。1957 年、Arthur Kornberg 博士によって世界ではじめて同定された DNA ポリメラーゼは DNA ポリメラーゼ I である。DNA ポリメラーゼ I は DNA 合成、3'-5'エキソヌクレアーゼ、5'-3'エキソヌクレアーゼの 3 つの酵素活性の活性部位がある。DNA ポリメラーゼ I の DNA 合成活性は鋳型 DNA 上の DNA プライマーを介すことによって ssDNA を鋳型として基質 (dNTPs) を伴いながら dsDNA へと合成する機能を持つ。また、DNA ポリメラーゼ I の 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性は合成 DNA のミスマッチ (不正対合) 部位となるヌクレオチドを加水分解することによる校正機能を持つ。5'-3'エキソヌクレアーゼ活性は DNA の dsDNA 領域の片鎖のニックに対して結合し、そのニックから 3'側へ 1 ~ 10 塩基程度離れた部位の ssDNA 領域を切断

することによってモノヌクレオチドないしオリゴヌクレオチドを切り出す機能を持つ。

上記に述べたように、DNA ポリメラーゼ I は DNA 合成活性、3'-5'エキソヌクレアーゼ活性、5'-3'エキソヌクレアーゼ活性の3つの酵素活性の活性部位を含む。その分子量は 109 kDa であり、アミノ酸残基は 1 ~ 928 番残基にて構成されている。DNA ポリメラーゼ I はプロテアーゼによる限定分解によって DNA 合成活性の活性部位と 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の活性部位を持つアミノ酸残基 324 ~ 928 番残基の Klenow Fragment と 5'-3'エキソヌクレアーゼ活性の活性部位を持つアミノ酸残基 1 ~ 323 番残基の Small Fragment の2つのフラグメントに分解される。2つのドメインから構成されている Klenow Fragment はアミノ酸残基 324 ~ 517 番残基の Small Domain に 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性の活性部位があり、アミノ酸残基 518 ~ 928 番残基の Large Domain に DNA 合成活性の活性部位がある。Large Domain の大きな割れ目の表面は正電荷残基で覆われており、DNA に対して結合するためのスペースがある。このように、DNA ポリメラーゼ I が DNA に結合することによって DNA 合成活性やエキソヌクレアーゼ活性が機能する [8]。

DNA ポリメラーゼ I は DNA 複製反応の反応過程にて働くことから、DNA 複製反応における DNA ポリメラーゼ I の機能についてはここで述べる。大腸菌の DNA 複製反応は複数の複製開始タンパク質 DnaA が大腸菌複製起点 (*Escherichia coli* Origin of Chromosome Replication, *E. coli* oriC) に対して結合することによって開始される。DNA ヘリカーゼ活性を持つ DnaB は DnaA を起点として生じる DNA 二重らせんの開裂領域に集まることにより親鎖 (dsDNA) からリーディング鎖とラギング鎖の姉妹鎖 (ssDNA) へと巻き戻す。ラギング鎖では DNA プライマーゼ活性を持つ DnaG により RNA プライマーが 1,000 ~ 2,000 ヌクレオチドの一定の間隔ごとに合成されることによって岡崎フラグメントと呼ばれる断片領域が形成される。その後、DNA 複製に働く DNA ポリメラーゼの DNA ポリメラーゼ III が RNA プライマーを介してラギング鎖を合成する。このとき、産出されるラギング鎖上の新生合成鎖間のニックは DNA リガーゼによって塞がれる。しかしながら、DNA リガーゼは RNA プライマーを介して新生合成鎖間のニックを塞ぐことができない。ここで働く DNA ポリメラーゼが DNA ポリメラーゼ I である。DNA ポリメラーゼ I は 5'-3'エキソヌクレアーゼ活性によって RNA プライマーを除去した後、DNA 合成活性により DNA 鎖に合成することから、RNA 鎖から DNA 鎖へと置き換えることができる。この新生合成鎖間のニックの移動はニックトランスレーションと呼ばれている。その後、ラギング鎖は DNA リガーゼによりラギング鎖上の新生合成鎖間のニックが塞がれることによってラギング鎖が完成する。

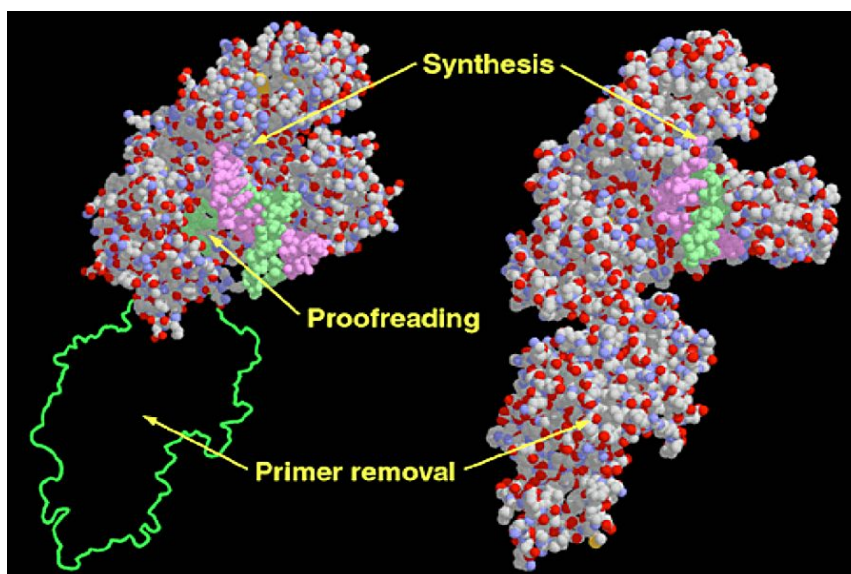


図 4-3. DNA ポリメラーゼ I の機能ドメインの構造 [9]

図左：プロテアーゼにより限定分解した DNA ポリメラーゼ I の構造

図右：全体の DNA ポリメラーゼ I の構造

アミノ酸残基 1 ~ 323 番残基の 5'-3'エキソヌクラーゼ活性の活性部位であるスモールドメインはプロテアーゼによって限定分解され、DNA 合成活性の活性部位と 3'-5'エキソヌクラーゼ活性の活性部位を持つアミノ酸残基 324 ~ 928 番残基の Klenow Fragment が残る (図左)。

§4.2 実験手順及び操作

4.2.1 実験試薬と装置

RPA-YFP の調製、微細流路装置の作製、ジクロロジメチルシラン修飾ガラス基板、 λ DNA の片端をチオール修飾した DNA である片端チオール修飾 λ DNA の作製の実験手順及び操作は、本博士論文第 3 章の研究に記載した「3.2.2 RPA-YFP の培養、発現、精製、ssDNA 結合活性の測定」、「3.2.5 微細流路装置の作製」、「3.2.6 ジクロロジメチルシラン修飾ガラス基板の作製」、「3.2.7 片端チオール化 DNA の作製」の実験操作と同様な実験操作で実行した。Klenow Fragment (3'-5'Exo-) は New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) から購入した。本研究で用いたマイクロシリンジポンプは KD Scientific 社製 KDS-100 (Holliston, MA, USA) を用いた。マイクロシリンジはハミルトン社製 250 μ L のマイクロシリンジ (Reno, NV, USA) を用いた。なお、本博士論文第 4 章の研究では、特に指定しない限り片端チオール修飾

λDNA を λDNA として記載した。

4.2.2 DNA プライマーを付加した λDNA の 1 本鎖化の調製

1. 鋳型 λDNA の ssDNA 領域の作製には λDNA の自由端に DNA プライマーを付加した。0.2 mL のマイクロチューブに 160 ng の λDNA、100 pmol の DNA プライマー (5'-CGT AAC CTG TCG GAT CAC CGG AAA G-3', Japan Bio Services)、1 x PCR Buffer、1 x TE を加え、全量 30 μL に調製した。

[試薬調製表 4-1]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
8 ng/μL λDNA	20	5.3 ng/μL
100 pmol/μL DNA プライマー	1	100 pmol
10 x PCR Buffer	3	1 x PCR Buffer
5 x TE	6	1 x TE
脱気滅菌水	Up to 30 μL	

2. PCR 装置である TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice® Gradient (TP600、TaKaRa) に 1 の調製溶液を含む 0.2 mL のマイクロチューブを設置した後、以下のプログラムを実行することによって熱変性により λDNA に対して DNA プライマーを付加した。この操作によって ssDNA 領域を含む λDNA を作製した。

表 4-1. 温度制御プログラム

	cycle 数	時間[秒]	温度[°C]
First Step	1 cycle	60	95°C
Second Step	1 cycle	360	58°C
Third Step	1 cycle	∞	4°C

4.2.3 RPA-YFP を用いた DNA 合成反応のリアルタイム観察

本研究では微細流路装置を用いることにより流路内のガラス基板表面に ssDNA 領域を含む λDNA の片端を固定し、マイクロシリンジポンプによる流路内の緩衝液の流れを利用することによって ssDNA 領域を含む鋳型 λDNA の伸張状態とランダム

コイル状態下での DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応を直接観察した。このとき、鋳型 λ DNA の ssDNA 領域は RPA-YFP によって標識された。本実験では 37°C にヒートプレート (MATS-505RA20、Tokai Hit、Shizuoka、Japan) を設定することにより実験を実行した。以下にその実験手順を述べる。

1. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、320 ng の ssDNA 領域を含む鋳型 λ DNA を含む緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.8、10% glycerol、0.1% Tween 20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによってジメチルジクロロシラン基板表面に ssDNA 領域を含む λ DNA を片端固定した。

[試薬調製表 4-2]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M Tris-HCl pH 7.8	10	50 mM
50 % glycerol	40	10%
1 % Tween 20	20	0.1%
10 % 2-Mercaptoethanol	50	2.5%
10.6 ng/ μ L ssDNA 領域を含む λ DNA	30	1.59 ng/ μ L
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、40 μ g の BSA (Bio-Rad) を含む緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.8、10% glycerol、0.1% Tween 20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによってガラス基板表面をブロッキングした。

[試薬調製表 4-3]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M Tris-HCl pH 7.8	10	50 mM
50% glycerol	40	10%
1% Tween20	20	0.1%
10% 2-Mercaptoethanol	50	2.5%
2 mg/mL BSA	20	0.2 μ g/ μ L
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

3. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、10 μg の RPA-YFP を含む緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.8、10% glycerol、0.1% Tween20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによって鋳型 λDNA の ssDNA 領域に RPA-YFP を結合させた。

[試薬調製表 4-4]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1 M Tris-HCl pH7.8	10	50 mM
50% glycerol	40	10%
1% Tween 20	20	0.1%
10% 2-Mercaptoethanol	50	2.5%
1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RPA-YFP	10	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
脱気滅菌水	Up to 200 μL	

4. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH7.8、10% glycerol、0.1% Tween 20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによって微細流路内のフリーの RPA-YFP の余剰な蛍光を取り除いた。

[試薬調製表 4-5]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1 M Tris-HCl pH7.8	10	50 mM
50% glycerol	40	10%
1% Tween20	20	0.1%
10% 2-Mercaptoethanol	50	2.5%
脱気滅菌水	Up to 200 μL	

5. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、6.25 U の Klenow Fragment (3'-5'Exo-), 2.5 mM (each) dNTPs Mixture (TaKaRa)を含む緩衝液 (1 x 2 NEBuffer [50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, New England Biolabs], 10% glycerol、0.1% Tween 20) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入した。このとき、マイクロシリンジポンプにより緩

衝液の流れを利用することによって ssDNA 領域を含む鋳型 λ DNA の伸張状態とランダムコイル状態下での DNA 合成反応を観察した。

[試薬調製表 4-6]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
10 x 2 NEBuffer	20	1 x 2 NEBuffer
2.5 mM (each) dNTPs Mixture	2.5	0.3 mM
50% glycerol	40	10%
1% Tween 20	20	0.1%
2.5 U/ μ L Klenow Fragment (3'-5'Exo-)	2.5	6.25 U
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

- DNA 合成反応の観察後、0.6 mL のマイクロチューブ内にて、0.1 μ M SYTOX Orange を含む緩衝液 (50 mM Tris-HCl pH 7.8、10% glycerol、0.1% Tween 20、2.5% 2-Mercaptoethanol) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、微細流路内に注入することによって合成 DNA の 2 本鎖領域を観察した。

[試薬調製表 4-7]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M Tris-HCl pH 7.8	10	50 mM
50% glycerol	40	10%
1% Tween 20	20	0.1%
10% 2-Mercaptoethanol	50	2.5%
10 μ M SYTOX Orange	2	0.1 μ M
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

- 同一の顕微鏡視野内にて Klenow Fragment (3'-5'Exo-) による DNA 合成反応をビデオレート (30 frames/sec) で撮影した後、画像化した。ssDNA 領域の蛍光領域をもとに ImageJ を用いることによって ssDNA 領域を含む鋳型 λ DNA の長さを解析した。

§4.3 結果及び考察

図 4-4 は実験概要図である。本研究では大腸菌 DNA ポリメラーゼ I の 3'-5' と 5'-3' のエキソヌクレアーゼ活性を欠失された DNA ポリメラーゼである Klenow Fragment (3'-5'Exo-) を用いた。従って、DNA ポリメラーゼに含まれるエキソヌクレアーゼ活性が鋳型 DNA を分解する可能性は排除されているため、DNA 合成反応のみを観察することが可能であるような実験系となっている。

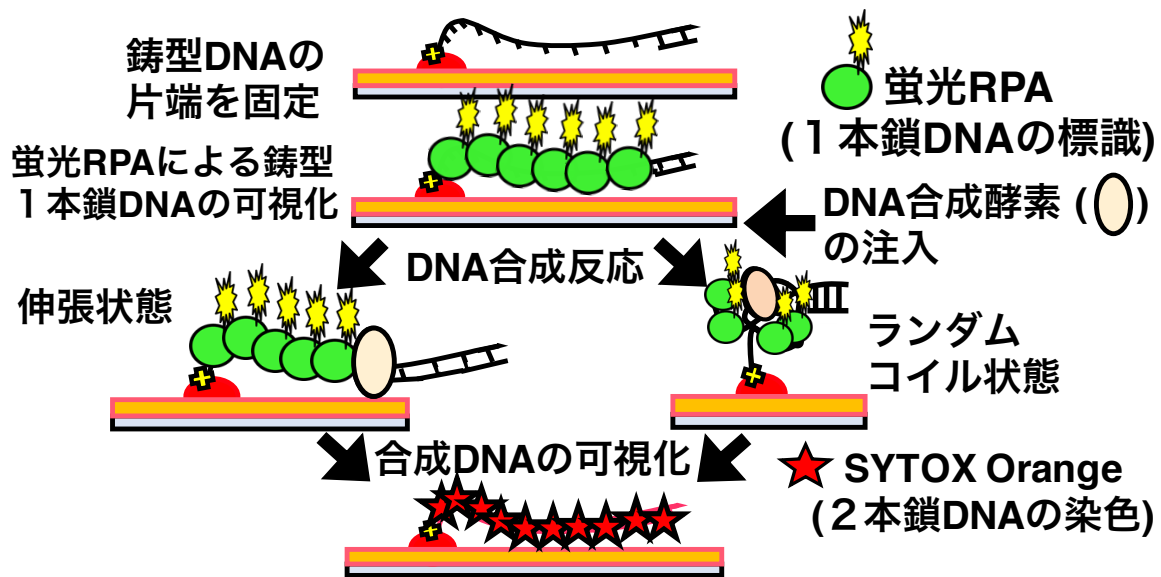


図 4-4. RPA-YFP により標識した ssDNA 領域を含む λ DNA を鋳型としたときの DNA 合成反応の可視化の概要図 本研究では微細流路装置を用いることにより流路内のガラス基板表面に ssDNA 領域を含む λ DNA の片端を固定した。その後、マイクロシリンジポンプによる流路内の緩衝液の流れを利用することによって ssDNA 領域を含む鋳型 λ DNA の伸張状態とランダムコイル状態下での DNA 合成反応を直接観察した。このとき、ssDNA 領域を含む鋳型 λ DNA は RPA-YFP によって標識された。

図4-5AとBはssDNA領域を含む鋳型 λ DNAの伸張状態とランダムコイル状態下でのKlenow Fragment (3'-5'Exo-) によるDNA合成反応の連続画像を示す。DNA合成反応の観察の間、鋳型 λ DNAのssDNA領域の自由端が徐々に短くなった。伸張状態下での鋳型 λ DNAのssDNA領域は535秒、ランダムコイル状態下では996秒にて消失した。その後、流路内にSYTOX Orangeを含む緩衝液を注入することによって2本鎖DNAを直接観察した結果、鋳型DNAのssDNA領域の蛍光領域の消失した位置から2本鎖DNAが可視化されたことから、DNA合成反応の進行に伴いRPA-YFPが

鋳型DNAのssDNAから解離することが示された。これらの結果、本研究ではssDNA領域を含むλDNA 1分子を鋳型として個々のDNAポリメラーゼによるDNA合成反応の直接観察に世界ではじめて成功し、試験管内実験による平均値の測定では捉えることができなかった、個々のDNAポリメラーゼによるDNA合成反応によって合成したDNA 1分子のssDNA領域からRPA-YFP分子が解離することを明らかにした。

これまでの研究において、DNAポリメラーゼによるDNA合成反応の中間過程を直接観察した結果は報告されていない。この理由はssDNAを可視化するための技術が未だに確立されていないからであると考えている。なぜならば、インターカレーター型蛍光色素を用いたDNA合成反応の直接観察では、DNA合成反応終了後のDNA合成反応産物である2本鎖DNAしか捉えることができないために、蛍光顕微鏡視野内のいっどこからDNA合成反応が開始され、合成された2本鎖DNAが産出されるのかなど、DNAポリメラーゼによる合成反応の進行を捉えることが極めて困難であるからである（ただし、ローリングサークル型DNA複製は除く [10]）。従って、本研究はゲノムの遺伝情報の維持・継承に重要な役割を果たすDNAポリメラーゼ1分子の動態挙動を評価するための実験系として非常に有効であることから、癌検知などの分析技術や癌発生機構の解明のための解析技術として応用することができると考えている。

さらに本研究では、DNAポリメラーゼによるDNA合成反応の間、DNAの2本鎖領域を染色することが可能なインターカレーター型蛍光色素を用いていないため、DNA二重らせんの糖・リン酸骨格を歪ませる原因となるインターカレーター型蛍光色素による鋳型DNAを合成するDNAポリメラーゼの進行に関して阻害の影響を受けないという利点がある。従って、本研究の実験系は鋳型DNA 1分子を合成する個々のDNAポリメラーゼの真の挙動を捉えることができ、原核生物および真核生物種の各種のDNAポリメラーゼの役割分担を明らかにすることができると考えている。

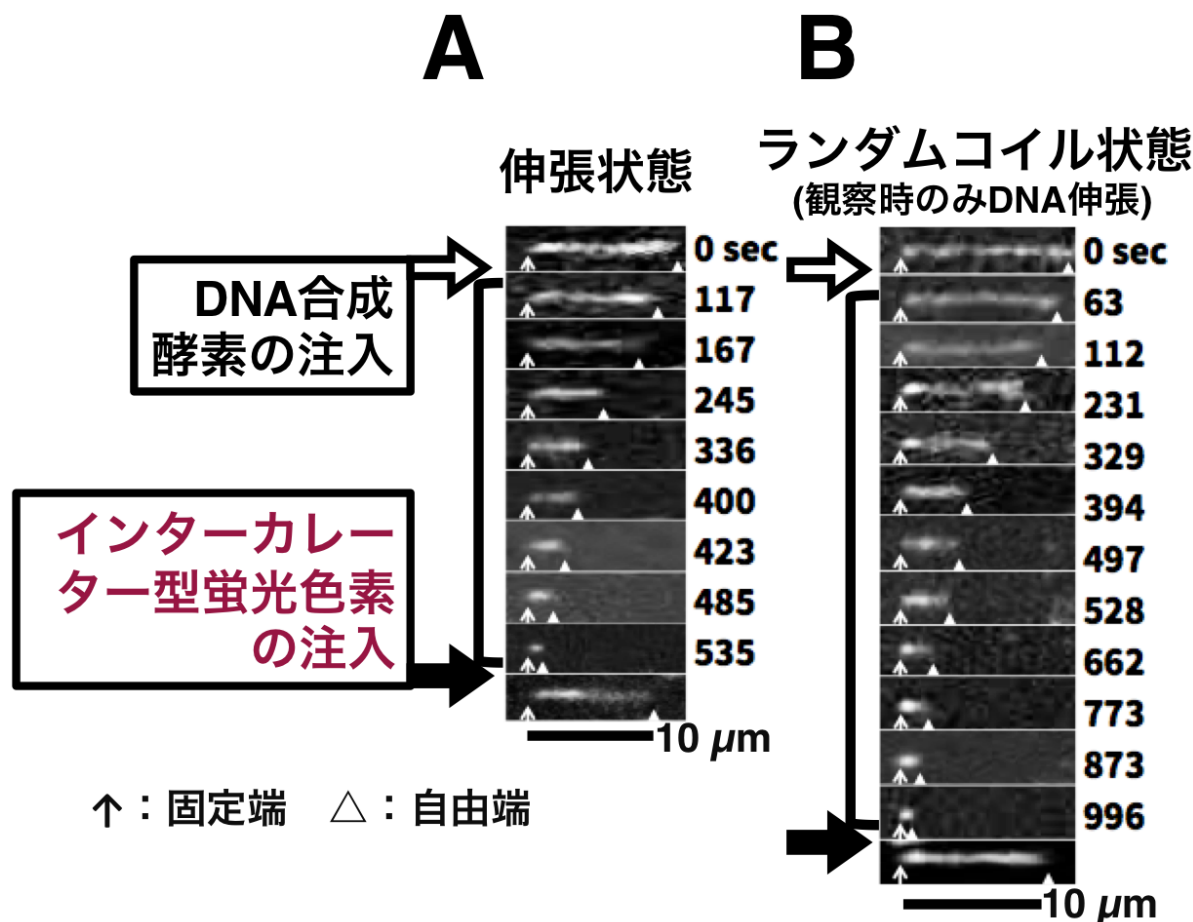


図 4-5. 伸張状態とランダムコイル状態に ssDNA 領域を含む鋳型 λDNA の形態を制御したときの DNA 合成反応の可視化 本実験では Klenow Fragment (3'-5'Exo-) を含む緩衝液の流れを連続的に供給することによって ssDNA 領域を含む鋳型 λDNA を伸張させた。このときの鋳型 λDNA の ssDNA 領域の長さ情報をもとに鋳型 DNA の伸張状態下での DNA 合成反応を直接観察した。一方、ssDNA 領域を含む鋳型 λDNA のランダムコイル状態下での DNA 合成反応では Klenow Fragment (3'-5'Exo-) を含む緩衝液の流れを供給させなかった。DNA 合成反応の観察時のみ、流路内に緩衝液の流れを一時的に供給することによって鋳型 λDNA の ssDNA 領域を伸張させた後、緩衝液の流れの供給を停止した。このときの鋳型 λDNA の ssDNA 領域の長さ情報をもとにランダムコイル状態下での DNA 合成反応を直接観察した。

A 伸張状態下での DNA 合成反応の可視化

B ランダムコイル状態下での DNA 合成反応の可視化

白矢印 : 固定端

白三角 : 自由端

黒線 : 10 μm のスケールバー

図 4-6 は Klenow Fragment (3'-5'Exo-) による DNA 合成反応の間の鑄型 λ DNA の ssDNA 領域長の時間経過を示す。DNA 合成速度の解析の結果、ssDNA 領域を含む鑄型 λ DNA の伸張状態下での DNA 合成反応の速度は 91 塩基/秒であり、ランダムコイル状態下での DNA 合成反応の速度は 52 塩基/秒であった。これらの個々の DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応の速度は、数百万以上の多分子の鑄型 DNA を合成する多分子の DNA ポリメラーゼの DNA 合成活性を評価するゲル電気泳動法の結果からでは求めることが極めて困難である。従って、本研究の結果は 1 分子レベルの DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応の直接観察だからこそ得ることができるものである。さらに、本研究では ssDNA 領域を含む鑄型 λ DNA の伸張状態下のときとランダムコイル状態下のときでの DNA 合成反応の速度を比較した。この結果、伸張状態下での DNA 合成反応の速度はランダムコイル状態下での DNA 合成反応の速度よりも 75% 程度高いことが示された (91 vs. 52 塩基/秒)。この結果から、鑄型 DNA の形態が DNA 合成反応の速度に影響を与えることが示された。この要因として、流路内には Klenow Fragment (3'-5'Exo-) や基質など含む緩衝液が連続的に供給されるため、DNA 1 分子に対して豊富な Klenow Fragment (3'-5'Exo-) や基質が DNA 合成反応の速度を促進させる可能性がある [16]。しかしながら、本実験では伸張状態下とランダムコイル状態下での DNA 1 分子に対して Klenow Fragment (3'-5'Exo-) や基質が過剰に存在していると考えられるために、その他の要因が考えられる。その他の要因としては、伸張状態とランダムコイル状態下での鑄型 DNA に対する Klenow Fragment (3'-5'Exo-) の結合及び DNA 合成の親和性に関係している可能性がある。この観点から考えてみると、伸張状態の鑄型 DNA の形態はランダムコイル状態よりも DNA 鎖の運動が少ないために、Klenow Fragment (3'-5'Exo-) が DNA の自由端に結合及び DNA 合成の進行が有利になるのかもしれない。しかしながら、これ以上議論を進めるためには、DNA ポリメラーゼを蛍光標識することによって DNA 合成反応のより詳細な反応過程を理解する必要がある。また、既往の研究では DNA の張力が DNA ポリメラーゼの活性 [4]、[11]、RNA ポリメラーゼの活性 [12]、制限酵素活性 [13]、[14]、エキソヌクレアーゼの活性 [4]、[15] などの DNA 代謝酵素の活性に影響を与えるという研究結果が複数報告されている。本研究の結果においても、DNA の張力が DNA 合成反応の速度に影響を与えることが示されたことから、DNA の張力が DNA 代謝反応に何らかの影響を与える可能性が示唆された。

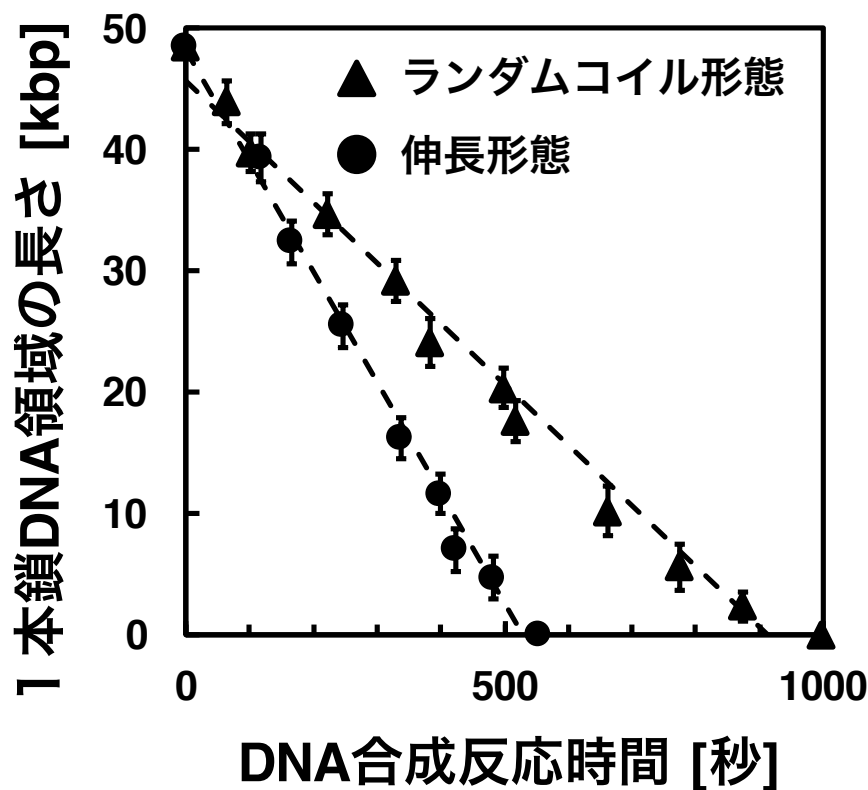


図 4-6. DNA 合成反応時間あたりの鋳型 λ DNA の ssDNA 領域の長さ

黒三角：DNA 合成反応時間あたりのランダムコイル状態の鋳型 λ DNA の ssDNA 領域の長さ

黒丸：DNA 合成反応時間あたりの伸張状態の鋳型 λ DNA の ssDNA 領域の長さ

エラーバー：5 回の実験から得られた DNA 合成反応時間あたりの鋳型 λ DNA の ssDNA 領域の長さの標準偏差

§4.4 第 4 章のまとめ

本研究では、RPA-YFP により標識した ssDNA 領域を含む鋳型 λ DNA の伸張状態とランダムコイル状態下での Klenow Fragment (3'-5'Exo-) による DNA 合成反応の直接観察に世界ではじめて成功した。以上の結果、試験管内実験による平均値の測定では得ることができない伸張状態とランダムコイル状態下での DNA 合成反応の速度の決定に成功し、その速度は 91 塩基/秒と 52 塩基/秒であった。ssDNA 領域を含む鋳型 λ DNA の伸張状態下での DNA 合成反応の速度はランダムコイル状態下での DNA 合成反応の速度よりも 75%程度高く (91 vs. 52 塩基/秒)、DNA の張力が DNA 合成反応の速度に影響を与えることが強く示唆された。本研究の実験系は原核生物および真核生物などの多くの種類の DNA ポリメラーゼの DNA 合成反応の動態解析に応用することが可能であると考えている。

また、今後の課題として、DNA ポリメラーゼによる DNA 合成反応のより詳細な反応過程を理解するためには、DNA ポリメラーゼを蛍光標識する必要がある。これにより、鋳型 DNA に対する DNA ポリメラーゼの結合・合成・解離・停止などの DNA 合成反応の中間過程、DNA 合成反応の間で生じる DNA ポリメラーゼ同士の入れ替わり、DNA ポリメラーゼの DNA 合成反応の速度や processivity など DNA ポリメラーゼ 1 分子の動的挙動や機能分担を明らかにすることができると考えている。

§4.5 参考文献

- [1] Fijalkowska, I. J., Schaaper, R. M., and Jonczyk, P.
DNA replication fidelity in *Escherichia coli*: a multi-DNA polymerase affair.
FEMS Microbiology Reviews, 2012, **36**, 1105-1121.
- [2] Lange, S. S., Takata, K. I., and Wood, R. D.
DNA polymerases and cancer.
Nature Review Cancer, 2011, **11**, 96-110.
- [3] Oshige, M., Takeuchi, R., Ruike, R., Kuroda, K., and Sakaguchi, K.
Subunit protein-affinity isolation of *Drosophila* DNA polymerase ϵ catalytic subunit.
Protein Expression and Purification, 2004, **35**, 248-256.
- [4] Wuite, G. J.L., Smith, S. B., Young, M. and Bustamante, D. K. C.
Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity.
Nature, 2000, **404**, 103-106
- [5] Derbyshire, V., Freemont, P. S., Sanderson, M. R., Beese, L., Friedman, J. M., Joyce, C. M., and Steitz, T. A.
Genetic and crystallographic studies of the 3',5'-exonucleolytic site of DNA polymerase I.
Science, 1988, **240**, 199-201.
- [6] Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R.
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1977, **74**, 5463-5467.
- [7] Bebenek, K., Joyce, C. M., Fitzgerald, M. P., and Kunkel, T. A.

- The fidelity of DNA synthesis catalyzed by derivatives of Escherichia coli DNA polymerase I.
Journal of Biological Chemistry, 1990, **265**, 13878-13887.
- [8] Voet, D., Voet, J. G., Prat C. W.
Fundamentals of Biochemistry: Life at the Molecular Level (Second edition).
John Wiley & Sons Incorporated, New York, USA, 2005.
- [9] Research Collaboratory for Structural Bioinformatics (RCSB) Protein Data Bank (PDB) -101.
DNA Polymerase, Molecule of the Month, March 2000
DOI: 10.2210/rcsb_pdb/mom_2000_3
- [10] Tanner, N. A., Loparo, J. J., Hamdan, S. M., Jergic, S., Dixon, N. E., and van Oijen, A. M.
Real-time single-molecule observation of rolling-circle DNA replication.
Nucleic Acids Research, 2009, **37**, e27-e27.
- [11] Maier, B., Bensimon, D., Croquette, V.
Replication by a single DNA polymerase of a stretched single-stranded DNA.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, **97**, 12002-12007.
- [12] Yin, H., Wang, M. D., Svoboda, K., Landick, R., Block, S. M., and Gelles, J.
Transcription against an applied force.
Science, 1995, **270**, 1653-1657.
- [13] van den Broek, B., Noom, M. C., and Wuite, G. J.
DNA-tension dependence of restriction enzyme activity reveals mechanochemical properties of the reaction pathway.
Nucleic Acids Research, 2005, **33**, 2676-2684.
- [14] Gemmen, G. J., Millin, R., Smith, D. E.
Tension-dependent DNA cleavage by restriction endonucleases: two-site enzymes are “switched off” at low force.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, **103**, 11555-11560.
- [15] Kurita, H., Torii, K., Yasuda, H., Takashima, K., Katsura, S., Mizuno, A.
The effect of physical form of DNA on exonucleaseIII activity revealed by single-molecule observations.
Journal of Fluorescence, 2009, **19**, 33-40.

- [16] Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G. *et al.*
Real-time DNA sequencing from single polymerase molecules.
Science, 2009, **323**, 133-138.

第 5 章

エキソヌクレアーゼ活性による DNA 分解反応の直接観察

§5.1 序論

生化学・分子生物学の学術研究の進展によってエンドヌクレアーゼやエキソヌクレアーゼの DNA 分解酵素の機能解析が精力的に行われた結果、DNA 分解酵素が DNA 複製、修復、組み換え修復などのゲノムの安定化維持に重要な役割を果たしていることが明らかになっている [1]、[2]。これらの DNA 分解酵素の研究の多くは、DNA 分解反応産物をゲル電気泳動法により解析することに依っている [1]、[2]。試験管内の DNA 分解反応溶液には数百万以上の DNA や DNA 分解酵素などの分子が含まれているために、ゲル電気泳動から得られる結果は DNA を分解する DNA 分解酵素の挙動の平均値の情報しか反映しておらず、個々の DNA を分解する DNA 分解酵素の動的挙動の影響を解析することは極めて困難である。また、試験管内実験では DNA 分解酵素による DNA 分解反応の中間過程を解析することができないために、DNA に対して DNA 分解酵素が結合・分解・解離・停止する DNA 分解反応の中間過程、DNA 分解酵素同士の入れ替わり、DNA 分解酵素における DNA 分解反応の速度や processivity などの DNA 分解反応の実態を明らかにすることが困難である。そのため、DNA 分解反応の分子機構には未だ不明な部分が多く残されている (図 5-1)。

DNA 分解酵素による DNA 分解反応の実態を捉えるためには、1 分子レベルでの蛍光観察によって DNA に作用する DNA 分解酵素の動的挙動や DNA 分解反応の素反応やその中間過程を捉えることが非常に有効である [3]、[4]、[5]。とりわけ、核酸配列の 5'ないし 3'の末端部位から DNA を分解する活性を有するエキソヌクレアーゼは DNA 複製、修復、組み換え修復などの反応過程に働くことによってゲノムの安定化維持に重要な役割を果たしていることが明らかになっている [1]、[2]。また、DNA ポリメラーゼをはじめとする多くの DNA 代謝酵素にはエキソヌクレアーゼ活性を持ち合わせている酵素が存在していることが知られている。特に、DNA ポリメラーゼは DNA 合成活性とエキソヌクレアーゼ活性の機能を持ち合わせており、エキソヌクレアーゼ活性は DNA 合成によって生じた核酸塩基の不正対合を校正する機能として働くことが知られている [1]。

本研究では1分子レベルにて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エキソヌクレアーゼによる DNA 分解反応の実態を捉えることを試みた。そのため、本実験では DNA 複製や修復などの中間過程にて重要な役割を果たしているエキソヌクレアーゼのモデルとして Bacteriophage T7 gene 6 タンパク質 (T7 Exonuclease、T7 Exo) を用いた [6]、[7]、[8]、[9]。T7 Exo は分子量 32 kDa であり、2本鎖 DNA (double-stranded DNA、dsDNA) に特異的に作用する。また、DNA の 5'-3'の方向に2本鎖 DNA (double-stranded DNA、dsDNA) を削り込むことによって 5'モノヌクレオチドの除去や dsDNA 中のギャップやニックからもヌクレオチドを除去することが知られている。また、T7 Exo は RNA/DNA ハイブリッドから RNA および DNA を 5'-3'方向に分解することから、DNA 複製反応の間にラギング鎖上の RNA プライマーを除去するなどの機能を持つ [10]。一方、2本鎖 RNA もしくは1本鎖 RNA は分解しない。

本研究では微小反応場の制御が可能である微細流路装置を用いることにより流路内のガラス基板表面に直鎖状 DNA の片端を固定した。その後、マイクロシリンジポンプによる流路内の緩衝液の流れを利用することによって直鎖状 DNA を伸張させた。このとき、直鎖状 DNA の dsDNA 領域と1本鎖 DNA (single-stranded DNA、ssDNA) を染め分けることによって T7 Exo による DNA 分解反応を直接観察した。なお、T7 Exo が DNA を分解することによって生じる分解領域である ssDNA 領域の観察には、本博士論文第3章の研究で開発した蛍光 ssDNA 結合ペプチド (single-stranded DNA Binding Peptide-Atto488、ssBP-488) を用いた。さらに、本研究では T7 Exo を含む緩衝液を短時間ないし連続的に供給したときの DNA 分解反応の直接観察することによって T7 Exo 1分子の動的挙動を明らかにした。

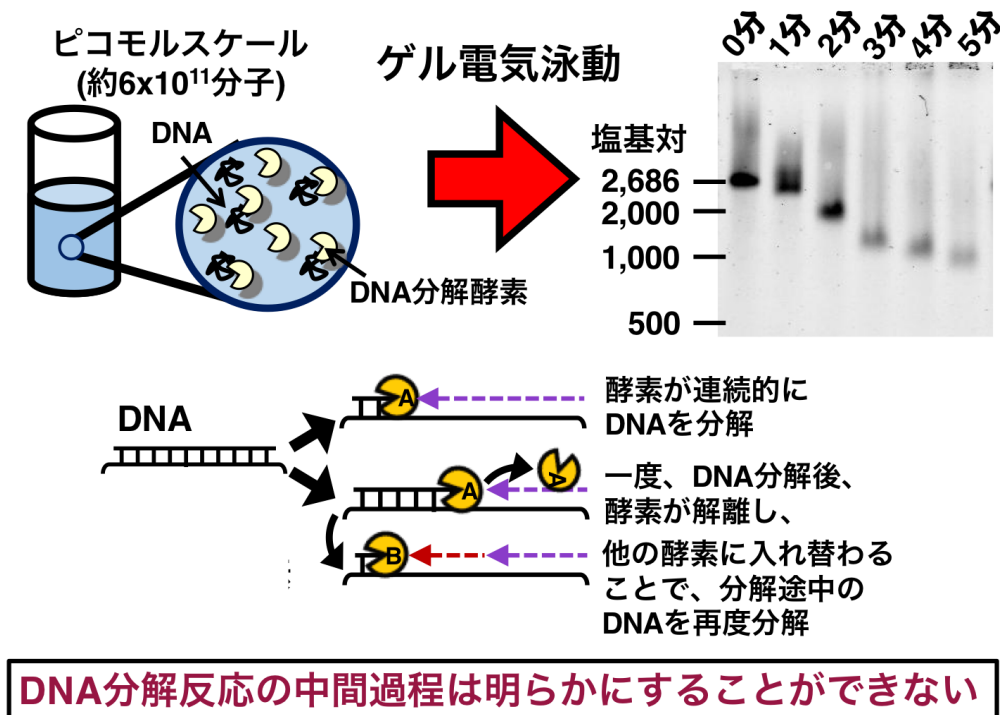


図 5-1. 多分子による解析における DNA 分解反応の問題点 [3]

5.1.1 Bacteriophage T7 gene 6 protein の構造と機能

T7 Exo は分子量 32 kDa であり、T7 Exo が 5'-3'の方向に dsDNA を削り込むことによって 5'モノヌクレオチドを除去する DNA 分解酵素である [8]、[9]。T7 Exo の立体構造はこれまでは決定されていないが、タンパク質のアミノ酸配列から立体構造予測することが可能なプログラムである I-TASSER (I-TASSER suite: <http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/download/>) を用いることによって T7 Exo の配列プロファイルをもとに立体構造が予測されている。図 5-2 は予測された T7 Exo の立体構造を示す [10]。T7 Exo の構造解析の結果、T7 Exo の構造は Flap Endonuclease (FEN) ファミリーによく見られる特徴的な構造があること、ssDNA 鎖を認識するらせんのアーチ構造や非特異的に dsDNA に対して結合する Helix-Three-Turn-Helix (H3TH) モチーフの構造があること、さらに、酵素の活性部位を構成するカルボキシル残基が他の生物種の Endonuclease 活性と相同性があることが示され、その構造が進化の過程で強く保存されていることが明らかになった [10]。

T7 Exo は Bacteriophage T7 の DNA 複製反応に重要な役割を果たしている。以下に、Bacteriophage T7 の DNA 複製反応における T7 Exo の機能を概説する。

DNA 複製反応の間、DNA ヘリカーゼ活性と RNA プライマーゼ活性の機能を持つ T7 gene 4 は親鎖 (dsDNA) からリーディング鎖とラギング鎖の 2 つの姉妹鎖 (ssDNA) に巻き戻しながらラギング鎖上に RNA プライマーを一定の間隔ごとに合成する。RNA プライマーを介して複製に働く DNA ポリメラーゼである T7 DNA ポリメラーゼがラギング鎖上を連続的に合成した後、DNA リガーゼが各々の岡崎フラグメントを連結する。このとき、ラギング鎖上の RNA プライマーは T7 gene 6 (T7 Exo) によって RNA プライマーが除去される。T7 Exo が欠損された変異 Bacteriophage T7 ではラギング鎖上で RNA プライマーが蓄積するために、DNA の合成が停止する。従って、Bacteriophage T7 は宿主細胞内にて成長することができずに死に至ることから、T7 Exo は Bacteriophage T7 の必須な複製因子である [10]。

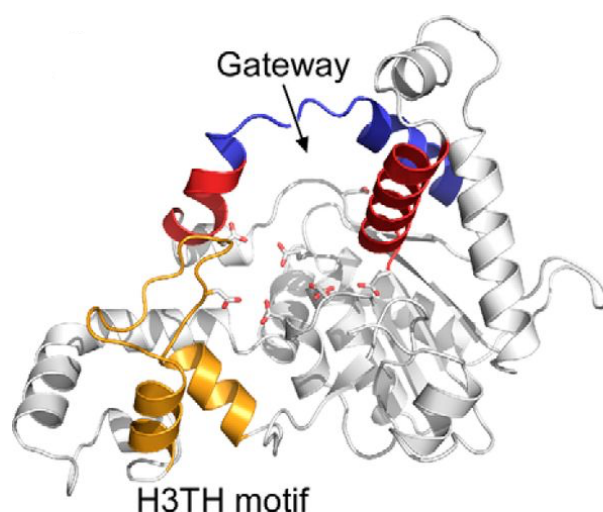


図 5-2. T7 Exo の配列プロフィールから予測した T7 Exo の立体構造 [10]

§5.2 実験手順及び操作

5.2.1 実験試薬と装置

T7 Exo は New England Biolabs、ssBP-488 は Sigma Aldrich から購入した。微細流路装置の作製の実験手順及び操作は、本博士論文第 3 章の研究に記載した「3.2.5 微細流路装置の作製」の実験操作と同様な実験操作で実行した。本研究ではマイクロシリンジポンプは KD Scientific 社製 KDS-100 を用いた。マイクロシリンジはハミルトン社製 250 μ L のマイクロシリンジを用いた。また、直鎖状 DNA は Bacteriophage lambda DNA (λ DNA、全長 48,502 塩基対) を用いた。

5.2.2 微細流路装置の作製

本博士論文第5章の研究では微細流路装置を用いて、3種類の実験を行った(図5-3)。図5-3Aに示す微細流路装置は λ DNAのdsDNA領域とssDNA領域を染め分けたときのT7 ExoによるDNA分解反応の直接観察の実験に用いた。図5-3Bに示す微細流路装置はT7 Exoを短時間、供給したときのDNA分解反応の観察実験の実験に用いた。図5-3Cに示す微細流路装置はT7 Exoを連続的に供給したときのDNA分解反応の直接観察の実験に用いた。微細流路装置の作製の実験手順及び操作は、本博士論文第3章の研究に記載した「3.2.5 微細流路装置の作製」の実験操作と同様な実験操作で実行した。

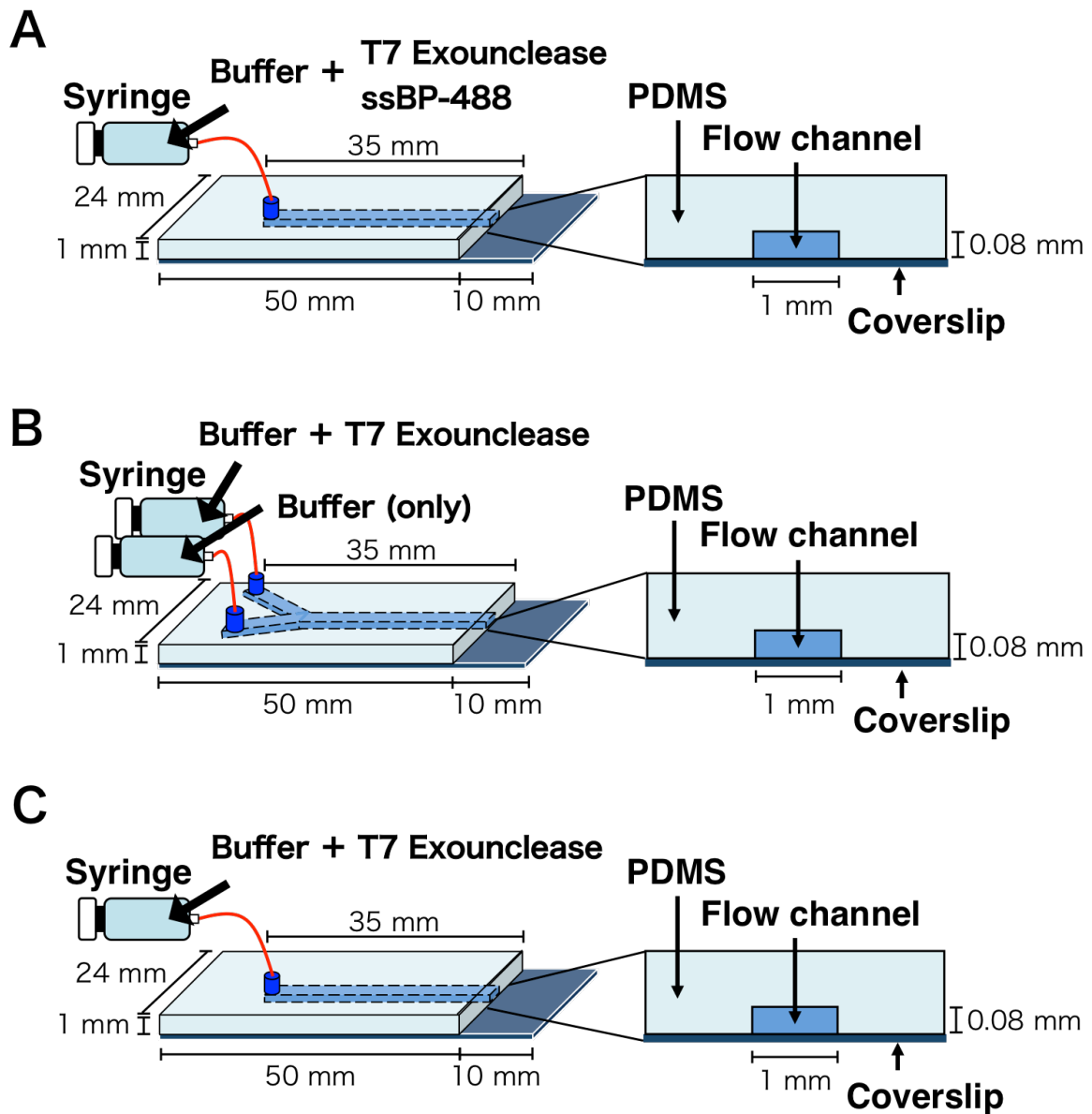


図 5-3. T7 Exo による DNA 分解反応の直接観察の実験に用いた微細流路装置

- A λ DNA の dsDNA 領域と ssDNA 領域を染め分けたときの T7 Exo による DNA 分解反応の直接観察の実験に用いた微細流路装置
- B T7 Exo を短時間、供給したときの DNA 分解反応の直接観察の実験に用いた微細流路装置
- C T7 Exo を連続的に供給したときの DNA 分解反応の直接観察の実験に用いた微細流路装置

5.2.3 微細流路内でのガラス基板修飾法

本研究では微細流路内にて DNA の片端を固定するために、ガラス基板表面にニュートラアビジンを吸着させた後、脂質二重層を覆うことによって流路内のガラス基板表面の修飾を試みた。脂質二重層は微細流路内のガラス基板表面を覆うことによって pH の変動を抑え、DNA やタンパク質の非特異的吸着を防ぐことが可能である [11]。以下に、ガラス基板表面の修飾法を述べる。

5.2.3.1 改質ガラス基板の作製

ニュートラアビジン (NeutrAvidin Biotin Binding Protein、Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) は改質したガラス基板の表面に吸着させた。以下、ガラス基板の改質する方法を記す。

1. スライドガラス用カゴにスライドガラス (24 x 60 mm、Matsunami Glass) を詰め、スライドガラス用ガラスケースに入れた。0.1 M KOH を投入し、20 分間、超音波洗浄をかけた後、一晚浸漬し、再び 20 分間、超音波洗浄をかけた。0.1 M KOH は毎回調製し、再利用はしなかった。
2. ミリ Q 水で実験操作 1 のスライドガラスを濯いだ後、スライドガラスが入ったスライドガラス用ガラスケース内にエタノールを投入し、浸漬した。その後、20 分間、超音波洗浄をかけ、1~2 時間程度静置した。
3. 実験操作 2 のスライドガラスを 20 分間、超音波洗浄した後、ミリ Q 水でスライドガラスを濯ぎ、スライドガラスが入ったスライドガラス用ガラスケース内にミリ Q 水を投入し、4°C にて保存した。
4. 保存期間は 3 週間程度であった。基板が古くなると 100 倍の顕微鏡視野内の流路基板表面に 10 μ m ほどの斑点ができるので注意した。

5.2.3.2 リポソーム溶液の調製

リポソーム溶液は微細流路内のガラス基板表面に脂質二重層を形成することができるため、ガラス基板表面をブロッキングすることが可能である。本研究では 1,2-dioleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DOPC、Avanti Polar Lipids、AL、USA) のリポソーム溶液 (DOPC リポソーム溶液) を用いてガラス基板表面に脂質二重層を形成させた。以下に、DOPC リポソーム溶液の調製法を述べる。

1. ガラス製マイクロチューブ (As One) にクロロホルム溶液内に保存した 20 μ L の 20 mg/mL (0.4 mg) DOPC リポソーム溶液を加え、不活性ガスである窒素をブローすることにより DOPC リポソーム溶液内のクロロホルム溶液を飛ばした。その後、マイクロチューブ中の 0.4 mg の DOPC はデシケーター内で小型油回転ポンプ (G-50DA、Ulvac Kiko、Miyazaki、Japan) によって減圧下で 2 ~ 12 時間程度乾燥させた。
2. 実験操作 1 のマイクロチューブ中の 0.4 mg の DOPC リポソームに 1 mL の 1 x Avidin Lipid Bilayer (ALB) Buffer A (10 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM NaCl) を加えた後、白濁するまで懸濁した。

[試薬調製表 5-1. 10 x Avidin Lipid Bilayer (ALB) Buffer A]

Sample	Vol. (mL)	Final conc.
1 M Tris-HCl pH 8.0	20	100 mM
5 M NaCl	40	1 M
ミリ Q 水	Up to 200 mL	

3. 5 mL テルモシリンジ (Terumo、Tokyo、Japan) の排出口に 100 nm-pore Polycarbonate filter (Pall Life sciences、Ann Arbor、MI、USA) を設置し、テルモシリンジ内に実験操作 2 の DOPC リポソーム溶液を投入した。その後、フィルターを設置したテルモシリンジの溶液出口に 1.5 mL のマイクロチューブを設置し、シリンジを押し出すことによって 1.5 mL のマイクロチューブ内に DOPC リポソーム溶液を濾過した。その後、4°C にて保存した。
4. 調製した DOPC リポソーム溶液は 1 週間程度で効果を失うため注意した [11]。

5.2.4 片端ビオチン化 λ DNA の調製

直鎖状 DNA の片端をガラス基板表面に固定するためには、直鎖状 DNA の片端をビオチン修飾する必要がある。本研究では直鎖状 DNA である λ DNA の片端をビオチン化修飾し、片端ビオチン化 λ DNA を作製した。なお、特に指定しない限り片端ビオチン化 λ DNA を λ DNA として記載した。その手順を下記に述べる。

1. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、40 μ g の λ DNA、400 pmol のビオチン化合成オリゴヌクレオチド 1 (Biotin-5'-GTA CTC CAG ACT TAG AAG ATG AT-3', 23mer、Japan Bio Services)、400 pmol のビオチン化合成オリゴヌクレオチド 2 (5'-P-AGG TCG CCG CCC ATC ATC TTC TAA GTC TGG AGT AC-3'-Biotin-TEG、35mer、Japan Bio Services) を含む全量 155 μ L の溶液を調製した。

[試薬調製表 5-2]

Sample	Vol. (μ L)	投入量
440 ng/ μ L λ DNA	90	39.6 μ g
100 pmol/ μ L ビオチン化合成オリゴヌクレオチド 1	2	200 pmol
100 pmol/ μ L ビオチン化合成オリゴヌクレオチド 2	2	200 pmol
滅菌水	Up to 155 μ L	

2. λ DNA のコンカテマー形成を防ぐために、実験操作 1 の調製溶液を含む 0.6 mL のマイクロチューブを恒温槽 (HB-100、TAITEC) 上で 65°C、5 分間加熱処理した。その後、氷上で急冷した。
3. 実験操作 2 の 0.6 mL のマイクロチューブに T4 DNA リガーゼ (TaKaRa) 付属の 10 x Ligation buffer (TaKaRa) を 1 x Ligation buffer となるように加えた後、2,450 U の T4 DNA リガーゼ (350 U/ μ L、TaKaRa) を加えて、恒温槽 (TAITEC) 上で 16°C、12 時間、インキュベートした (全量 180 μ L)。
4. T4 DNA リガーゼを失活させるために、実験操作 3 の調製溶液を含む 0.6 mL のマイクロチューブを恒温槽上で 65°C、5 分間インキュベートした後、室温まで自然冷却した。
5. 4 本のマイクロスピncラム S-400 (GE Healthcare) を準備した。3,000 r.p.m.、1 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピncラム S-400 を遠心することに

よってマイクロスピncラム S-400 内の内容液を除去した。

6. 2本のマイクロスピncラム S-400 に実験操作 4 の DNA 溶液を半量ずつ (90 μL) 加えて、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによって DNA を精製した。その後、精製 DNA 溶液を残りの 2 本のマイクロスピncラム S-400 に移し、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによって DNA を再度精製した。
7. 新たな 1.5 mL のマイクロチューブに精製した片端ビオチン化 λDNA を含む溶液をまとめた。
8. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、Biotinylated- λDNA 、5 U の Klenow Fragments (3'-5' Exo-) (New England Biolabs)、0.3 mM dNTPs Mixture (TaKaRa) を含む緩衝液 (1 x 2 NEBuffer [50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl pH 7.9、10 mM MgCl_2 、1 mM DDT]) を調製し、恒温槽上で 37°C、12 時間、インキュベートした (全量 180 μL)。

[試薬調製表 5-3]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
10 x 2 NEBuffer	18	1 x 2 NEBuffer
2.5 mM (each) dNTPs Mixture	2.5	0.3 mM
2.5 U/ μl Klenow Fragment (3'-5'Exo-)	2	5 U
Biotinylated- λDNA	Up to 180 μL	

9. Klenow Fragments (3'-5' Exo-) を失活させるために、実験操作 8 の調製溶液を含む 0.6 mL のマイクロチューブを恒温槽上で 70°C、10 分間インキュベートした後、室温まで自然冷却した。
10. 4本のマイクロスピncラム S-400 を準備した。3,000 r.p.m.、1 分間に卓上遠心機を設定し、4本のマイクロスピncラム S-400 を遠心することによってマイクロスピncラム S-400 内の内容液を除去した。
11. 2本のマイクロスピncラム S-400 に実験操作 9 の DNA 溶液を半量ずつ (90 μL) 加えて、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによって調製 DNA を精製した。その後、精製 DNA 溶液を残りの 2 本のマイクロスピncラム S-400 に移し、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによって

1. 改質したガラス基板に微細流路装置を貼り付け、微細流路装置を組み立てた。
2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、330 nM ニュートラアビジン (Thermo Scientific) を含む 1 x Avidin Lipid Bilayer (ALB) Buffer B (40 mM Tris-HCl pH 7.8、1 mM DTT、1 mM MgCl₂、0.2 mg/mL BSA) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、50 μ L/h、20 分間流路内に注入することによってガラス基板表面にニュートラアビジンを吸着させた。

[試薬調製表 5-5]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
33 μ M ニュートラアビジン	20	330 nM
10 x ALB Buffer B	20	1 x ALB Buffer B
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

3. 200 μ L の 1 x ALB Buffer A (10 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM NaCl) をシリンジに充填し、50 μ L/h、20 分間微細流路内に注入することによって流路内のフリーなニュートラアビジンを洗い流し、余剰なニュートラアビジンを取り除いた。
4. 100 μ L の DOPC リポソーム溶液をシリンジに充填し、50 μ L/h、80 ~ 90 分間流路内に注入することによってガラス基板表面に脂質二重層を形成させた。これにより、ガラス基板表面の pH の変動を抑え、DNA やタンパク質の非特異的吸着を防いだ [11]。
5. 200 μ L の 1 x ALB Buffer A をシリンジに充填し、50 μ L/h、20 分間微細流路内に注入することによって流路内のフリーな DOPC リポソーム溶液を洗い流し、余剰な DOPC リポソーム溶液を取り除いた。

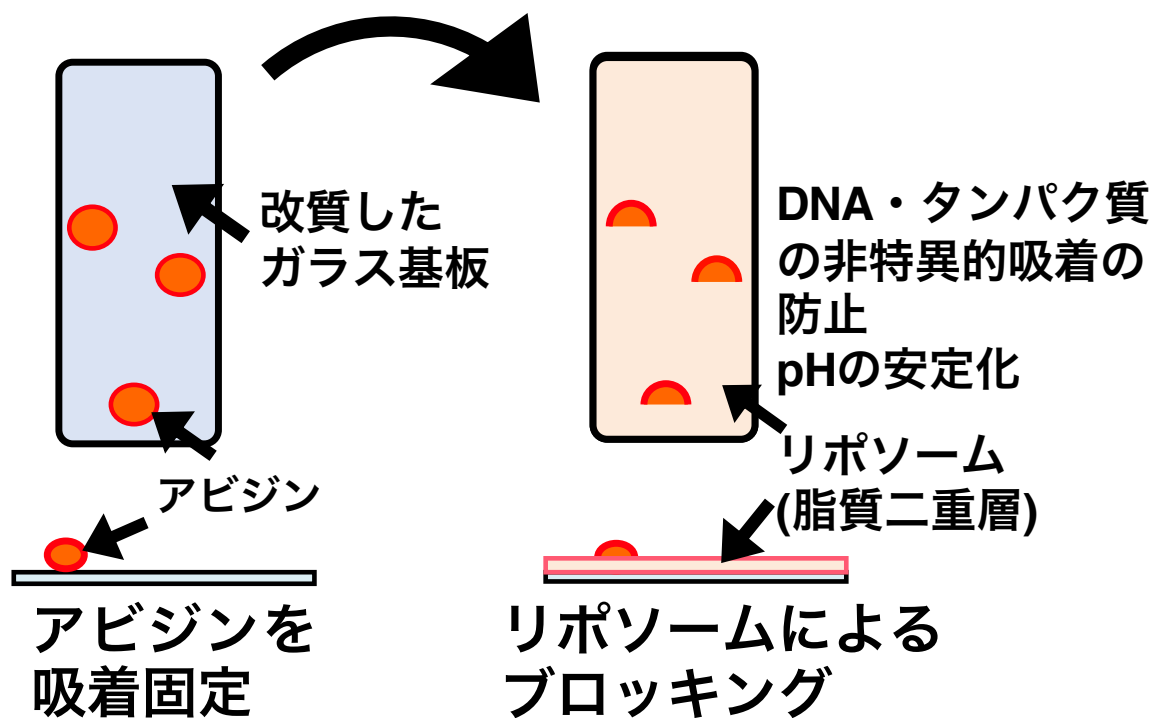


図 5-5. 流路内でのガラス基板表面修飾法の概要図

5.2.6 T7 Exo による DNA 分解反応の直接観察

本実験では λ DNA の dsDNA 領域と ssDNA 領域を染め分けることによって T7 Exo による DNA 分解反応の中間過程を直接観察することを試みた。図 5-3A は本実験にて用いた微細流路装置を示す。以下その実験方法を述べる。

1. 流路内のガラス基板修飾の方法は上記に示した「5.2.5 流路内でのガラス基板修飾」の実験操作と同様な実験操作にて、流路内のガラス基板表面を修飾した。
2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、60 ng の片端ビオチン化 λ DNA と 0.1 μ M SYTOX Orange を含む緩衝液 (T7 Exonuclease Buffer [50 mM potassium acetate, 20 mM Tris-acetate pH 7.9, 10 mM magnesium acetate, 1 mM dithiothreitol, New England Biolabs], 10% glycerol, 0.1% Tween 20, 2% 2-Mercaptoethanol, Oxygen-Scavenging System [2.3 mg/mL D-(+)-glucose, 0.1 mg/mL glucose oxidase, 18 μ g/mL catalase]) を調製 (全量 100 μ L) 後、シリレンジに充填し、50 μ L/h、25 分間流路内に注入することによって修飾したガラス基板表面にビオチン化 λ DNA の片端を固定した。

[試薬調製表 5-6]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
10 x T7 Exonuclease Buffer	10	1 x NEBuffer 4
10% 2-Mercaptoethanol	10	1%
50 % glycerol	20	10%
1 % Tween 20	10	0.1%
60 ng/ μL 片端ビオチン化 λDNA	1	0.6 ng/ μL
10 μM SYTOX Orange	0.5	0.1 μM
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μL	

3. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、20 U の T7 Exonucleases、2.68 pmol の ssBP-488、0.1 μM SYTOX Orange を含む緩衝液 (T7 Exonuclease Buffer、10% glycerol、0.1% Tween 20、2% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、50 $\mu\text{L}/\text{h}$ 、45 分間流路内に注入することによって T7 Exo による DNA 分解反応を直接観察した。

[試薬調製表 5-7]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
10 x T7 Exonuclease Buffer	20	1 x NEBuffer 4
10% 2-Mercaptoethanol	20	1%
50 % glycerol	40	10%
1 % Tween 20	20	0.1%
10 U/ μL T7 Exonuclease	2	0.1 U/ μL
10 μM SYTOX Orange	2	0.1 μM
2.68 pmol/ μL ssBP-488	1	0.014 pmol/ μL
230 mg/mL glucose	2	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	2	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	2	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 200 μL	

4. SYTOX Orange により染色した λ DNA の dsDNA 領域の観察には G-2A 励起光 (EX535/50、DM575、EM590) の蛍光顕微鏡フィルターセットを用いた。一方、ssBP-488 により染色した ssDNA 領域の観察には B-2A 励起光 (EX470/40、DM505、EM520) の蛍光顕微鏡フィルターセットを用いた。
5. DNA 分解反応前と DNA 分解反応開始 40 分間後、約 30 秒間蛍光照射することによって λ DNA の dsDNA 領域を観察した。また、10 分間ごとに 40 分間、約 30 秒間蛍光照射することによって T7 Exo による DNA 分解領域に対応する ssDNA 領域を観察した。
6. 同一の顕微鏡視野内にて T7 Exo による DNA 分解反応をビデオレート (30 frames/sec) で撮影した後、画像化した。DNA の dsDNA 領域と ssDNA 領域の蛍光領域をもとに ImageJ を用いることによって DNA の長さを解析した。

5.2.7 T7 Exo を短時間供給したときの DNA 分解反応の直接観察

本実験では、T7 Exo を短時間、供給したときの DNA 分解反応を直接観察することによって T7 Exo の動的挙動を明らかにすることを試みた。図 5-3B は本実験にて用いた微細流路装置を示す。以下その実験方法を述べる。

1. 流路内のガラス基板修飾の方法は上記に示した「5.2.5 流路内でのガラス基板修飾」の実験操作と同様な実験操作にて、流路内のガラス基板表面を修飾した。
2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、60 ng の片端ビオチン化 λ DNA と 0.1 μ M SYTOX Orange を含む緩衝液 (T7 Exo Buffer、10% glycerol、0.1% Tween 20、2% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 100 μ L) 後、シリンジに充填し、50 μ L/h、25 分間流路内に注入することによってガラス基板表面にビオチン化 λ DNA の片端を固定した。

[試薬調製表 5-8]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
10 x T7 Exonuclease Buffer	10	1xNEBuffer 4
10% 2-Mercaptoethanol	10	1%
50 % glycerol	20	10%
1 % Tween 20	10	0.1%
60 ng/ μ L 片端ビオチン化 λ DNA	1	0.6 ng/ μ L

10 μ M SYTOX Orange	1	0.1 μ M
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μ L	

3. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、20U の T7 Exo、0.1 μ M SYTOX Orange を含む緩衝液 (T7 Exo Buffer、10% glycerol、0.1% Tween 20、2% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、50 μ L/h、3 分間流路内に注入した。

[試薬調製表 5-9]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
10 x T7 Exonuclease Buffer	20	1 x NEBuffer 4
10% 2-Mercaptoethanol	20	1%
50 % glycerol	40	10%
1 % Tween 20	20	0.1%
10 U/ μ L T7 Exonuclease	2	20 U
10 μ M SYTOX Orange	2	0.1 μ M
230 mg/mL glucose	2	2.3 mg/mL
1.8mg/mL catalase	2	0.018 mg/mL
10mg/mL glucose oxidase	2	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

4. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、20 U の T7 Exo を含む緩衝液を注入した直後 (3 分間後)、0.1 μ M SYTOX Orange のみ含む (T7 Exo を含まない) 緩衝液 (T7 Exo Buffer、10% glycerol、0.1% Tween 20、2% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、50 μ L/h、45 分間流路内に注入することによって T7 Exo による DNA 分解反応を観察した。

[試薬調製表 5-10]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
10 x T7 Exonuclease Buffer	20	1 x NEBuffer 4
10% 2-Mercaptoethanol	20	1%
50 % glycerol	40	10%
1 % Tween 20	20	0.1%
10 μM SYTOX Orange	2	0.1 μM
230 mg/mL glucose	2	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	2	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	2	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 200 μL	

5. G-2A 励起光の蛍光顕微鏡フィルターセットを用いることにより 5 分間ごとに 40 分間、約 30 秒間蛍光照射することによって SYTOX Orange により染色した λDNA の dsDNA 領域を観察した。
6. 同一の顕微鏡視野内にて T7 Exo による DNA 分解反応をビデオレート (30 frames/sec) で撮影した後、画像化した。DNA の dsDNA 領域の蛍光領域をもとに ImageJ を用いることにより DNA の長さを解析した。

5.2.8 T7 Exo を連続的に供給したときの DNA 分解反応の直接観察

本実験では、T7 Exo を連続的に供給したときの DNA 分解反応を直接観察することによって T7 Exo の動的挙動を明らかにすることを試みた。図 5-3C は本実験にて用いた微細流路装置を示す。以下その実験方法を述べる。

1. 流路内のガラス基板修飾の方法は上記に示した「5.2.5 流路内でのガラス基板修飾」の実験操作と同様な実験操作にて、流路内のガラス基板を修飾した。
2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、60 ng の片端ビオチン化 λDNA と 0.1 μM SYTOX Orange を含む緩衝液 (T7 Exo Buffer、10% glycerol、0.1% Tween 20、2% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 100 μL) 後、シリンジに充填し、50 $\mu\text{L}/\text{h}$ 、25 分間流路内に注入することによってガラス基板表面にビオチン化 λDNA の片端を固定した。

[試薬調製表 5-11]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
10 x T7 Exonuclease Buffer	10	1xNEBuffer 4
10% 2-Mercaptoethanol	10	1%
50 % glycerol	20	10%
1 % Tween 20	10	0.1%
60 ng/ μL 片端ビオチン化 λDNA	1	0.6 ng/ μL
10 μM SYTOX Orange	1	0.1 μM
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μL	

3. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて 20 U の T7 Exo、0.1 μM SYTOX Orange を含む緩衝液 (T7 Exo Buffer、10% glycerol、0.1% Tween 20、2% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、50 $\mu\text{L}/\text{h}$ 、45 分間流路内に注入することによって T7 Exo による DNA 分解反応を観察した。

[試薬調製表 5-12]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
10 x T7 Exonuclease Buffer	20	1 x NEBuffer 4
10% 2-Mercaptoethanol	20	1%
50 % glycerol	40	10%
1 % Tween20	20	0.1%
10 U/ μL T7 Exonuclease	2	0.1 U/ μL
10 μM SYTOX Orange	2	0.1 μM
230 mg/mL glucose	2	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	2	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	2	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 200 μL	

4. G-2A 励起光の蛍光顕微鏡フィルターセットを用いることにより 5 分間ごとに 40 分間、約 30 秒間蛍光照射することによって SYTOX Orange により染色した λ DNA の dsDNA 領域を観察した。
5. 同一の顕微鏡視野内にて T7 Exo による DNA 分解反応をビデオレート (30 frames/sec) で撮影した後、画像化した。DNA の dsDNA 領域の蛍光領域をもとに ImageJ を用いることにより DNA の長さを解析した。

§5.3 結果と考察

5.3.1 T7 Exo による DNA 分解反応の直接観察

本実験では dsDNA の蛍光染色が可能な SYTOX Orange と ssDNA の蛍光標識が可能な ssBP-488 を用い、DNA の dsDNA 領域と ssDNA 領域を染め分けることにより T7 Exo による DNA 分解反応を直接観察した。図 5-3A は本実験にて用いた微細流路装置を示す。DNA 分解反応の間、 λ DNA の dsDNA 領域の長さは単調に減少し (図 5-6A)、分解領域に対応する ssDNA 領域の長さは λ DNA の自由端から徐々に拡大した (図 5-6B)。また、T7 Exo による DNA 分解反応後 (40 分間) の λ DNA の dsDNA 領域と ssDNA 領域を重ね合わせて長さを計測すると、DNA 分解反応前の λ DNA の dsDNA 領域の長さと同じになった (図 5-6C)。以上の結果、DNA の dsDNA 領域と ssDNA 領域を染め分けることにより T7 Exo による DNA 分解反応の中間過程を直接観察することに成功した。DNA 分解反応溶液中の数百万以上の全 DNA を対象としてエキソヌクラーゼによる DNA 分解反応が進行することによる DNA 分解反応産物を評価するゲル電気泳動法の結果では、それらの DNA を分解するエキソヌクラーゼの挙動の平均値の情報しか得られないのに対して、本研究は 1 分子レベルの蛍光観察によって DNA 1 分子を分解する個々の T7 Exo による DNA 分解反応の中間過程を捉えることに成功した。また、これまでの 1 分子レベルでのエキソヌクラーゼ (λ exonuclease、Exonuclease III) の研究では、インターカレーター型蛍光色素によって染色した dsDNA の蛍光領域をもとに分解した DNA の長さの変化を直接観察する実験系 [3]、[4] や DNA に付加した磁気ビーズを追跡することによって DNA 分解反応による dsDNA から ssDNA への変化を捉える実験系 [5] によって研究が行われてきた。しかしながら、これらの研究ではエキソヌクラーゼによって分解した DNA の分解領域に対応する ssDNA 領域は可視化されていない。一方、本研究は DNA の dsDNA 領域と ssDNA 領域を染め分けることによりエキソヌクラーゼによる DNA 分解反応の反応過程の詳細を捉えることに成

功しており、この点が本研究の1分子レベルの蛍光観察の大きな特徴である。以上の結果から、ssBP-488によるssDNAの可視化はDNA分解反応をはじめとするDNA代謝反応の素反応やその中間過程の1分子レベルでの直接観察に適用できることが示された。

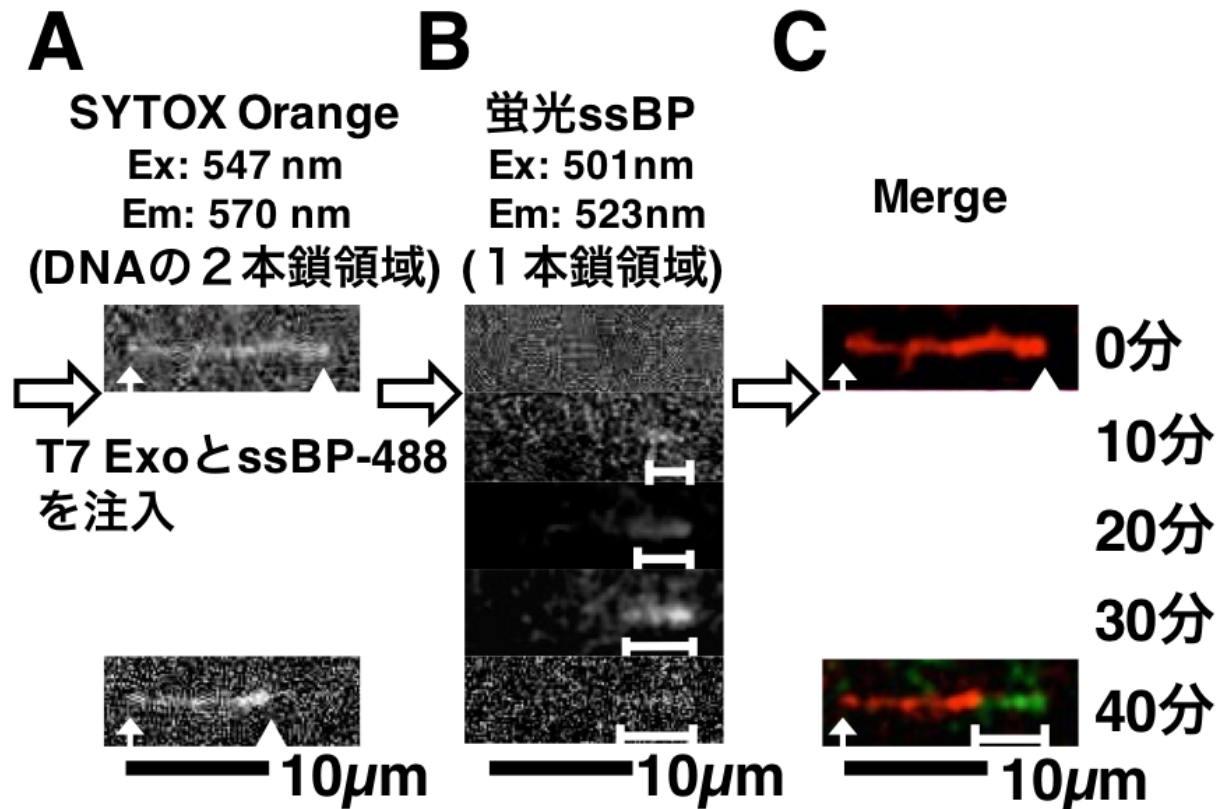


図 5-6. T7 Exo による DNA 分解反応の観察画像 伸長した λ DNA の dsDNA 領域と ssDNA 領域の長さ情報をもとに T7 Exo による DNA 分解反応を解析した。

A T7 Exo により分解した λ DNA の 2 本鎖領域の観察画像

B T7 Exo が DNA を分解したときに産出した ssDNA 領域の観察画像

C A の画像と B の画像を重ね合わせた観察画像

赤シグナル：SYTOX Orange により染色した λ DNA の dsDNA 領域

緑シグナル：ssBP-488 により染色した ssDNA 領域

白矢印： λ DNA の dsDNA 領域の固定端

白三角： λ DNA の dsDNA 領域の自由端

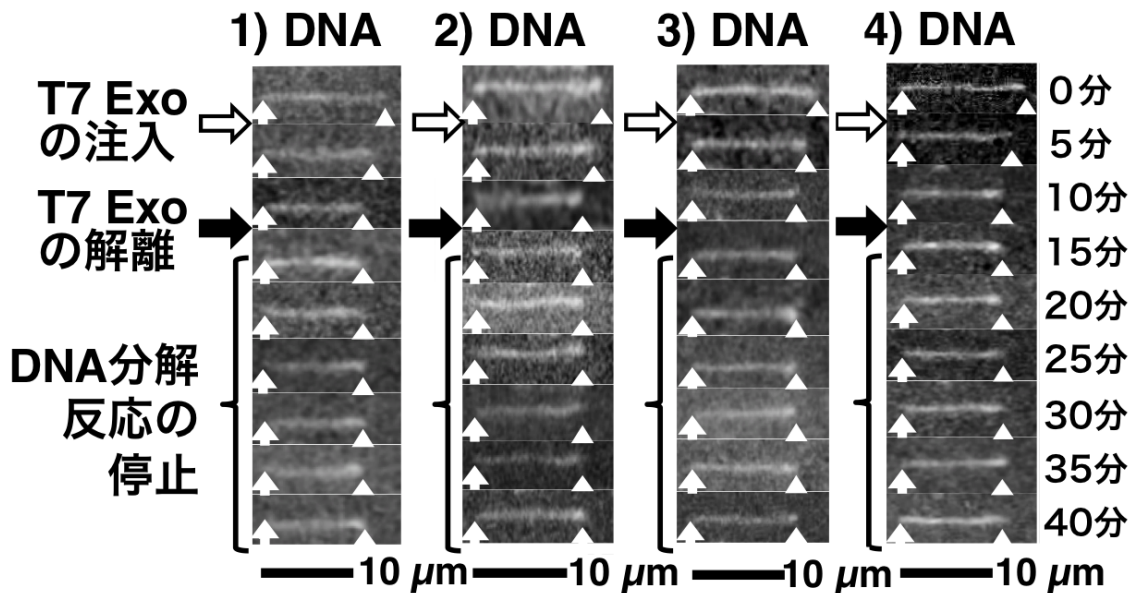
白横棒：ssDNA 領域

黒線：10 μ m のスケールバー

5.3.2 T7 Exo を短時間ないし連続的に供給したときの DNA 分解反応の直接観察

次に、本実験は T7 Exo を短時間、供給したときの DNA 分解反応を直接観察した。図 5-3B は本実験にて用いた微細流路装置を示す。DNA 分解反応の間、T7 Exo を含まない緩衝液の供給から 10 分間までは、 λ DNA の dsDNA 領域の長さが自由端から徐々に減少した。一方、その 10 分間以降では、 λ DNA の dsDNA 領域の長さの減少が停止した (図 5-7A)。以上の結果、T7 Exo を含まない緩衝液の供給から 10 分間までは、DNA に結合した T7 Exo が dsDNA 領域を分解し、それ以降では T7 Exo が DNA から解離した可能性が高い。その結果、10 分間以降では DNA の dsDNA 領域の長さの変化が見られなかったと考えられる (図 5-7B)。

A



B

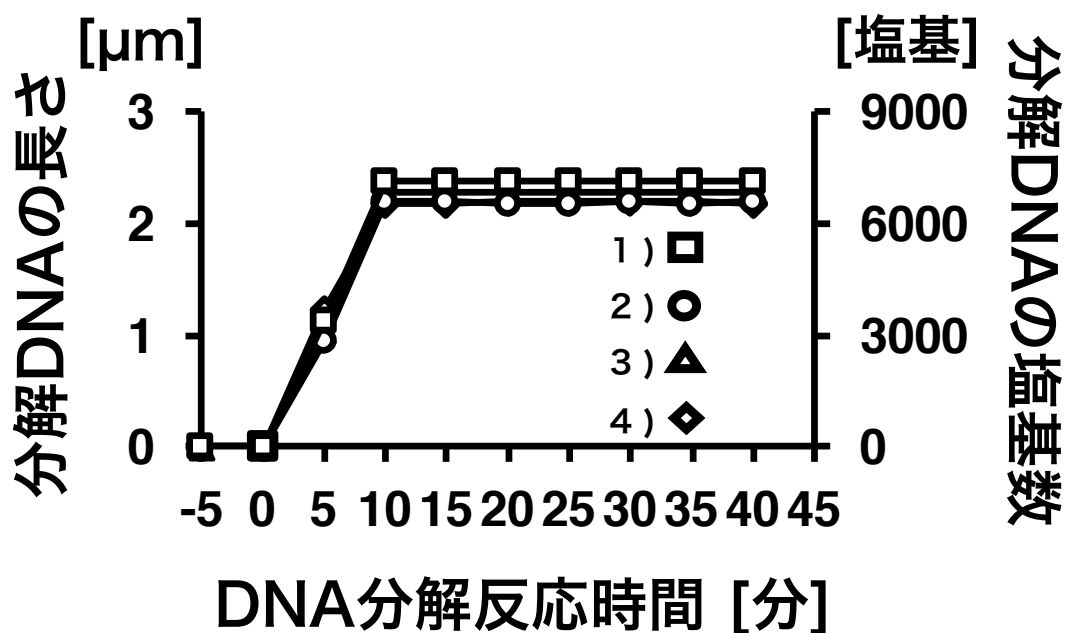


図 5-7. T7 Exo を短時間、供給した実験での DNA 分解反応の直接観察とそのときの DNA 分解反応時間あたりの T7 Exo が分解した dsDNA 領域の長さとその塩基数 流路内に 3 分間 T7 Exo を含む緩衝液を供給した後、40 分間 T7 Exo を含まない緩衝液を供給した。T7 Exo による DNA 分解反応は伸長した λDNA の dsDNA 領域の長さ情報をもとに解析され、DNA の dsDNA 領域は SYTOX Orange によって蛍光染色された。

A T7 Exo が分解した λDNA 4 分子の dsDNA 領域の直接観察した連続画像

白矢印：λDNA の dsDNA 領域の固定端

白三角：λDNA の dsDNA 領域の自由端

黒線：10 μm のスケールバー

B DNA 分解反応時間あたりの T7 Exo が分解した λDNA 4 分子の dsDNA 領域の長さとその塩基数

白四角：T7 Exo が分解した A-1 の λDNA の dsDNA 領域の長さとその塩基数

白丸：T7 Exo が分解した A-2 の λDNA の dsDNA 領域の長さとその塩基数

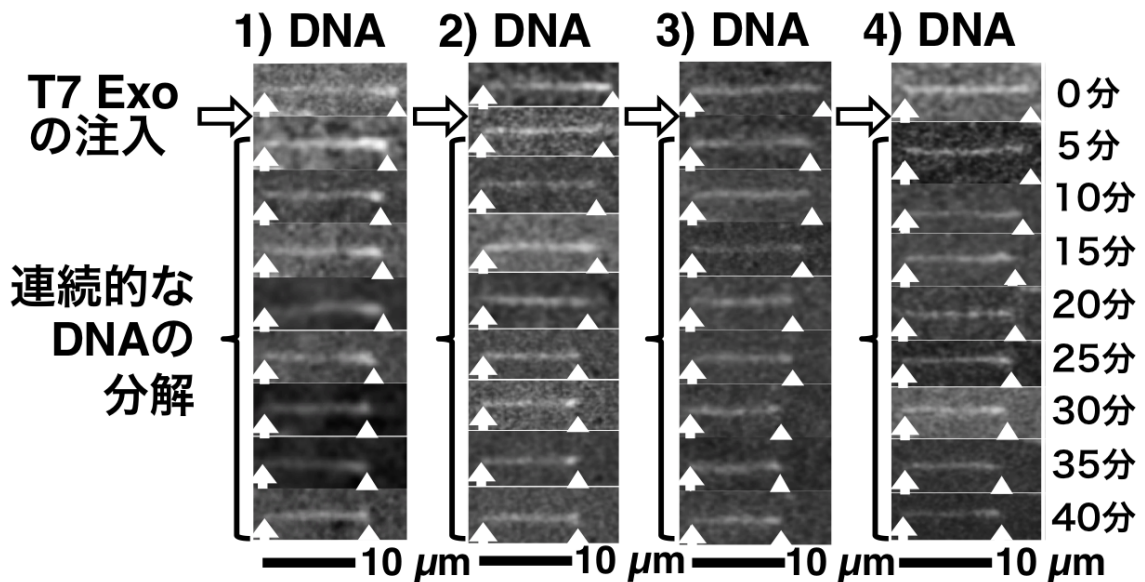
白三角：T7 Exo が分解した A-3 の λDNA の dsDNA 領域の長さとその塩基数

白ダイヤ：T7 Exo が分解した A-4 の λDNA の dsDNA 領域の長さとその塩基数

さらに、本実験では T7 Exo を連続的に供給した実験での DNA 分解反応の直接観察した。図 5-3C は本実験にて用いた微細流路装置を示す。T7 Exo による DNA 分解反応の間、λDNA の dsDNA 領域の長さは自由端から減少し、その減少の間、5

分間から 15 分間程度の一時的な λ DNA の dsDNA 領域の長さの減少が停止した (図 5-8A)。T7 Exo を短時間、供給したときの DNA 分解反応の実験結果、DNA 分解反応の間の λ DNA の dsDNA 領域の長さの減少の停止は DNA から T7 Exo が解離する可能性が示唆されたことから、この一時的な停止は T7 Exo が DNA から解離した可能性が考えられる。これらの実験結果から、T7 Exo が DNA の自由端に結合し、自由端から DNA を分解することによって DNA が徐々に短くなり、さらに T7 Exo が解離することによって DNA の分解が停止したという T7 Exo が他の T7 Exo に入れ替わることによる DNA 分解反応の素反応が連続的に繰り返されていることが強く示唆された (図 5-8B)。上記に述べたように、エキソヌクレアーゼによる DNA 分解反応産物をゲル電気泳動法によって得られる結果では、DNA 分解反応の素反応やその中間過程が覆い隠されてしまい、DNA を分解するエキソヌクレアーゼの動的挙動を明らかにすることができなかった。一方、本研究は 1 分子レベルでの蛍光観察によってエキソヌクレアーゼによる DNA 分解反応の素反応やその中間過程やエキソヌクレアーゼ 1 分子の動的挙動を明らかにすることができた。しかしながら、さらなるより詳細な T7 Exo 1 分子の動態特性を解析するためには、蛍光標識した T7 Exo を用いることによる解析が必要である。

A



B

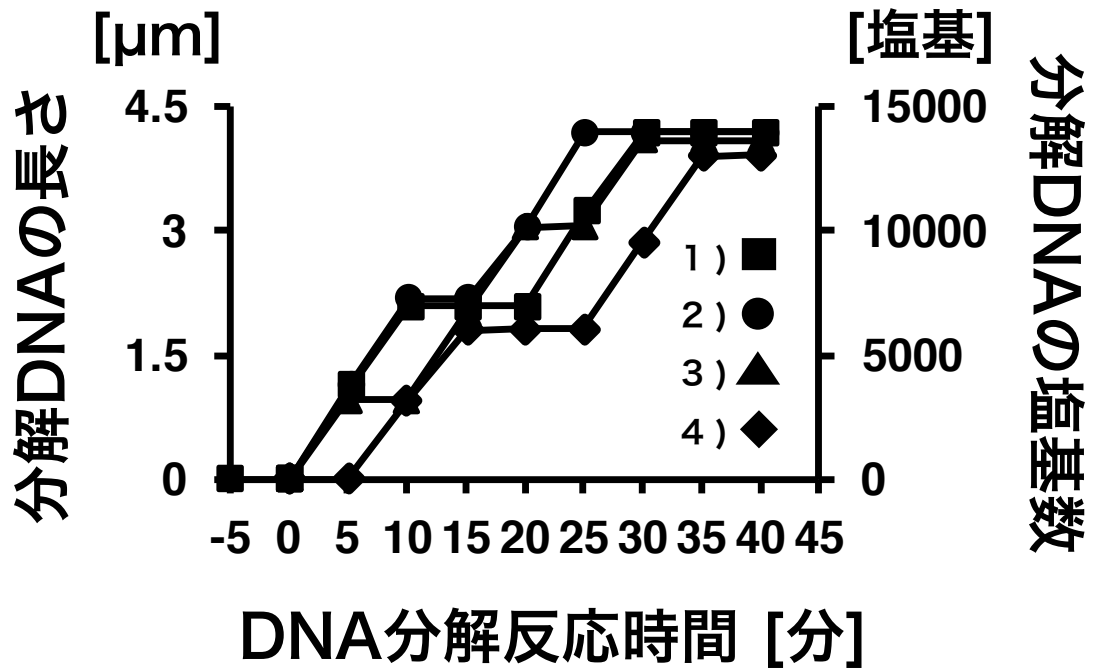


図 5-8. T7 Exo を連続的に供給した実験での DNA 分解反応の直接観察とそのときの DNA 分解反応時間あたりの T7 Exo が分解した dsDNA 領域の長さとその塩基数 T7 Exo による DNA 分解反応は伸長した λ DNA の dsDNA 領域の長さ情報をもとに解析され、DNA の dsDNA 領域は SYTOX Orange によって染色された。

A T7 Exo が分解した λ DNA 4 分子の dsDNA 領域の直接観察した連続画像

白矢印： λ DNA の dsDNA 領域の固定端

白三角： λ DNA の dsDNA 領域の自由端

黒線：10 μ m のスケールバー

B DNA 分解反応時間あたりの T7 Exo が分解した λ DNA 4 分子の dsDNA 領域の長さとその塩基数

黒四角：T7 Exo が分解した A-1 の λ DNA の dsDNA 領域の長さとその塩基数

黒丸：T7 Exo が分解した A-2 の λ DNA の dsDNA 領域の長さとその塩基数

黒三角：T7 Exo が分解した A-3 の λ DNA の dsDNA 領域の長さとその塩基数

黒ダイヤ：T7 Exo が分解した A-4 の λ DNA の dsDNA 領域の長さとその塩基数

5.3.3 T7 Exo による DNA 分解反応の速度

図 5-9 は T7 Exo を短時間ないし連続的に供給した実験によって得られた DNA 分解反応の速度のヒストグラムを示す。T7 Exo を短時間、供給したときの DNA 分解反応の平均速度は 5.7 塩基/秒、平均 processivity は 6346 塩基であった。一方、T7 Exo を連続的に供給したときの DNA 分解反応の平均速度は 5.3 塩基/秒、平均 processivity は 5072 塩基であった。これら 2 つの実験結果の DNA 分解反応の平均速度と平均 processivity はほぼ等しく、5.5 塩基/秒と 5882 塩基であった。従って、本研究の結果は多分子による挙動の平均値の測定では求めることができない T7 Exo による DNA 分解反応の速度や processivity を決定することに成功した。しかしながら、本研究では DNA の 2 本鎖領域の染色に用いているインターカレーター型蛍光色素 (SYTOX Orange) は DNA 二重らせん構造内に挿入することによって規則的な DNA 二重らせん構造の糖-リン酸骨格を変形させ、塩基間のスタッキング相互作用を弱めることから、インターカレーター型蛍光色素が T7 Exo による DNA 分解反応の速度に影響を与える可能性が考えられる。そこで、本研究の結果にて得られた T7 Exo による DNA 分解反応の速度と既往の研究にて報告されている T7 Exo による DNA 分解反応の速度を比較した。既往の研究の解析法は Tethered Particle Motion (TPM) という DNA の片端を基板表面に固定し、他片端を微小粒子と結合させた後、その DNA が結合した微小粒子の挙動を追跡することによって、DNA の末端間距離の変化を測定するという解析手法である。既往の研究はこの解析法を用いることによって T7 Exo により dsDNA が ssDNA へと分解する DNA 分解反応の速度を決定しており、その速度は 5.5 塩基/秒と報告されている [12]。本研究の結果は既往の研究の結果とほぼ同じ T7 Exo による DNA 分解反応の速度であることから、インターカレーター型蛍光色素が T7 Exo による DNA 分解反応に与える影響は極めて小さいことが示された。既往の研究では T7 Exo による DNA 分解反応の速度を間接的に測定しているのに対して、本研究では DNA 1 分子に対する T7 Exo による DNA 分解反応を直接観察することができた点が大きな特徴であり、既往の研究では測定することができなかった T7 Exo の動的挙動や平均 processivity を明らかにすることができた。

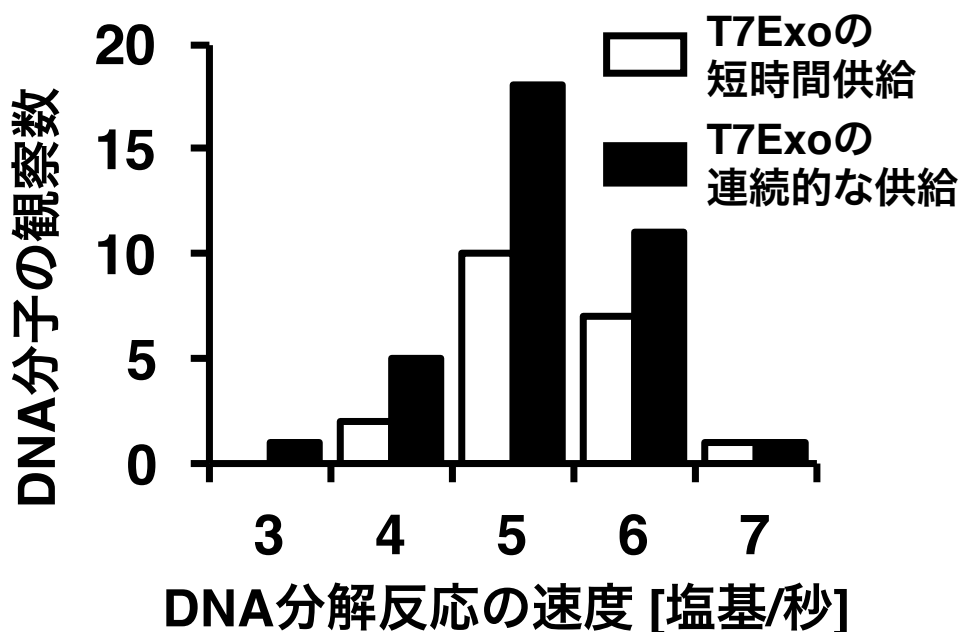


図 5-9. T7 Exo を短時間ないし連続的に供給したときの DNA 分子の観察数あたりの DNA 分解反応の速度の分布

白棒： T7 Exo を短時間、供給したときの DNA 分解反応

黒棒： T7 Exo を連続的に供給したときの DNA 分解反応

§5.4 第 5 章のまとめ

本研究では、DNA の dsDNA 領域と ssDNA 領域を染め分けることによって T7 Exo による DNA 分解反応の直接観察にはじめて成功した。これらの結果、ssBP-488 による ssDNA の可視化は DNA 分解反応をはじめとする DNA 代謝反応の直接観察に適用することができることが実証された。また、T7 Exo を短時間ないし連続的に供給したときの DNA 分解反応の直接観察の結果、DNA 1 分子を対象として T7 Exo が結合、分解、解離する DNA 分解反応の素反応やその中間過程の捉えることができ、さらに、T7 Exo による DNA 分解反応の平均速度と平均 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。本研究は、多分子による解析から得られる平均値の測定では明らかにすることができなかった、T7 Exo による DNA 分解反応の中間過程を直接観察することに成功したことから、ゲノムの安定性の破綻や維持に重要な役割を果たす DNA 複製、修復、組換え修復、相同組換えなどの反応過程にて機能するエキソヌクレアーゼの動的挙動の解析に適用することができるため、癌検知に向けた分析技術の開発、癌発生の機構

の研究及び老化の研究への応用が期待できる [13]、[14]。

§5.5 参考文献

- [1] Shevelev, I. V., and Hübscher, U.
The 3'–5' exonucleases.
Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002, **3**, 364-376.
- [2] Nimonkar, A. V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J. L., Wyman, C., Modrich P., and Kowalczykowski, S. C.
BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair.
Genes & Development, 2011, **25**, 350-362.
- [3] Kurita, H., Torii, K., Yasuda, H., Takashima, K., Katsura, S., and Mizuno, A.
The effect of physical form of DNA on exonucleaseIII activity revealed by single-molecule observations.
Journal of Fluorescence, 2009, **19**, 33-40.
- [4] Matsuura, S. I., Komatsu, J., Hirano, K., Yasuda, H., Takashima, K., Katsura, S., and Mizuno, A.
Real-time observation of a single DNA digestion by λ exonuclease under a fluorescence microscope field.
Nucleic Acids Research, 2001, **29**, e79-e79.
- [5] van Oijen, A. M., Blainey, P. C., Crampton, D. J., Richardson, C. C., Ellenberger, T., and Xie, X. S.
Single-molecule kinetics of λ exonuclease reveal base dependence and dynamic disorder.
Science, 2003, **301**, 1235-1238.
- [6] Sayers, J. R., Schmidt, W., and Eckstein, F.
5'–3' Exonucleases in phosphorothioate-based oligonucleotide-directed mutagenesis.
Nucleic Acids Research, 1988, **16**, 791-802.
- [7] Thomas, K. R., and Olivera, B. M.
Processivity of DNA exonucleases.
Journal of Biological Chemistry, 1978, **253**, 424-429.
- [8] Kerr, C., and Sadowski, P. D.

- Gene 6 exonuclease of bacteriophage T7 II. Mechanism of the reaction.
Journal of Biological Chemistry, 1972, **247**, 311-318.
- [9] Shinozaki, K., and Tuneko, O.
T7 gene 6 exonuclease has an RNase H activity.
Nucleic Acids Research, 1978, **5**, 4245-4262.
- [10] Mitsunobu, H., Zhu, B., Lee, S. J., Tabor, S., and Richardson, C. C.
Flap endonuclease activity of gene 6 exonuclease of bacteriophage T7.
Journal of Biological Chemistry, 2014, **289**, 5860-5875.
- [11] Granéli, A., Yeykal, C. C., Prasad, T. K., and Greene, E. C.
Organized arrays of individual DNA molecules tethered to supported lipid bilayers.
Langmuir, 2006, **22**, 292-299.
- [12] Plénat, T., Tardin, C., Rousseau, P., and Salomé, L.
High-throughput single-molecule analysis of DNA–protein interactions by tethered particle motion.
Nucleic Acids Research, 2012, **40**, e89-e89.
- [13] Symington, L.S., and Gautier, J.
Double-strand break end resection and repair pathway choice.
Annual Review of Genetics, 2011, **45**, 247-271.
- [14] Costes, A., and Lambert, S. A. E.
Homologous Recombination as a Replication Fork Escort: Fork-Protection and Recovery.
Biomolecules, 2013, **3**, 39-71.

第 6 章

負の超らせん歪みによる DNA 二重らせんの局所的な開裂の直接観察

§6.1 序論

細胞核内の染色体 DNA は染色体軸を形成するタンパク質である核マトリクスに固定化されており、ループ構造を形成することによって超らせんをはじめとする高次構造が導入されている。DNA の二重らせんを過剰に巻くことにより正の超らせんが導入され、DNA の二重らせんを巻き戻すことにより負の超らせんが導入される。特に、負の超らせんは開裂構造、十字構造、Z型構造などの非 B 型 DNA 二次構造 (非 B 型構造) を誘導することが知られており、転写や DNA 複製などの DNA 代謝反応の制御に関与することが示唆されている [1]、[2]、[3]、[4]、[5]。

負の超らせんによって生じる DNA 二重らせんのねじれによる歪みは、A + T-rich 領域に局所的な開裂を生じることが示されている [1]、[3]。この局所的な開裂に関する研究の多くでは、超らせん状態の閉環状 DNA をアガロースゲル電気泳動法や二次元電気泳動法によって解析している [3]、[6]。しかしながら、これらの解析では、DNA の超らせんが維持されている状態でしか評価することができないために、動的に変動している超らせんに対応する DNA の構造変動の過程を解析することが困難である (多分子解析)。また、閉環状 DNA に超らせんを導入するのに必要なエネルギーは小さく、常温の熱擾乱による熱エネルギーの揺らぎ程度で超らせんが導入される。このため、水溶液内の数百万以上の全閉環状 DNA には局所的に様々な密度の超らせんが導入されている状態であると考えられることから、全閉環状 DNA に対して指定した超らせん密度の超らせんを制御することが極めて困難である。これらの要因から、超らせん歪みにより生じる局所的な開裂などの非 B 型構造が転写や DNA 複製反応などの DNA 代謝反応に果たす役割の実態は極めて限られた知見しかないのが実情である。

これまでに、DNA 1 分子を操作することが可能な磁気ピンセット装置による直鎖状 DNA への超らせんの導入や DNA 1 分子を観測することが可能な原子間力顕微鏡による超らせん状態の DNA 1 分子の観測に関する研究成果が報告されている [7]、[8]、[9]。しかしながら、磁気ピンセット装置を用いた直鎖状 DNA の超らせんの解析では、DNA に結合した磁気ビーズを追跡することによる DNA の末端間距離の変

化の情報もとに DNA に超らせんが導入されたかどうかを明らかにすることができるが、超らせん歪みから生じる局所的な開裂の位置などの情報を得ることは困難である [8]。原子間力顕微鏡を用いた閉環状 DNA の超らせんの解析においても、マイカ基板上に超らせん状態の閉環状 DNA を非特異的吸着させる必要があるため、超らせん密度の制御や超らせん歪みによって生じる局所的な開裂など非 B 型構造の変化の過程を解析することができず、局所的な開裂が DNA 複製や転写などに果たしている役割を評価することはできない [7]、[9]。従って、これらの既往の研究では負の超らせん歪みから生じる局所的な開裂の位置や変化の過程の決定的な情報を得ることは極めて困難である。

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から構成された 1 分子蛍光観察装置を開発した。磁気ピンセット装置は直鎖状 DNA に任意の超らせん密度を任意のタイミングで制御することが可能であることから、直鎖状 DNA への正や負の超らせんを導入することが可能である。さらに、ssDNA を可視化することが可能である RPA-YFP を用いることによって、蛍光顕微鏡視野内にて直鎖状 DNA に負の超らせんを導入し、負の超らせん歪みにより生じた局所的な開裂を直接観察した。直鎖状 DNA には λ DNA と Simian Virus 40 (SV40) の DNA 複製起点を含む λ DNA (SV40ori- λ DNA) を用いた。 λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の局所的な開裂は RPA-YFP により 1 本鎖 DNA (single-stranded DNA、ssDNA) 領域を標識後、YOYO-1 により 2 本鎖 DNA (double-stranded DNA、dsDNA) 領域を染色することによって直接観察された。さらに、負の超らせん密度を増加したときの λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の局所的な開裂の頻度を解析することによって負の超らせん歪みによる局所的な開裂の特性を明らかにすることを試みた。

6.1.1 DNA 二重らせん構造

DNA 二重らせん構造は対イオンや相対湿度などの環境条件に依存して変化する。DNA 二重らせん構造は A 型構造からなる A 族と B 型構造、C 型構造、D 型構造、E 型構造、T 型 DNA 構造などからなる B 族とに分類できる。非 B 型構造には A 型構造、左巻きの DNA 二重らせん構造である Z 型構造、DNA 三重らせん構造である H 型構造が存在する。低イオン溶液内での DNA 二重らせん構造では B 型構造をとる。B 型構造の右巻きのらせん回転は、1 回転あたり 10.4~10.6 塩基対である [10]。

6.1.2 超らせん構造

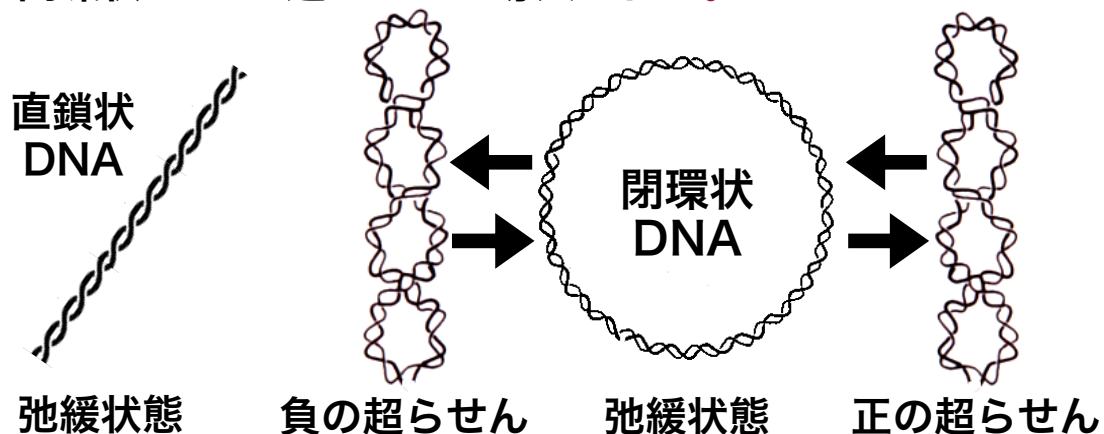
水溶液中の DNA の形態はブラウン運動によってランダムに変化する。このとき、弛緩状態の直鎖状 DNA にはねじれが導入されないために、固定化していない状態では超らせんは導入されない。一方、閉環状 DNA にはねじれが導入されるため、固定化していない状態でも超らせんは導入される。具体的に述べると、弛緩状態の直鎖状 DNA を円環状に閉じたとしても、超らせんは導入されない。一方、弛緩状態の直鎖状 DNA の二重らせんを巻き戻した後、直鎖状 DNA を円環状に閉じると DNA が安定な B 型構造に戻ろうと二重らせんに歪みが生じることより超らせんが導入される。超らせんには負の超らせんと正の超らせんの 2 つの種類がある。弛緩状態の直鎖状 DNA の両端を繋ぐ前、DNA 二重らせんを巻き戻すと負の超らせんが導入され、弛緩状態の直鎖状 DNA の両端を繋ぐ前、DNA 二重らせんを過巻すると正の超らせんが導入される。

超らせんは細胞核内の染色体 DNA にて生じている。この理由は、細胞周期的に核マトリクスに足場として染色体 DNA が固定されることによって超らせんによるループ構造が形成されるからである。そのため、核マトリクスに固定化されている染色体 DNA は超らせんを導入することが知られている [1]、[10]。

水溶液内の DNA は熱運動によって揺らいでいる。

直鎖状 DNA：超らせんが導入されない。

閉環状 DNA：超らせんが導入される。



常温程度の水溶液でも熱運動によって超らせんが導入される。

→ 試験管内実験では超らせんの状態を制御することが困難

図 6-1. 直鎖状 DNA と閉環状 DNA の超らせん

DNA のトポロジー変化は DNA のライジング (Wr) とツイスト (Tw) の 2 つのパラメータにより示すことができる。ツイスト数 (Tw) は DNA 二重らせんの回転数である。ライジング数 (Wr) は DNA 二重らせんの交差の軸の回数である。閉環状 DNA や直鎖状 DNA の DNA 二重らせんでは DNA のトポロジー的にリンク数 (Lk) が不変の整数となるため、中心軸の周りを巻く DNA 二重らせんのツイスト数とライジング数の回転数も整数となる。そのため、DNA 二重らせんのツイスト数とライジング数の合計をリンク数 (Lk) として定義すると、

$$Lk = Tw + Wr$$

として表すことができる。また、弛緩状態の DNA のリンク数は Lk_0 と定義すると、

$$Lk_0 = Tw_0$$

として表すことができる。 Lk と Lk_0 間のリンク数の差は ΔLk と定義すると、

$$\Delta Lk = Lk - Lk_0 = \Delta Tw + Wr$$

として表すことができ、 ΔLk の差の値の変化は DNA 二重らせんの回転の修正 ($\Delta Tw = Tw - Tw_0$) や交差 (Wr) により蓄積する。この時の超らせん密度 (σ) は、

$$\sigma = \Delta Lk / Lk_0$$

として表すことができる。このように、DNA 二重らせんの巻き戻しや過巻きした回数は正規化することが可能である。DNA は $\sigma < 0$ の時に負の超らせんを形成し、 $\sigma > 0$ の時に正の超らせんを形成する [1]、[10]。

6.1.3 バブル構造

塩基対間の水素結合の開裂は DNA 二重らせんを巻き戻すことによって生じる。DNA 二重らせんの局所的な開裂は負の超らせんのねじれによる歪みが溜まることによって生じる。この開裂構造は塩基対間の水素結合が 2 つの A と T が連なる領域である A + T-rich 領域に生じることが実験的に示されている。A + T-rich 領域は大

腸菌ゲノム DNA、バクテリオファージ λ 、Simiam Virus 40 などの DNA 複製反応の開始となる複製起点領域に存在するために、負の超らせんによる A + T-rich 領域の局所的な開裂が DNA 複製反応の開始に影響を与えることが示唆されている [1]、[10]。

6.1.4 十字構造

十字構造は DNA 二重らせんの鋳型鎖の配列と相補鎖の配列の塩基配列が全く同じモチーフを示す自己相補的配列の回文配列から生じる。回文配列を含む十字構造は局所的に対称な 2 つ折りのヘアピン構造を形成する。また、十字構造は不對ループを形成するループ構造と DNA 四重鎖を形成するホリデイ構造などの特徴的な構造を形成することが知られている。また、十字構造は負の超らせんによって誘導されることが実験的に示されている [1]、[10]。

6.1.5 Z 型構造

Z 型構造は poly (dG-dC) 配列の交互配列の単結晶 X 線回析によってはじめて発見された。右巻き二重らせん構造である B 型構造は Watson-Crick 型塩基対を形成する 1 本のヌクレオチド鎖に対して逆平行に関係付けている。一方、Z 型構造は Watson-Crick 型塩基対を形成する 2 本のヌクレオチド鎖に対して逆平行の糖-リン酸鎖である左巻き二重らせん構造であることが定義されている。Z 型構造は 1 回転あたり 12 個の G-C 塩基対からなり、副溝は深く、主溝は外側に突出している。Z 型構造は糖・リン酸骨格のジグザグ (zig-zag) 構造であることから、Z 型構造と呼ばれている。糖・リン酸骨格と糖・塩基連結部位のグリコシド結合とのジグザグな構造変化は塩基対間スタッキング相互作用の連続的な変化に応じて生じている [16]。Z 型構造は負の超らせんによって誘導される。SV40 DNA の複製起点に含まれる 72 塩基対のタンデム反復配列の領域では、 -0.056 の負の超らせん密度によって Z 型構造が誘導されることが実験的に示されている [10]、[11]、[12]。

6.1.6 三重らせん構造

三重らせん構造はホモプリン-ホモピリミジン二重らせんと同様なホモピリミジン鎖との間で弱い酸性条件にて形成されることが知られており、2 つの塩基対間の水素結合によって形成される。そのひとつは Watson-Crick 型塩基対による水素

結合であり、もうひとつは Hoogsteen 型塩基対による水素結合である。3つ目の鎖であるホモピリミジン鎖は、Watson-Crick 型塩基対のホモプリン鎖に対して平行な配向性となり、Watson-Crick 型塩基対の二重らせんの主溝に潜り込むことにより Hoogsteen 塩基対としてホモプリン鎖と水素結合する。また、グアニン (G)-rich なテロメア配列 (5'-TTAGGG-3') では、Hoogsteen 塩基対によって4つのグアニンが G-quartet 構造を形成し、それらが塩基対間スタッキング相互作用することによりグアニン四重鎖構造 (G-quadruplex) が形成されることが知られている。また、三重らせん構造は負の超らせんによって導入されることが実験的に示されている [1]。

水溶液内のDNAはB型DNA構造

超らせんはDNA二次構造を誘導する。

→ 超らせんによって生じたDNAの歪みを補償した結果
負の超らせんの歪みは多くの非B型構造を誘導する。

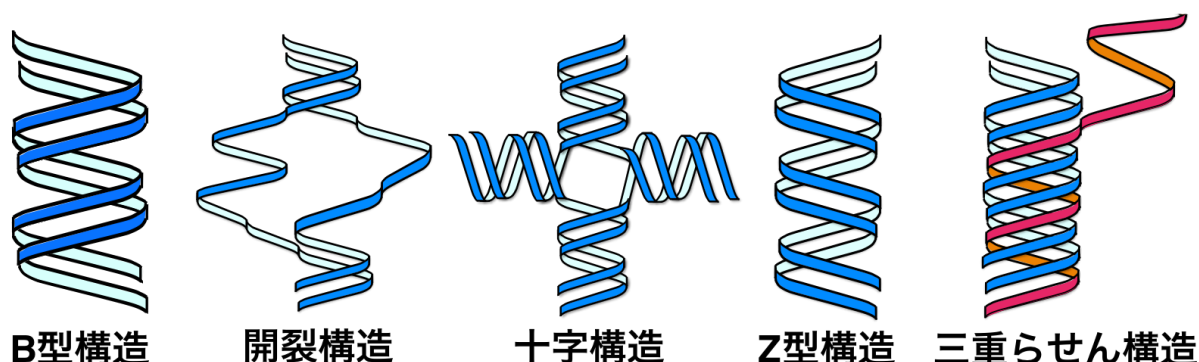


図 6-2. DNA 二重らせんの B 型構造と非 B 型構造 右図から B 型構造、開裂構造、十字構造、Z 型構造、三重らせん構造である。負の超らせんは非 B 型構造を誘導する。

§6.2 実験手順及び操作

6.2.1 実験試薬と装置

RPA-YFP の調製、微細流路装置の作製は本博士論文第 3 章の研究に記載した「3.2.2 RPA-YFP の培養、発現、精製、ssDNA 結合活性の測定」「3.2.5 微細流路装置の作成」の実験操作と同様な実験操作で実行した。また、改質ガラス基板の作製、脂質二重層の作製は本博士論文第 5 章の研究に記載した「5.2.3 微細流路内でのガラス基板修飾法」の実験操作と同様な実験操作で実行した。本研究で用いたマイクロシ

リンジポンプは KD Scientific 社製 KDS-100 (Holliston, MA, USA) を用いた。マイクロシリンジはハミルトン社製 250 μL のマイクロシリンジ及び 100 μL のマイクロシリンジ (Reno, NV, USA) を用いた。

6.2.2 SV40 DNA 複製起点を含む λ DNA の構成

SV40 複製起点を含む λ DNA である SV40ori- λ DNA は国立研究開発法人産業技術総合研究所 材料・化学領域化学プロセス研究部門 主任研究員 松浦俊一 博士のご厚意により提供していただいた。以下、SV40ori- λ DNA の作製の手順は要約して説明する。

SV40 の DNA 複製起点は制限酵素 *Dra* I、*Hinc* II により切断後、pUC19 にクローニングした (pSV40-origin)。余分な DNA 部位を取り除くために、pSV40-origin は制限酵素 *Kpn* I によって切断し、セルフアニーリング後、大腸菌へと形質転換した [13]。また、制限酵素 *EcoR* I によって切断した pSV40-origin と *EcoR* I によって切断したベクターDNA である λ gt10 (Stratagene, La Jolla, Ca, USA) とをライゲーション (SV40ori- λ DNA) 後、*in vitro* パッケージング (Gigapack Gold Packaging Extract, Stratagene, La Jolla, Ca, USA) した。パッケージング後、SV40ori- λ DNA はプレートライセート法によって培養し、塩化セシウム密度勾配遠心法によって SV40ori- λ DNA を抽出・精製することにより回収した。SV40ori- λ DNA の精製後、SV40ori- λ DNA の純度と濃度は紫外分光光度計 (DU-640, Beckman, Fullerton, CA, USA) によって決定した。SV40ori- λ DNA は使用するまで -20°C で保存した。図 6-3 は制限酵素 *Hind* III によって切断した SV40ori- λ DNA の DNA マップを示す。

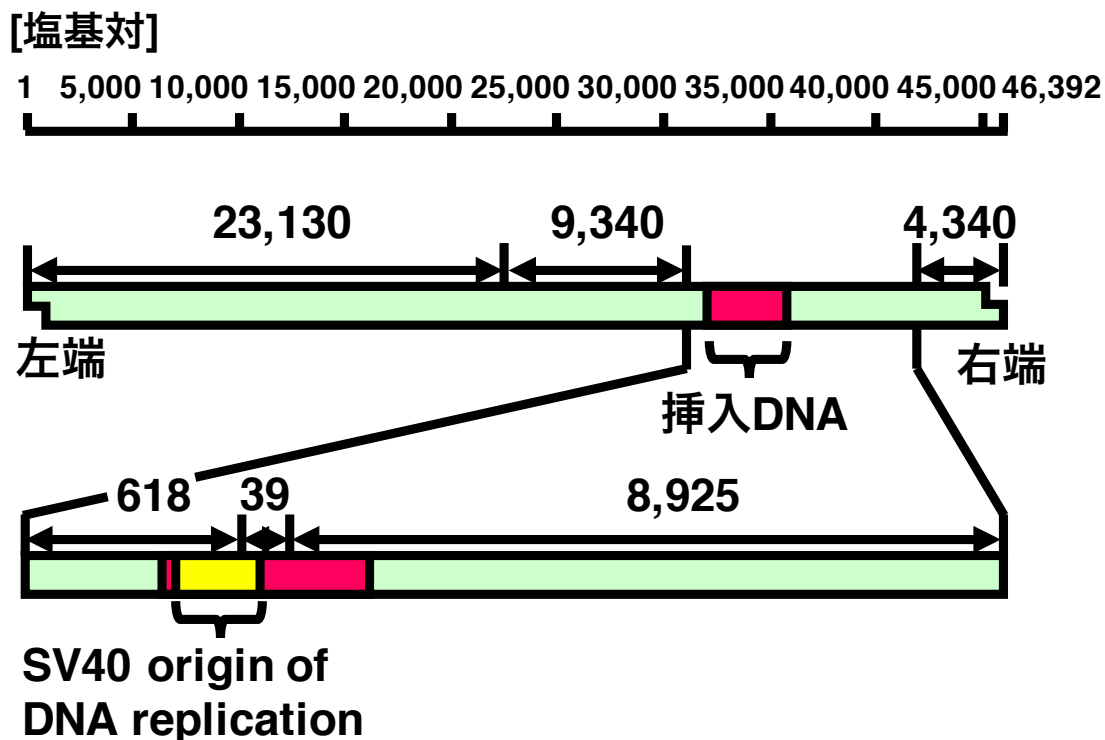


図 6-3. 制限酵素 *Hind* III により切断した SV40ori-λDNA の DNA マップ

6.2.3 片端ビオチン化・他片端ジゴキシゲニン化 λDNA 及び SV40ori-λDNA の

作製

本研究では微細流路装置の流路内のガラス基板表面に直鎖状 DNA の右端と左端を各々固定したときの局所的な開裂の位置を評価するために、λDNA から左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 λDNA である Forward λDNA (F-λDNA) と右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 λDNA である Reverse λDNA (R-λDNA) を調製した。同様に SV40ori-λDNA から左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 SV40ori-λDNA である Forward SV40ori-λDNA (F-SV40ori-λDNA) と右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 SV40ori-λDNA である Reverse SV40ori-λDNA (R-SV40ori-λDNA) を調製した。本研究では、λDNA の塩基配列データベース (NCBI Reference Sequence、NC001416.1、全長 48,502 塩基対) の左端の 12 塩基の突出末端である cos site の末端を 1 番目の塩基として定義した。図 6-4 には F-λDNA、F-SV40ori-λDNA、R-λDNA 及び R-SV40ori-λDNA の位置関係を示す。

左端ビオチン化 λDNA 及び SV40ori-λDNA の調製には、λDNA 及び SV40ori-

λDNA の左端にビオチン化合物オリゴヌクレオチドである Forward 1 と Forward 2 (表 6-1) を結合させた。その後、左端ビオチン化 λDNA 及び SV40ori-λDNA の右端にジゴキシゲニン (Digoxigenin) 標識 dUTP を修飾することにより左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 λDNA 及び SV40ori-λDNA を作製した。作製した左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 λDNA 及び SV40ori-λDNA は特に指定しない限り F-λDNA、F-SV40ori-λDNA と記載した。F-λDNA、F-SV40ori-λDNA の左端ビオチン化部位はガラス基板表面に固定し、右端ジゴキシゲニン化部位には磁気ビーズを結合させた。

逆末端方向への DNA 修飾として、右端ビオチン化 λDNA 及び SV40ori-λDNA の調製には、λDNA 及び SV40ori-λDNA の右端にビオチン化合物オリゴヌクレオチドである Reverse 1 と Reverse 2 (表 6-1) を結合させた。その後、右端ビオチン化 λDNA 及び SV40ori-λDNA の左端にジゴキシゲニン標識 dUTP を修飾することにより右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 λDNA 及び SV40ori-λDNA を作製した。なお、作製した右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 λDNA 及び SV40ori-λDNA は特に指定しない限り R-λDNA 及び R-SV40ori-λDNA と記載した。また、R-λDNA、R-SV40ori-λDNA の右端ビオチン化部位はガラス基板表面に固定し、左端ジゴキシゲニン化には磁気ビーズを結合させた。

表 6-1 には設計したビオチン化合物オリゴヌクレオチドである Forward 1 及び Forward 2 と Reverse 1 及び Reverse 2 の配列を記載した。下記にその具体的な調製方法を述べる。

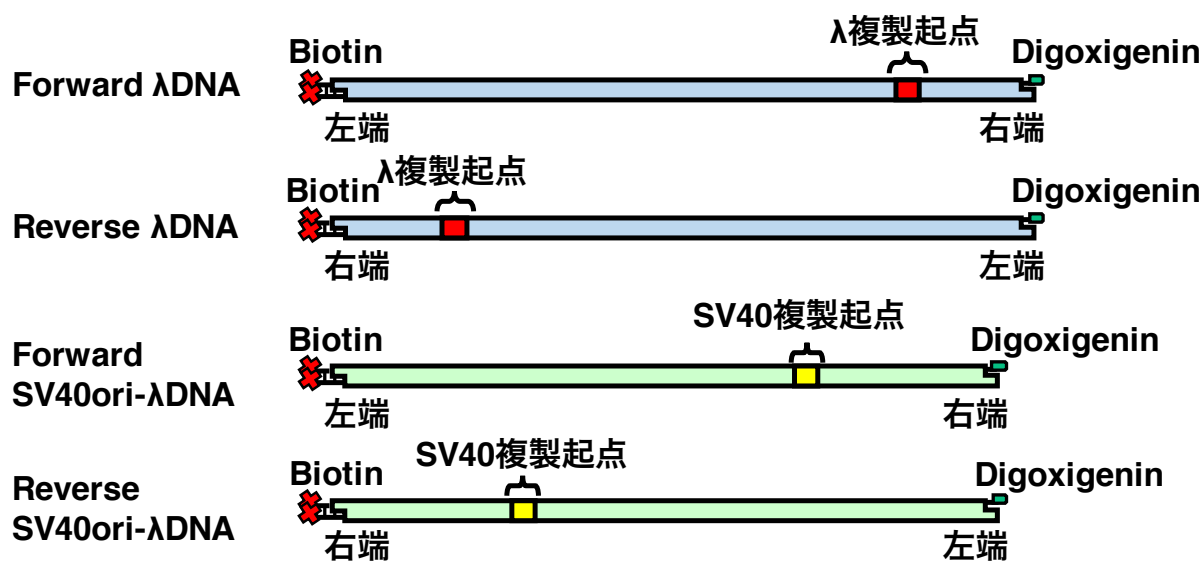


図 6-4. F-λDNA、R-λDNA、F-SV40ori-λDNA 及び R-SV40ori-λDNA の概要

F-λDNA : 左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 λDNA

R-λDNA : 右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 λDNA

F-SV40ori-λDNA : 左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 SV40ori-λDNA

R-SV40ori-λDNA : 右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 SV40ori-λDNA

表 6-1. 設計したビオチン化オリゴヌクレオチド Forward 1 及び Forward 2 と Reverse 1 及び Reverse 2 の配列

Oligonucleotides	Sequences of oligonucleotides
Forward 1	5'-Biotin-GTACTCCAGACTTAGAAGATGAT-3'
Forward 2	5'-P-AGGTCGCCGCCATCTTCTAAGTCTGGAGTAC-TEG-Biotin-3'
Reverse 1	5'-Biotin-CGTAGTGTCTATCT-3'
Reverse 2	5'-P-GGGCGGCGACCTAGATAGGACACTACG-TEG-Biotin-3'

6.2.3.1 左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 λDNA 及び SV40ori-λDNA の

作製

ここでは、左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 λDNA (F-λDNA) の作製の手順を述べる。なお、試薬調製表 6-1、6-2 には、左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 SV40ori-λDNA (F-SV40ori-λDNA) の試薬の調製手順を記載した。

1. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、40 μg の λDNA (15 μg の SV40ori-λDNA)、400 pmol のビオチン化合成オリゴヌクレオチド Forward 1、400 pmol のビオチン化合成オリゴヌクレオチド Forward 2 を加えて調製した (全量 155 μL)。

[試薬調製表 6-1]

Sample	Vol. (μL)		投入量
440 ng/μL λDNA	90	-	40 μg
50 ng/μL SV40ori-λDNA	-	151	15 μg
200 pmol/μL Forward 1	2	2	400 pmol

200 pmol/ μ L Forward 2	2	2	400 pmol
滅菌水	Up to 155 μ L		

2. λ DNA (SV40ori- λ DNA) のコンカテマー形成を防ぐために、実験操作 1 の調製溶液を含む 0.6 mL のマイクロチューブを恒温槽 (HB-100、TAITEC) 上で 65°C、5 分間加熱処理し、その後、氷上で急冷した。
3. 実験操作 2 の 0.6 mL のマイクロチューブに T4 DNA リガーゼ (TaKaRa) 付属の 10 x Ligation buffer (TaKaRa) を 1 x Ligation buffer となるよう加えた後、さらに 2,450 U の T4 DNA リガーゼ (350 U/ μ L、TaKaRa) を加え、恒温槽上で 16°C、5 時間、インキュベートした (全量 180 μ L)。
4. T4 DNA リガーゼを失活させるために、実験操作 3 の調製溶液を含む 0.6 mL のマイクロチューブを恒温槽上で 65°C、5 分間インキュベートした後、室温にて自然冷却した。
5. 4 本のマイクロスピncラム S-400 (GE Healthcare) を準備した。3,000 r.p.m.、1 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによってマイクロスピncラム S-400 内の内容液を除去した。
6. 2 本のマイクロスピncラム S-400 に実験操作 4 の DNA 溶液を半量ずつ (90 μ L) 加え、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによって調製 DNA を精製した。その後、精製 DNA 溶液を残りの 2 本のマイクロスピncラム S-400 に移し、再度 3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定した後、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによって DNA を再度精製した。
7. 新たな 1.5 mL のマイクロチューブに精製した左端ビオチン化 λ DNA (左端ビオチン化 SV40ori- λ DNA) を含む溶液をまとめた。
8. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、左端ビオチン化 λ DNA (左端ビオチン化 SV40ori- λ DNA)、5 U の Klenow Fragments (3'-5' Exo-), 100 pmol の dATP、dGTP、dCTP、ジゴキシゲニン-11-dUTP (Roche Diagnostics、Indianapolis、IN、USA) を含む緩衝液 (1 x 2 NEBuffer [50 mM NaCl、10 mM Tris-HCl pH 7.9、10 mM MgCl₂、1 mM DDT]) を調製し、恒温槽上で 37°C、12 時間、インキュベートした (全量 180 μ L)。

[試薬調製表 6-2]

Sample	Vol. (μL)		投入量
10 x 2 NEBuffer	18	18	1 x 2 NEBuffer
100 pmol/ μL dATP	1	1	100 pmol
100 pmol/ μL dGTP	1	1	100 pmol
100 pmol/ μL dCTP	1	1	100 pmol
100 pmol/ μL ジゴキシゲニン-11-dUTP	1	1	100 pmol
2.5 U/ μL Klenow fragment (3'-5'Exo-)	2	2	5 U
左端ビオチン化 λDNA	156	-	40 μg
左端ビオチン化 SV40ori- λDNA	-	156	15 μg
全量	180	180	-

9. Klenow Fragments (3'-5' Exo-) を失活させるために、実験操作 8 の調製溶液を含む 0.6 mL のマイクロチューブを恒温槽上で 70°C、10 分間インキュベートした後、室温まで自然冷却した。
10. 4 本のマイクロスピncラム S-400 を準備した。3,000 r.p.m.、1 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによってマイクロスピncラム S-400 内の内容液を除去した。
11. 2 本のマイクロスピncラム S-400 に実験操作 9 の DNA 溶液を半量ずつ (90 μL) 加えて、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによって調製 DNA を精製した。その後、精製 DNA 溶液を残りの 2 本のマイクロスピncラム S-400 に移し、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定した後、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによって DNA を再度精製した。
12. 左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 λDNA (F- λDNA) 溶液の濃度は分光光度計 (UVmini-1240、Shimadzu) を用いることによって吸光度を計測した後、新たな 0.6 mL のマイクロチューブ内に 20 μL ごとに分注した。
13. 左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 SV40ori- λDNA (F-SV40ori- λDNA) の作製も同様な手順で調製した。

6.2.3.2 右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の

作製

ここでは右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 λ DNA (R- λ DNA) の作製の手順を述べる。なお、試薬調製表 6-3、6-4 には右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 SV40ori- λ DNA (R-SV40ori- λ DNA) の試薬の調製手順を記載した。

1. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、40 μ g の λ DNA (15 μ g の SV40ori- λ DNA)、400 pmol のビオチン化オリゴヌクレオチド Reverse 1、400 pmol のビオチン化オリゴヌクレオチド Reverse 2 を加えて調製した (全量 155 μ L)。

[試薬調製表 6-3]

Sample	Vol. (μ L)		投入量
440 ng/ μ L λ DNA	90	-	40 μ g
50 ng/ μ L SV40ori- λ DNA	-	151	15 μ g
200 pmol/ μ L Reverse 1	2	2	400 pmol
200 pmol/ μ L Reverse 2	2	2	400 pmol
滅菌水	Up to 155 μ L		

2. λ DNA (SV40ori- λ DNA) のコンカテマー形成を防ぐために、実験操作 1 の調製溶液を含む 0.6 mL のマイクロチューブを恒温槽上で 65°C、5 分間加熱処理し、その後、氷上で急冷した。
3. 実験操作 2 の 0.6 mL のマイクロチューブに T4 DNA リガーゼ付属の 10 x Ligation buffer を 1 x Ligation buffer となるよう加えた後、さらに 2,450 U の T4 DNA リガーゼ (350 U/ μ L) を加え、恒温槽上で 16°C、5 時間、インキュベートした (全量 180 μ L)。
4. T4 DNA リガーゼを失活させるために、実験操作 3 の調製溶液を含む 0.6 mL のマイクロチューブを恒温槽上で 65°C、5 分間インキュベートした後、室温にて自然冷却した。
5. 4 本のマイクロスピncラム S-400 を準備した。3,000 r.p.m.、1 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによってマイクロスピncラム S-400 内の内容液を除去した。

6. 2本のマイクロスピncラム S-400 に実験操作 4 の DNA 溶液を半量ずつ (90 μ L) 加えて、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによって調製 DNA を精製した。その後、精製 DNA 溶液を残りの2本のマイクロスピncラム S-400 に移し、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定した後、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによって DNA を再度精製した。
7. 新たな 1.5 mL のマイクロチューブに精製した右端ビオチン化 λ DNA (右端ビオチン化 SV40ori- λ DNA) を含む溶液をまとめた。
8. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、右端ビオチン化 λ DNA (右端ビオチン化 SV40ori- λ DNA)、5 U の Klenow Fragments (3'-5' Exo-), 100 pmol の dATP、dGTP、dCTP、ジゴキシゲニン-11-dUTP を含む緩衝液 (1 x 2 NEBuffer [50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 1 mM DDT]) を調製し、恒温槽上で 37°C、12 時間、インキュベートした (全量 180 μ L)。

[試薬調製表 6-4]

Sample	Vol. (μ L)		投入量
10 x 2 NEBuffer	18	18	1 x 2 NEBuffer
100 pmol/ μ L dATP	1	1	100 pmol
100 pmol/ μ L dGTP	1	1	100 pmol
100 pmol/ μ L dCTP	1	1	100 pmol
100 pmol/ μ L ジゴキシゲニン-11-dUTP	1	1	100 pmol
2.5 U/ μ L Klenow Fragment (3'-5'Exo-)	2	2	5 U
右端ビオチン化 λ DNA	156	-	40 μ g
右端ビオチン化 SV40ori- λ DNA	-	156	15 μ g
全量	180	180	-

9. Klenow Fragments (3'-5' Exo-)を失活させるために、実験操作 8 の調製溶液を含む 0.6 mL のマイクロチューブを恒温槽上で 70°C、10 分間インキュベートした後、室温まで自然冷却した。
10. 4本のマイクロスピncラム S-400 を準備した。3,000 r.p.m.、1 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピncラム S-400 を遠心することによってマイクロスピncラム S-400 内の内容液を除去した。
11. 2本のマイクロスピncラム S-400 に実験操作 9 の DNA 溶液を半量ずつ (90

μL) 加えて、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定し、マイクロスピнкаラム S-400 を遠心することによって調製 DNA を精製した。その後、精製 DNA 溶液を残りの 2 本のマイクロスピнкаラム S-400 に移し、3,000 r.p.m.、2 分間に卓上遠心機を設定した後、マイクロスピнкаラム S-400 を遠心することによって DNA を再度精製した。

12. 右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 λDNA (R-λDNA) 溶液の濃度は分光光度計を用いることによって吸光度を計測した後、新たな 0.6 mL のマイクロチューブ内に 20 μL ごとに分注した。
13. 右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 SV40ori-λDNA (R-SV40ori-λDNA) の作製も同様な手順で調製した。

6.2.4 磁気ピンセット装置の開発

本研究では直鎖状 DNA に超らせんを導入するため、磁気ピンセット装置を開発した。磁気ピンセット装置の詳細な情報は本博士論文第 2 章の「2.6 磁気ピンセット装置の開発」に述べた。ここでは、磁気ピンセット装置の説明を要約して述べる。磁気ピンセット装置はマイクロコンピュータである Arduino-Uno board とステッピングモータードライバーに伴うステッピングモーターとの組合せることにより開発した。ステッピングモーターには滑車 (直径 20 mm x 高さ 12 mm) を通して一対のネオジウム磁石 (厚さ 4 mm x 幅 4 mm x 長さ 8 mm) を回転させることができる。ステッピングモーターの回転数と回転速度は Arduino-Uno board に接続した液晶ディスプレイ上に表示させた。図 6-5 は磁気ピンセット装置の概要図を示す。

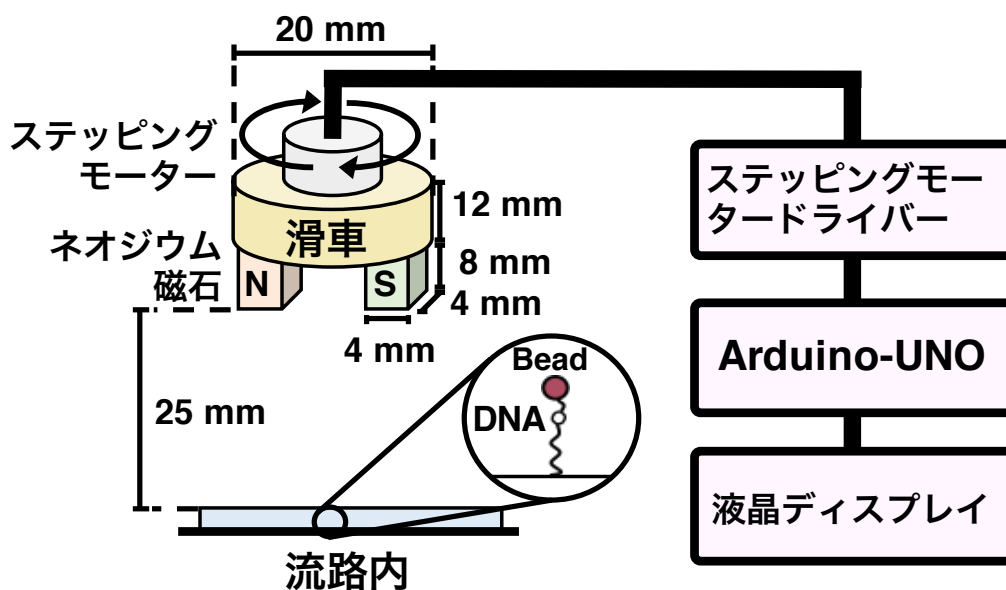


図 6-5. 本研究にて開発した磁気ピンセット装置

6.2.5 微細流路内でのガラス基板修飾

微細流路内でのニュートラアビジンと脂質二重層によるガラス基板修飾は本博士論文第5章の研究に記載した「5.2.3 微細流路内でのガラス基板修飾法」の実験操作と同様な実験操作で実行した。下記にその手順を述べる [14]。

1. 改質したガラス基板へ微細流路装置を貼り付け、微細流路装置を組み立てた。
2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、330 nM ニュートラアビジン (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) を含む 1 x Avidin Lipid Bilayer (ALB) Buffer B (40 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM DTT, 1 mM MgCl₂, 0.2 mg/mL BSA) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、50 μ L/h、20 分間流路内に注入することによってガラス基板表面にニュートラアビジンを吸着させた。

[試薬調製表 6-5]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
33 μ M Neutravidin	20	330 nM
10 x ALB Buffer B	20	1 x ALB Buffer B
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

1. 200 μ L の 1 x ALB Buffer A (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM NaCl) をシリンジに充填し、50 μ L/h、20 分間流路内に注入することによって流路内のフリーなニュートラアビジンを洗い流し、余剰なニュートラアビジンを取り除いた。
2. 100 μ L の調製 DOPC リポソーム溶液をシリンジに充填し、50 μ L/h、80 ~ 90 分間流路内に注入することによって基板表面に脂質二重層を形成した。これにより、ガラス基板表面の pH の変動を抑え、DNA やタンパク質の非特異的吸着を防いだ [14]。
3. 200 μ L の 1 x ALB Buffer A をシリンジに充填し、50 μ L/h、20 分間流路内に注入することによって流路内のフリーな DOPC リポソーム溶液を洗い流し、余剰な DOPC リポソーム溶液を取り除いた。

6.2.6 抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズの調製

本研究では抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを用いることにより片端ビオチン化・他片端ジゴキシゲニン化 λ DNA 及び SV40ori- λ DNA に抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを結合させた。Dynabeads Protein G は粒径 2.8- μ m の均一な超常磁性高分子ポリマー製ビーズ表面にアルブミン結合部位を除き、免疫グロブリン (Ig) 結合部位のみ残した分子量約 45 kDa の組み換え Protein G を共有結合した磁気ビーズである。Dynabeads Protein G 磁気ビーズは Life Technologies 社から購入した (Rockville, MD, USA)。本研究では Dynabeads Protein G 磁気ビーズに抗ジゴキシゲニン抗体 (Roche Diagnostics) を結合させることによって抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを調製した。

1. マイクロチューブローテーター (MTR-103, As One) を用いることにより室温、1 分間あたり 20 回転の回転速度にて、5 分間回転させ、容器内で Dynabeads Protein G 磁気ビーズを含む溶液を懸濁した。
2. 1.5 mL マイクロチューブ内にて、1 μ L の懸濁した Dynabeads Protein G 磁気ビーズを採取した後、Dynabeads Protein G 磁気ビーズを含む 1.5 mL のマイクロチューブを磁気微粒子集積装置 (Dynabeads MPC-S, Life Technologies) に設置し、Dynabeads Protein G 磁気ビーズを集積することによって余剰な上清液を取り除いた。
3. Dynabeads Protein G 磁気ビーズに抗ジゴキシゲニン抗体 (Roche Diagnostics) を結合させるために、実験操作 2 にて集積した Dynabeads Protein G 磁気ビーズを含む 1.5 mL のマイクロチューブに 1 μ L の抗ジゴキシゲニン抗体 (0.2 μ g) を含む 1 x PBS pH 7.5 緩衝液 (全量 200 μ L) を加えた後、Dynabeads Protein G 磁気ビーズを再懸濁した。その後、マイクロチューブローテーターを用いることにより、室温、1 分間あたり 20 回転の回転速度にて、10 分間インキュベートすることによって Dynabeads Protein G 磁気ビーズに抗ジゴキシゲニン抗体を結合させた (以下、抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズと呼ぶ)。
4. 磁気微粒子集積装置に実験操作 3 の抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを含む 1.5 mL のマイクロチューブを設置することによって抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを集積後、余剰な抗ジゴキシゲニン抗体を含む緩衝液を取り除いた。
5. 実験操作 4 にて集積した 1.5 mL のマイクロチューブ内に含む抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズに 0.01% Tween 20 を含む 1 x PBS pH 7.5 の洗浄液 (全量

200 μ L) を加えた後、その 1.5 mL のマイクロチューブをタッピングすることにより優しく洗浄した。

6. 洗浄後、磁気微粒子集積装置に抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを含む 1.5 mL のマイクロチューブを設置することにより 1.5 mL のマイクロチューブ内に含む抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを集積し、洗浄液を取り除いた後、抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを含む 1.5 mL のマイクロチューブに 0.01% Tween 20 を含む 1 x PBS pH 7.5 の洗浄液 (全量 200 μ L) を再度加え、1.5 mL のマイクロチューブをタッピングすることによって優しく洗浄した。この操作を 2 回繰り返した。
7. 洗浄後、磁気微粒子集積装置に抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを含む 1.5 mL のマイクロチューブを設置することにより 1.5 mL のマイクロチューブ内に含む抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを集積することによって洗浄液を取り除いた。以降、抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズは磁気ビーズと呼ぶ。

6.2.7 微細流路内での直鎖状 DNA のガラス基板表面と磁気ビーズの固定

微細流路内にて F- λ DNA、R- λ DNA、F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA の片端ビオチン化部位は修飾ガラス基板表面に固定し、他片端ジゴキシゲニン化部位には抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを結合させた。図 6-6 はその概要図を示す。

1. 上記の「6.2.6 微細流路内でのガラス基板修飾」の実験操作と同様な実験操作にて、ガラス基板表面にニュートラアビジンを吸着後、脂質二重層を覆うことで流路内のガラス基板表面を修飾した。
2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、60 ng の F- λ DNA を含む緩衝液 (40 mM HEPES pH 8.0、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System [2.3 mg/mL of D-(+)-glucose、0.1 mg/mL glucose oxidase、18 μ g/mL catalase]) を調製 (全量 100 μ L) 後、シリンジに充填し、50 μ L/h、30 分間、流路内に注入することによってガラス基板表面に F- λ DNA、F-SV40ori- λ DNA の左端ビオチン化部位を固定した。また、R- λ DNA、R-SV40ori- λ DNA ではガラス基板表面に R- λ DNA、R-SV40ori- λ DNA の右端ビオチン化部位を固定した。

[試薬調製表 6-6]

Sample	Vol. (μ L)				Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	10	10	10	10	40 mM

10% 2-Mercaptoethanol	10	10	10	10	1%
60 ng/μL F-λDNA	1	-	-	-	0.6 ng/μL
60 ng/μL R-λDNA	-	1	-	-	0.6 ng/μL
20 ng/μL F-SV40ori-λDNA	-	-	3	-	0.6 ng/μL
20 ng/μL R-SV40ori-λDNA	-	-	-	3	0.6 ng/μL
230 mg/mL glucose	1	1	1	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	1	1	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	1	1	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μL				-

3. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、調製した抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを含む緩衝液 (40 mM HEPES pH 8.0、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 100 μL) 後、シリンジに充填し、30 μL/h、40 分間、流路内に注入することによってガラス基板表面に左端固定した F-λDNA、F-SV40ori-λDNA の右端ジゴキシゲニン化部位に抗ジゴキシゲニン磁気ビーズを結合させた。また R-λDNA、R-SV40ori-λDNA では R-λDNA、R-SV40ori-λDNA の左端ジゴキシゲニン化部位に抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを結合させた。

[試薬調製表 6-7]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	10	40 mM
10% 2-Mercaptoethanol	10	1%
抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズ	3 μg	-
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μL	-

4. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、緩衝液 (40 mM HEPES pH 8.0、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、30 μL/h、40 分間、流路内に注入することによって流路内の余

剰な磁気ビーズを取り除いた。

[試薬調製表 6-8]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	10	40 mM
10% 2-Mercaptoethanol	10	1%
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μL	-

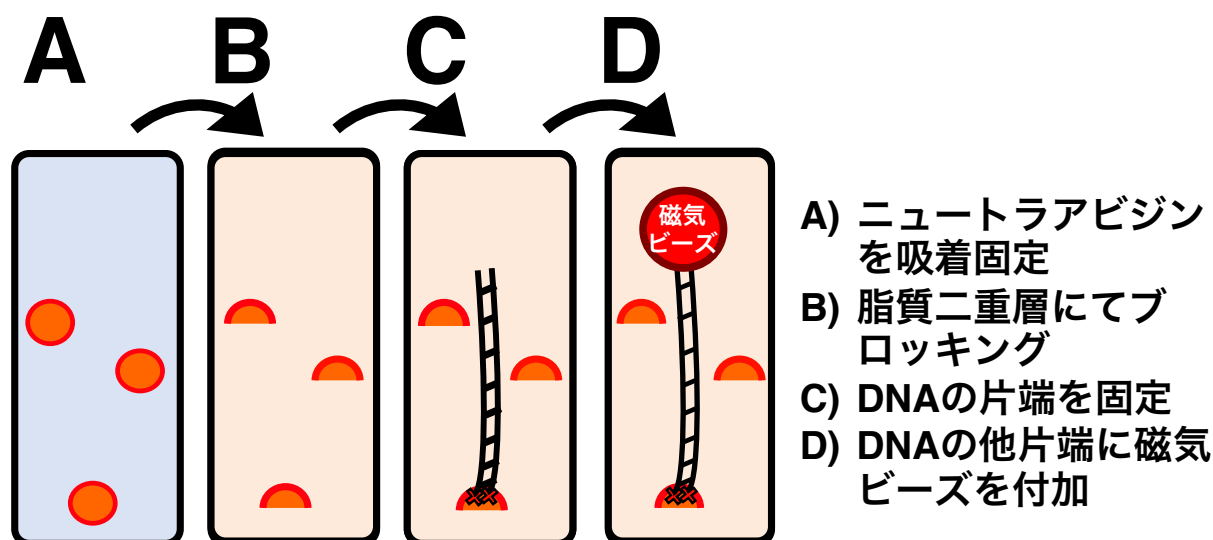


図 6-6. 微細流路内での直鎖状 DNA のガラス基板表面と磁気ビーズの固定化 流路内のガラス基板表面にニュートラアビジンを吸着させた後、脂質二重層を覆うことで流路内のガラス基板表面を修飾した。その後、DNA の片端ビオチン化部位をガラス基板表面に固定後、他片端ジゴキシゲニン化部位に抗ジゴキシゲニン磁気ビーズを結合させた。

6.2.8 DNA の超らせんにより生じた二次構造の直接観察

本実験では磁気ピンセット装置を用いることにより F-DNA に超らせんを導入することによって超らせんにより生じた DNA 二次構造である plectonemes 構造を直接観察した。Dekker らのグループ (Netherland) により、超らせん状態の DNA

は DNA 上に沿って plectonemes 構造が出現、消光、移動することが実験的に示されている [15]。以下に、実験操作を述べる。

1. 上記の「6.2.8 微細流路内での直鎖状 DNA のガラス基板表面と磁気ビーズの固定」の実験操作と同様な実験操作にて、F- λ DNA の左端をガラス基板表面に固定した後、右端に磁気ビーズを結合させた。
2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、0.1 μ M YOYO-1 を含む緩衝液 (40 mM HEPES pH 8.0、10% glycerol、0.1% Tween 20、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、25 μ L/h、40 分間、流路内に注入することによって F- λ DNA を染色した。

[試薬調製表 6-9]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	10	40 mM
10% 2-Mercaptoethanol	10	1%
10 μ M YOYO-1	1	0.1 μ M
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μ L	-

3. 微細流路内の緩衝液の流れを停止した後、磁気ピンセット装置を用いることによって 200 回転 (1 秒あたり 1 回転する回転速度) 磁石を回転させた後、磁石の回転を停止した。その後、もう一つの磁石を微細流路装置の側面から慎重に設置することによって超らせん状態の F- λ DNA を伸長させた後、観察した。
4. 実験操作 4 と同様な実験操作により弛緩状態の F- λ DNA の伸張させることによって観察した。
5. 同一の顕微鏡視野内にて、超らせんの状態と弛緩状態の F- λ DNA はビデオレート (30 frames/sec) で撮影した後、画像化した。
6. ImageJ により画像化した超らせんの状態と弛緩状態の F- λ DNA の長さを計測した。

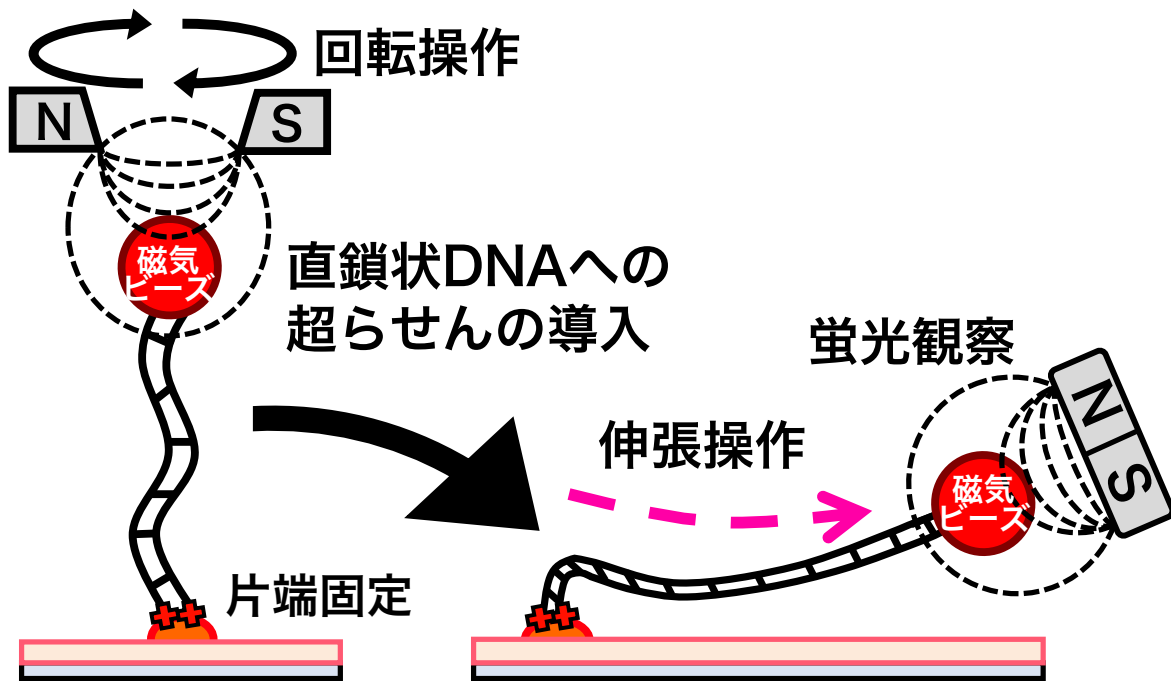


図 6-7. 直鎖状 DNA への超らせんの導入と伸張操作 磁気ピンセット装置を用いることによって直鎖状 DNA に超らせんを導入した。その後、DNA の超らせんによって生じた DNA 二次構造である plectonemes 構造を観察した。

6.2.9 負の超らせん歪みによる DNA 二重らせんの局所的な開裂の直接観察

本実験では負の超らせん歪みによって生じた λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の局所的な開裂を直接観察した。 λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の局所的な開裂は、RPA-YFP により標識した ssDNA 領域を観察後、YOYO-1 により染色した dsDNA 領域を観察された。ここでは、F- λ DNA の局所的な開裂の直接観察の実験操作を述べる。その他 R- λ DNA、F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂を直接観察は、下記と同様な実験操作にて実験を行った。

1. 上記の「6.2.8 微細流路内での直鎖状 DNA のガラス基板表面と磁気ビーズの固定」の実験操作と同様な実験操作にて、F- λ DNA の左端をガラス基板表面に固定した後、右端に磁気ビーズを結合させた。
2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、10 μ g の RPA-YFP を含む緩衝液 (40 mM HEPES pH 8.0、10% glycerol、0.1% Tween 20、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 100 μ L) 後、シリンジに充填し、25 μ L/h、40 分間流路内に注入した。

[試薬調製表 6-10]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	10	40 mM
10% 2-Mercaptoethanol	10	1%
50 % glycerol	20	10%
1 % Tween20	10	0.1%
1 mg/mL RPA-YFP	10	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μL	-

3. 磁気ピンセット装置を用いることにより直鎖状 DNA へ負の超らせんを導入した。磁石を微細流路の真上に設置することによって磁気ビーズを結合した直鎖状 DNA を引きつけた後、負の方向へ 400 回転（1 秒あたり 1 回転する回転速度）磁石を回転させた後、磁石の回転を停止した。
4. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、緩衝液（40 mM HEPES pH 8.0、10% glycerol、0.1% Tween 20、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System）を調製（全量 200 μL ）後、シリンジに充填し、25 $\mu\text{L}/\text{h}$ 、40 分間、流路内に注入することによって流路内のフリーな RPA-YFP の余剰な蛍光を取り除いた。

[試薬調製表 6-11]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	20	40 mM
10% 2-Mercaptoethanol	20	1%
50 % glycerol	40	10%
1 % Tween20	20	0.1%
230 mg/mL glucose	2	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	2	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	2	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 200 μL	-

5. もう一つの磁石を微細流路装置の側面へ慎重に設置することによって F-λDNA を伸張させた。その直後、真上に設置した磁石を取り除いた。その後、負の超らせん歪みによって生じた DNA の局所的な開裂 (ssDNA 領域) を観察した。
6. 観察後、0.6 mL のマイクロチューブ内にて、0.1 μM YOYO-1 を含む緩衝液 (40 mM HEPES pH 8.0、10% glycerol、0.1% Tween 20、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、25 μL/h、40 分間、流路内に注入することによって DNA の dsDNA 領域を染色し、その後、実験操作 5 と同様な伸張操作により伸張させた F-λDNA を観察した。

[試薬調製表 6-12]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	20	40 mM
10% 2-Mercaptoethanol	20	1%
50 % glycerol	40	10%
1 % Tween20	20	0.1%
10 μM YOYO-1	2	0.1 μM
230 mg/mL glucose	2	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	2	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	2	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 200 μL	-

7. R-λDNA、F-SV40ori-λDNA 及び R-SV40ori-λDNA の局所的な開裂の直接観察の実験操作は F-λDNA の実験操作と同様な実験操作を実行した。
8. F-λDNA、R-λDNA、F-SV40ori-λDNA 及び R-SV40ori-λDNA の局所的な開裂は同一の顕微鏡視野内にてビデオレートでの撮影後、画像化した。ImageJ を用いることにより DNA の dsDNA 領域の蛍光領域をもとに F-λDNA、R-λDNA、F-SV40ori-λDNA 及び R-SV40ori-λDNA の長さを決定した。
9. ImageJ を用いることにより F-λDNA、R-λDNA、F-SV40ori-λDNA 及び R-SV40ori-λDNA の局所的な開裂の位置を光学マッピングした。

負の超らせんを直鎖状DNAに導入

→ 負の超らせん歪みによって生じる局所的な開裂を観察

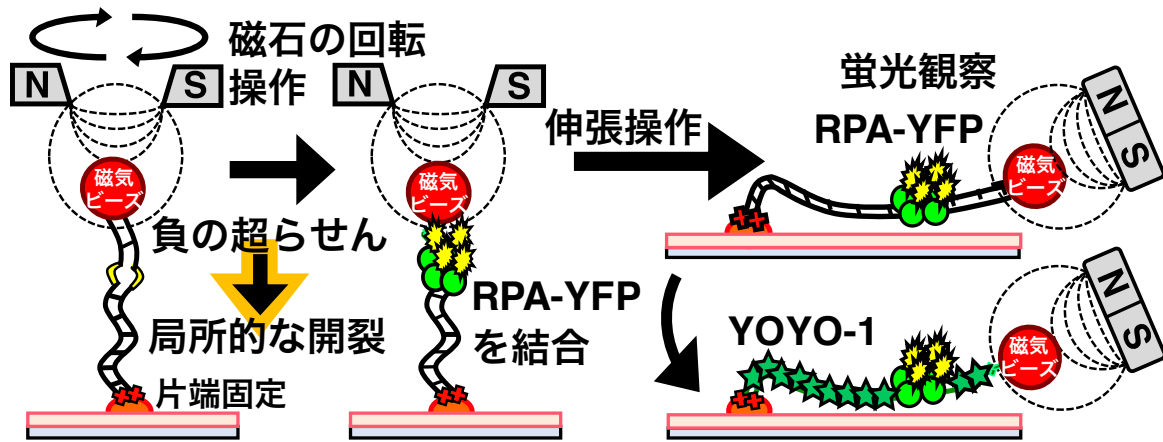


図 6-8. 負の超らせん歪みによって生じた DNA の局所的な開裂の観察の実験概要

6.2.10 負の超らせん密度を増加したときの DNA の局所的な開裂の直接観察

本実験では負の超らせん密度を増加したときの F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂を直接観察した。F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂は、RPA-YFP により標識した ssDNA 領域を観察後、YOYO-1 により染色した dsDNA 領域を観察された。

- 上記の「6.2.8 微細流路内での直鎖状 DNA のガラス基板表面と磁気ビーズの固定」の実験操作と同様な実験操作にて、F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA の左端をガラス基板表面に固定した後、右端に磁気ビーズを結合させた。
- 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、10 μ g の RPA-YFP を含む緩衝液 (40 mM HEPES pH 8.0、10% glycerol、0.1% Tween 20、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 100 μ L) 後、シリンジに充填し、25 μ L/h、40 分間流路内に注入した。

[試薬調製表 6-13]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	10	40 mM
10% 2-Mercaptoethanol	10	1%

50 % glycerol	20	10%
1 % Tween 20	10	0.1%
1 mg/mL RPA-YFP	10	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μL	-

3. 磁気ピンセット装置を用いることによって指定した超らせん密度の負の超らせんを F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA に導入した。0、-0.045、-0.095 の超らせん密度の負の超らせんを F- λ DNA に導入し、0、-0.047、-0.1 の超らせん密度の負の超らせんを F-SV40ori- λ DNA に導入した。これらの超らせん密度の負の超らせんを段階的に導入した (表 6-2)。

表 6-2. 回転数と超らせん密度との関係

時計回りへの回転数	λ DNA	SV40ori- λ DNA
0	0	0
100	-0.022	-0.023
200	-0.045	-0.047
300	-0.069	-0.073
400	-0.095	-0.1

4. 磁石を微細流路の真上に設置することによって磁気ビーズを結合した直鎖状 DNA を引きつけた後、負の方向に指定した回転数 (1 秒あたり 1 回転する回転速度) 磁石を回転させた後、磁石の回転を停止した。
5. F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA に指定した超らせん密度の負の超らせんを導入するとき、流路内に実験操作 2 の調製溶液を再度注入した。その後、負の超らせん歪みによって生じた DNA の局所的な開裂 (ssDNA 領域) を可視化するために、0.6 mL のマイクロチューブ内にて、緩衝液 (40 mM HEPES pH 8.0、10% glycerol、0.1% Tween 20、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、25 $\mu\text{L}/\text{h}$ 、40 分間、流路内に注入することによって流路内のフリーな RPA-YFP の余剰な蛍光を取り除

いた。

[試薬調製表 6-14]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	20	40 mM
10% 2-Mercaptoethanol	20	1%
50 % glycerol	40	10%
1 % Tween 20	20	0.1%
230 mg/mL glucose	2	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	2	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	2	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

- 負の超らせん歪みによって生じた DNA の局所的な開裂 (ssDNA 領域) を可視化するために、もう一つの磁石を微細流路装置の側面から慎重に設置することにより F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA を伸張させた。その直後、真上に設置した磁石を取り除いた。その後、伸長させた F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA を観察した。
- 観察後、0.6 mL のマイクロチューブ内にて、0.1 μ M YOYO-1 を含む緩衝液 (40 mM HEPES pH 8.0、10% glycerol、0.1% Tween 20、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、25 μ L/h、40 分間、微細流路内に注入することによって F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA の dsDNA 領域を染色した。その後、実験操作 6 と同様な伸張操作によって伸張させた F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA を観察した。

[試薬調製表 6-15]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M HEPES pH 8.0	20	40 mM
10% 2-Mercaptoethanol	20	1%
50 % glycerol	40	10%
1 % Tween20	20	0.1%
10 μ M YOYO-1	2	0.1 μ M

230 mg/mL glucose	2	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	2	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	2	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

8. F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂は同一の顕微鏡視野内にてビデオレートでの撮影後、画像化した。ImageJ を用いることにより DNA の dsDNA 領域の蛍光領域をもとに F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA の長さを計測した。
9. ImageJ を用いることにより F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂の位置を光学マッピングした。

§6.3 結果及び考察

6.3.1 超らせんにより生じた DNA 二次構造の直接観察

本実験では磁気ピンセットを用いることで、F- λ DNA に超らせんを導入することにより超らせん状態下での F- λ DNA の動的挙動を直接観察した。図 6-9 は超らせん状態と弛緩状態下での F- λ DNA の蛍光画像を 0.4 秒おきに取り込んだ連続写真を示す。この観察の間、超らせん状態下での F- λ DNA は dsDNA 領域上に沿って輝点が出現、消光、移動した (図 6-9A)。一方、弛緩状態下での F- λ DNA では輝点が出現しなかった (図 6-9B)。これは、DNA に超らせんを導入することにより DNA の dsDNA 領域上にループ構造が生じた結果、DNA の密度が高くなることによって輝点が出現することを示している。これらの輝点の出現、消光、移動は DNA の dsDNA 領域上に生じたループ構造の動的挙動であることから、DNA 二次構造の plectonemes 構造であることが示された (図 6-9C)。本研究の観察結果は Dekker らのグループ (Netherland) の観察結果とほぼ同じ結果が得られた [15]。本研究の結果、開発した磁気ピンセット装置を用いることによって直鎖状 DNA に超らせんを導入することが可能であることが実験的に示された。

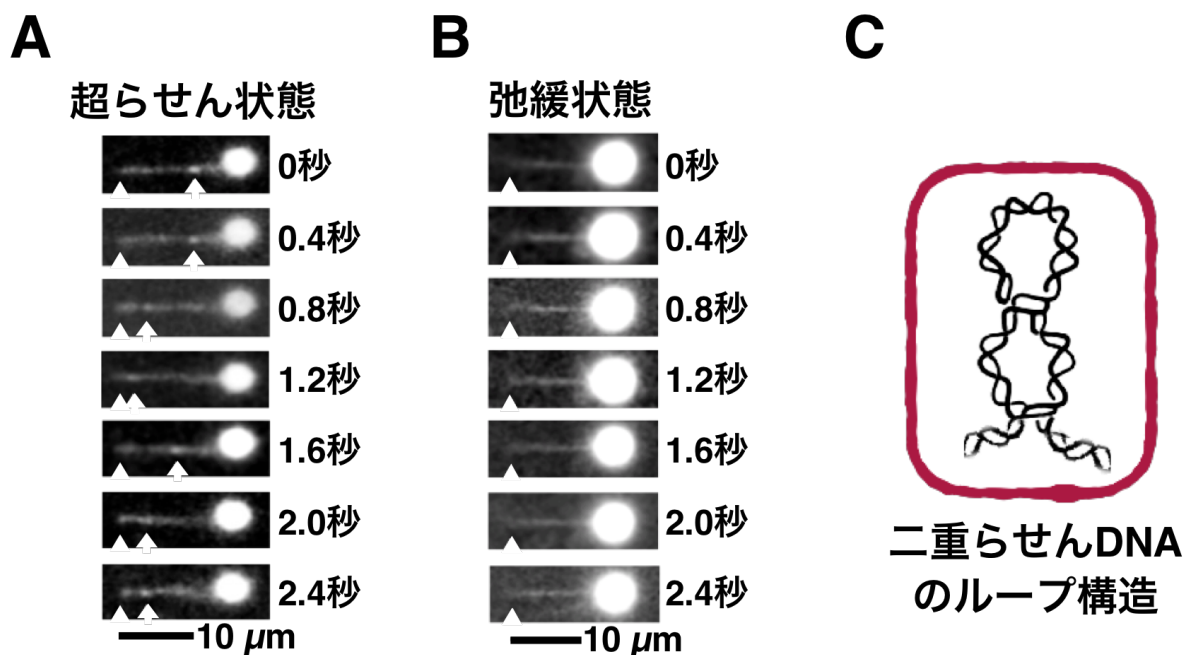


図 6-9. 超らせんによって生じた DNA 二次構造の直接観察の蛍光画像と DNA 二次構造 超らせんによって生じた DNA 二次構造は、YOYO-1 により dsDNA 領域を染色することにより直接観察された。

A 超らせん状態の F-λDNA

B 弛緩状態 (0 の超らせん密度) の F-λDNA

C 二重らせん DNA のループ構造である plectonemes 構造

白三角 : DNA の固定端

白矢印 : plectonemes 構造の領域

黒線 : 10 μm のスケールバー

6.3.2 負の超らせん歪みによる DNA 二重らせんの局所的な開裂の直接観察

本実験では F-λDNA、R-λDNA、F-SV40ori-λDNA 及び R-SV40ori-λDNA の負の超らせん歪みによる局所的な開裂を直接観察した。F-λDNA には -0.095 の超らせん密度の負の超らせんを導入し、F-SV40ori-λDNA には -0.1 の超らせん密度の負の超らせんを導入した。図 6-10A、B は指定した超らせん密度の負の超らせんを導入した F-λDNA 及び F-SV40ori-λDNA の局所的な開裂の蛍光画像を示す。観察の結果、RPA-YFP により標識した ssDNA 領域の輝点 (図 6-10A (I)、B (I)) が YOYO-1 により染色した dsDNA 領域上に現れた (図 6-10A (II)、B (II))。これらの観察結果をもとに局所的な開裂の位置を光学マッピングし、その塩基配列上の位置を推定

すると、F- λ DNA 上の輝点の位置は固定端の位置から約 39,000 塩基対部位にある λ 複製起点領域と一致した。また、F-SV40ori- λ DNA 上の輝点の位置は固定端の位置から約 33,000 塩基対部位にある SV40 複製起点領域と一致した。

さらに、本研究では右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化修飾した R- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA を用いることにより流路内のガラス基板表面に λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の右端を固定したときの局所的な開裂の位置を調査した。R- λ DNA には-0.095 の超らせん密度の負の超らせんを導入し、R-SV40ori- λ DNA には-0.1 の超らせん密度の負の超らせんを導入した。図 6-10C、D は R- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA の負の超らせん歪によって生じた局所的な開裂の蛍光画像を示す。観察の結果、RPA-YFP により標識した ssDNA 領域の輝点 (図 6-10C (I)、D (I)) が YOYO-1 により染色した dsDNA 領域上に現れた (図 6-10C (II)、D (II))。これらの観察結果をもとに局所的な開裂の位置を光学マッピングし、その塩基配列上の位置を推定すると、R- λ DNA 上の輝点の位置は固定端の位置から約 9,500 塩基対にある λ 複製起点領域と一致した。また、R-SV40ori- λ DNA 上の輝点の位置は固定端の位置から約 13,400 塩基対にある SV40 複製起点領域と一致した。以上のように、R- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA 上の輝点の位置が F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA 上の輝点の位置と一致したことから、 λ DNA の局所的な開裂が λ DNA の λ 複製起点の A + T-rich 領域近傍に誘導され、SV40ori- λ DNA の局所的な開裂が SV40ori- λ DNA の SV40 複製起点の A + T-rich 配列領域近傍に誘導されることが示された。負の超らせん歪みによって生じる局所的な開裂は、核酸化学による研究 [1]、[5]、試験管内実験による二次元電気泳動などによるゲル電気泳動による多分子解析 [3]、[6]、原子間力顕微鏡や磁気ピンセット装置を用いた 1 分子解析 [7]、[8]、[9] など様々な分野の研究によって、A + T-rich 領域に誘導されることが示されている。また、DNA 複製反応が開始される複製起点には A + T-rich 領域が存在することから、局所的な開裂が DNA 複製反応の開始に影響を与える可能性があることが示唆されてきた。しかしながら、局所的な開裂が複製起点の A + T-rich 領域にどの程度の負の超らせん密度によって優位に誘導されるのか、などは実験的に証明されていない。一方、本研究は DNA に-0.1 程度の超らせん密度の負の超らせんを導入することによって、局所的な開裂が複製起点内の A + T-rich 領域に誘導されることを 1 分子レベルの蛍光観察によって実験的に証明することに成功した。この結果から、私は負の超らせん歪みによって生じる局所的な開裂が DNA 複製反応の開始の制御に何らかの影響を与える可能性があることを提唱する。

F-SV40ori- λ DNA と R-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂はベクターDNA である λ DNA の λ 複製起点近傍に誘導されずに、ベクターDNA 内にクローニングした

SV40 複製起点近傍に誘導された。この要因として、SV40 複製起点の 17 塩基対の A + T-rich 配列領域は AT 含有量が 100%であるのに対して λ 複製起点の 40 塩基対の A + T-rich 領域は AT 含有量が 80%であることから、SV40ori- λ DNA の局所的な開裂が SV40 複製起点領域近傍に優位に誘導されたと考えている。このことから、SV40ori- λ DNA の SV40 複製起点領域の局所的な開裂によって λ 複製起点領域が弛緩され、ssDNA 領域の輝点が出現しなかったのだろう。従って、SV40ori- λ DNA にさらに高い超らせん密度の超らせんを導入することによって λ 複製起点領域と SV40 複製起点領域の両方に局所的な開裂が誘導されるのかもしれない。

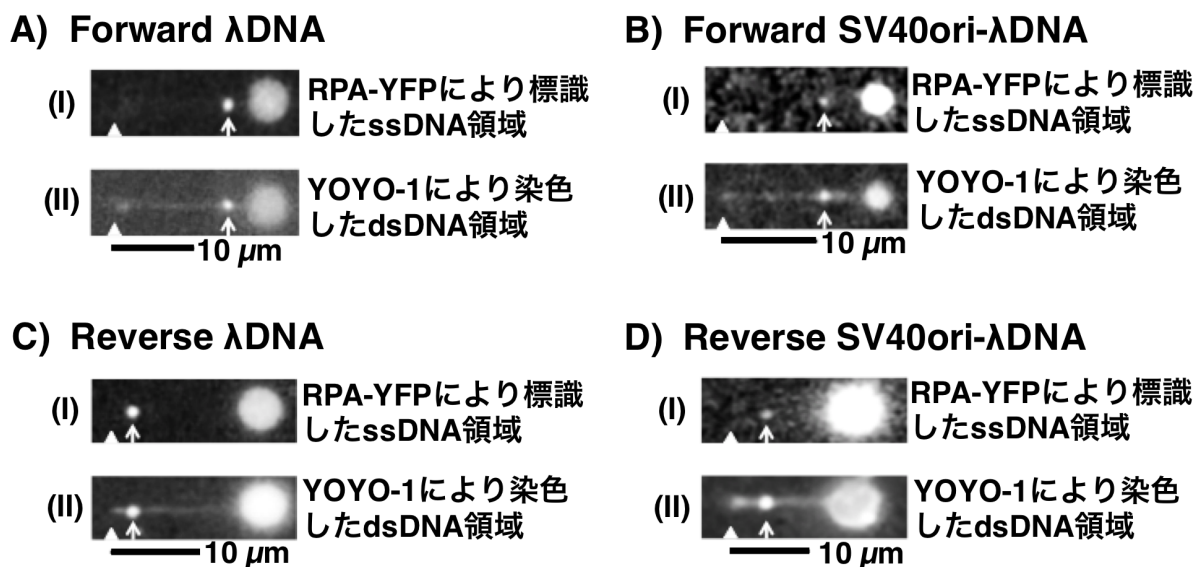


図 6-10. λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の負の超らせん歪みによる局所的な開裂の蛍光画像
 -0.095 及び -0.1 の超らせん密度下での F- λ DNA、R- λ DNA、F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂は (I) RPA-YFP により ssDNA 領域を標識後、(II) YOYO-1 により dsDNA 領域を染色することによって直接観察された。

A -0.095 の超らせん密度下での F- λ DNA の局所的な開裂

B -0.1 の超らせん密度下での F-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂

C -0.095 の超らせん密度下での R- λ DNA の局所的な開裂

D -0.1 の超らせん密度下での R-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂

白三角 : DNA の固定端

白矢印 : RPA-YFP により標識した ssDNA 領域の蛍光領域

黒線 : 10 μ m のスケールバー

6.3.3 負の超らせん密度を増加したときの DNA の局所的な開裂の直接観察

λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の超らせん密度は DNA 二重らせんを巻き戻した数である。本実験では DNA 二重らせんの 1 回転を 10.5 塩基対と定義したとき、磁気ピンセット装置による回転磁石の回転操作によって F- λ DNA に 0、-0.045、-0.095 の超らせん密度の負の超らせんを導入し、F-SV40ori- λ DNA に 0、-0.047、-0.1 の超らせん密度の負の超らせんを導入した。F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂は超らせん密度の段階的な増加に伴い直接観察された。以上の結果、F- λ DNA の 0 から -0.045 と F-SV40ori- λ DNA の 0 から -0.047 の超らせん密度下において、DNA 二重らせんの局所的な開裂は誘導されなかった (図 6-11)。一方、F- λ DNA の -0.095 と F-SV40ori- λ DNA の -0.1 の超らせん密度下において、DNA 二重らせんの局所的な開裂が誘導された (図 6-11)。これらの λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の局所的な開裂の位置は、 λ 複製起点及び SV40 複製起点の A + T-rich 領域の位置と一致したことから、本研究は高い負の超らせん密度が低い負の超らせん密度よりも DNA 複製起点の A + T-rich 領域近傍に開裂を優位に誘導させることを直接観察にて実験的に証明した。

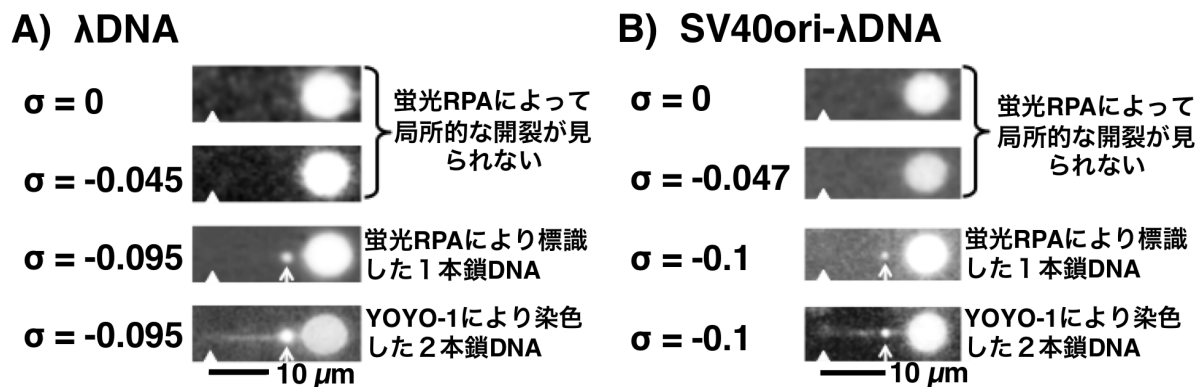


図 6-11. 経時的に負の超らせん密度を増加したときの λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の負の超らせん歪みによる局所的な開裂の蛍光画像 0、-0.045、-0.095 及び 0、-0.047、-0.1 の超らせん密度下での F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂は RPA-YFP により ssDNA 領域を標識後、YOYO-1 により dsDNA 領域を染色することによって直接観察された。

A 0、-0.045、-0.095 の超らせん密度下での F- λ DNA の局所的な開裂

B 0、-0.047、-0.1 の超らせん密度下での F-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂

白三角 : DNA の固定端

白矢印 : RPA-YFP により標識した ssDNA 領域の蛍光領域

黒線：10 μm のスケールバー

さらに本研究ではどの程度の超らせん密度が局所的な開裂の誘導に影響を与えるのか、を調査するため、指定した超らせん密度下での F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂の頻度を算定し、その確率分布をヒストグラムで表した (図 6-12)。指定した超らせん密度として、F- λ DNA には 0、-0.022、-0.045、-0.069、-0.095 の超らせん密度の負の超らせんを導入し、F-SV40ori- λ DNA には 0、-0.023、-0.047、-0.073、-0.1 の超らせん密度の負の超らせんを導入した。解析の結果、F- λ DNA 及び F-SV40ori- λ DNA の負の超らせん密度の上昇が局所的な開裂の出現頻度の増加に効果的であることが示された (図 6-12A、B)。とりわけ、F- λ DNA の-0.069 以上と F-SV40ori- λ DNA の-0.073 以上の超らせん密度下において、DNA 二重らせんの局所的な開裂の出現頻度が上昇した (図 6-12B)。一方、F- λ DNA の-0.045 以下と F-SV40ori- λ DNA の-0.047 以下の超らせん密度下において、DNA 二重らせんの局所的な開裂の発生頻度が非常に低下した (図 6-12A、B)。これらの結果、高い負の超らせんが局所的な開裂を優位に誘導させることが示された。しかしながら、高い負の超らせん密度でも局所的な開裂の出現率は 30%程度であった。本研究では負の超らせん歪みにより生じた ssDNA に対して結合した RPA-YFP の輝点から局所的な開裂を評価しているために、ssDNA に対して RPA-YFP が結合できない、あるいは、ssDNA に結合した RPA-YFP の結合数が少ないなどの原因によって輝点として捉えることができない可能性が考えられる。このため、数塩基程度の局所的な開裂領域では評価することができないために、局所的な開裂の出現頻度は低くなったのかもしれない。

F-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂の頻度が F- λ DNA よりも低下した要因には Z 型構造が SV40 複製起点領域に誘導した可能性が考えられる。SV40ori- λ DNA の SV40 複製起点領域は SV40 origin core、G + C-rich 領域である 21 塩基対の 3 つのタンデム反復配列、72 塩基対のタンデム反復配列から構成されている。-0.056 の超らせん密度下において、SV40 複製起点領域の 72 塩基対のタンデム反復配列に Z 型構造が誘導されることが実験的に示されており、SV40ori- λ DNA の負の超らせんは Z 型構造の誘導によって弛緩された可能性がある [11]、[12]。そのため、SV40 複製起点領域の局所的な開裂の発生の頻度が減少し、さらにはベクターDNA 内に含まれる λ 複製起点領域の開裂に必要な十分なエネルギーが足りなかったのかもしれない。

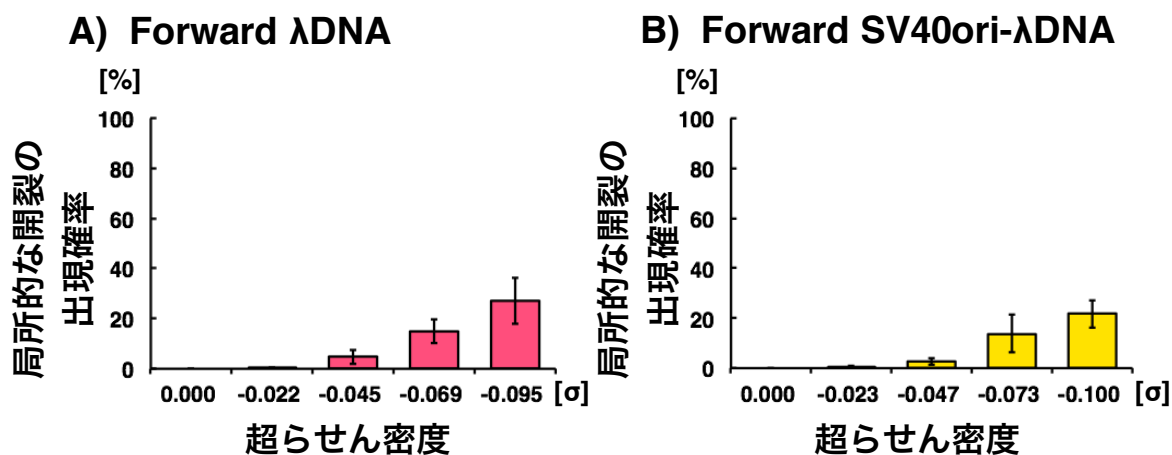


図 6-12. 指定した超らせん密度の負の超らせんを導入したときの λDNA と SV40ori-λDNA の局所的な開裂の出現確率の分布のヒストグラム

A 0、-0.022、-0.045、-0.069、-0.095 の超らせん密度の負の超らせんを導入したときの F-λDNA の局所的な開裂の出現確率の分布

B 0、-0.023、-0.047、-0.073、-0.1 の超らせん密度の負の超らせんを導入したときの F-SV40ori-λDNA の局所的な開裂の存在確率分布

負の超らせんにより生じる局所的な開裂の実験を通して観察した F-λDNA の分子の数：35 ($\sigma = 0$)、28 ($\sigma = -0.022$)、30 ($\sigma = -0.045$)、21 ($\sigma = -0.069$)、32 ($\sigma = -0.095$) 分子

負の超らせんにより生じる局所的な開裂の実験を通して観察した F-SV40ori-λDNA の分子の数：46 ($\sigma = 0$)、55 ($\sigma = -0.023$)、20 ($\sigma = -0.047$)、39 ($\sigma = -0.073$)、47 ($\sigma = -0.1$) 分子

エラーバー：各 4 回の実験により得られた F-λDNA 及び F-SV40ori-λDNA の負の超らせん歪みにより生じた局所的な開裂の出現確率の標準偏差。

§6.4 第 6 章のまとめ

本研究は λDNA 及び SV40ori-λDNA の負の超らせん歪みによる局所的な開裂が λ 複製起点及び SV40 複製起点内の A + T-rich 領域に誘導されること、高い超らせん密度が複製起点近傍に局所的な開裂を優位に誘導されることを明らかにした。従って、私は負の超らせん歪みによって生じる局所的な開裂が複製起点の A + T-rich 領域に優位に誘導されることを結論づける。このことから、負の超らせん歪みにより生じる局所的な開裂が DNA 複製反応の開始の制御に影響を与えることを私は提唱する [16]、[17]。本研究で開発した 1 分子蛍光観察装置は、直鎖状 DNA に対して任意の超らせん密度の超らせんを導入することができ、さらに直接観察することに

よって超らせん歪みによって生じる非 B 型構造の変化の過程を捉えることが可能である。このため、本研究は細胞核内の核マトリクスに固定化された染色体 DNA の性質を反映させた実験系を構築することができた。この実験系は細胞核内の環境に近接した条件下での遺伝子発現制御や染色体機能制御を理解するための強力なツールとなると考えている。従って、本研究の実験系は負の超らせんによる非 B 型構造の変化の過程や負の超らせんや負の超らせん歪みによって生じた非 B 型構造が DNA 複製、修復、相同などの DNA 代謝反応に与える影響の解析に適用することが可能であるといえよう。

§6.5 参考文献

- [1] Paleček, E.
Local Supercoil-Stabilized DNA Structure.
Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1991, **26**, 151-226.
- [2] Rich, A., Wang, A. H., and Nordheim, A.
Chemistry and Biology of Left-Handed Z DNA.
Nucleic Acid Research: Future Development, 1983, 11.
- [3] Greaves, D. R., Patient, R. K., and Lilley, D. M.
Facile cruciform formation by an (AT)₃₄ sequence from a *Xenopus* globin gene.
Journal of Molecular Biology, 1985, **185**, 461-478.
- [4] Naylor, L. H., Lilley, D. M., and Van de Sande, J. H.
Stress-induced cruciform formation in a cloned d (CATG)₁₀ sequence.
The EMBO Journal, 1986, **5**, 2407.
- [5] Benham, C. J.
Torsional stress and local denaturation in supercoiled DNA.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1979, **76**, 3870-3874.
- [6] Kowalski, D., Natale, D. A., and Eddy, M. J.
Stable DNA unwinding, not "breathing," accounts for single-strand-specific nuclease hypersensitivity of specific A + T-rich sequences.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, **85**, 9464-9468.
- [7] Jeon, J. H., Adamcik, J., Dietler, G., and Metzler, R.

- Supercoiling induces denaturation bubbles in circular DNA.
Physical Review Letter, 2010, **105**, 208101
- [8] Strick, T. R., Croquette, V., and Bensimon, D.
Homologous pairing in stretched supercoiled DNA.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1998, **95**, 10579-10583.
- [9] Potaman, V. N., Lushnikov, A. Y., Sinden, R. R., and Lyubchenko, Y. L.
Site-specific labeling of supercoiled DNA at the A + T rich sequences.
Biochemistry, 2002, **41**, 13198-13206.
- [10] Saenger, W.
Principles of Nucleic Acid Structure.
Springer-Verlag, New York, 1984.
- [11] Nordheim, A., and Rich, A.
Negatively supercoiled simian virus 40 DNA contains Z-DNA segments within transcriptional enhancer sequences.
Nature, 1983, **303**, 674-679.
- [12] Nordheim, A., Herrera, R. E., and Rich, A.
Binding of anti-Z-DNA antibodies to negatively supercoiled SV40 DNA.
Nucleic Acids Research, 1987, **15**, 1661-1677.
- [13] Katsura, S., Eki, T., Nishimura, H., and Murakami, Y.
Characterization of factors that suppress linear DNA replication in SV40 in vitro replication system.
Cell Structure and Function, 1993, **18**, 19-32.
- [14] Granéli, A., Yeykal, C. C., Prasad, T. K., and Greene, E. C.
Organized arrays of individual DNA molecules tethered to supported lipid bilayers.
Langmuir, 2006, **22**, 292-299.
- [15] Van Loenhout, M. T. J., de Grunt, M. V., and Dekker, C.
Dynamics of DNA supercoils.
Science, 2012, **338**, 94-97.
- [16] Koster, D. A., Crut, A., Shuman, S., Bjornsti, M. A., and Dekker, N. H.
Cellular strategies for regulating DNA supercoiling: a single-molecule perspective.
Cell, 2010, **142**, 519-530.

[17] Méchali, M.

Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers.

Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2010, **11**, 728-738.

第 7 章

負の超らせん状態下での DNA 複製開始反応の直接観察

§7.1 序論

正や負の超らせんは DNA 二重らせんを過巻や巻き戻すことによって生じる。特に、負の超らせんは開裂構造、十字構造、Z 型構造などの非 B 型 DNA 二次構造（非 B 型構造）を誘導させることが知られており、転写、DNA 複製、その他の DNA 代謝反応に影響を与えることが考えられている [1]。転写は DNA の超らせん状態を変化することなく反応が進行するため、超らせんが転写反応に与える影響に関する研究は超らせん状態の閉環状 DNA を用いることができる試験管内実験による二次元電気泳動などのゲル電気泳動法により多くの成果が得られてきた [2]、[3]。これらの結果から、負の超らせんが転写反応の制御に影響を与えることが示唆されている [4]、[5]、[6]。

転写反応と同様に、DNA 複製反応においても負の超らせんが DNA 複製反応の制御に関与することが示唆されている [7]。近年の試験管内実験による研究では、超らせんが複製開始点の明確なコンセンサス配列が知られていない真核生物の DNA 複製反応の開始に影響を与えることが示唆されている [8]。例えば、負の超らせんが *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*、分裂酵母) の自律複製配列 1 (*ars1*) を含む閉環状 DNA への *S. pombe* の複製起点認識複合体 (Origin Recognition Complex, ORC) の結合を高めるという研究成果 [9]、負の超らせん状態の閉環状 DNA への *Drosophila melanogaster* (*D. melanogaster*、黄色ショウジョウバエ) の ORC の結合親和性が弛緩状態の閉環状 DNA や線形状 DNA への *D. melanogaster* ORC の結合親和性よりも約 30 倍も高いという研究成果が報告された [10]。また、アフリカツメガエル卵抽出物 (*Xenopus* egg extracts) の無細胞複製系の実験において、負の超らせんが DNA 鎖巻き戻し反応を劇的に促進させるという興味深い研究成果も報告された [11]。

これらの既往の研究から、負の超らせんが DNA 複製反応の開始の制御に深く関与する可能性が示唆されている。しかしながら、これらの研究において、DNA 複製反応産物をゲル電気泳動することによって解析することに依っており、この試験管内の DNA 複製反応溶液中には数百万以上の DNA 及び DNA 複製因子のタンパク質

が含まれている。そのため、これらの解析から得られる結果は、熱運動によって数百万以上の全ての閉環状 DNA に対して様々な密度の超らせんが導入されるため、個々の閉環状 DNA に対して指定した超らせん密度を制御することができず、超らせんが DNA 複製反応の開始に与える影響を評価することが事実上、極めて困難である。また、DNA 複製反応は DNA トポイソメラーゼにより動的に超らせんの状態を制御しながら進行する反応であるため、超らせんを導入した閉環状 DNA を用いても複製反応の中間過程にて DNA の超らせん状態は失われてしまう [7]。これらの要因から、試験管内実験である無細胞 DNA 複製系では閉環状 DNA の超らせん密度を自由に制御することが事実上、不可能であることから、超らせんが DNA 複製反応に与える影響は極めて限られた知見しかない。

これらの問題の解決には、DNA 1 分子を操作することによって DNA に指定した超らせん密度の超らせんを導入することが有効である [12]。本博士論文第 6 章の研究では、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から構成された 1 分子蛍光観察装置を用いて、直鎖状 DNA に任意のタイミングで任意の超らせん密度の超らせんを導入することにより負の超らせん歪みにより生じた DNA 二重らせんの局所的な開裂の直接観察に成功し、この局所的な開裂が DNA 複製起点の A + T-rich 領域に優位に誘導されることを実験的に証明した。この結果を受け、私は超らせん (DNA トポロジー) や局所的な開裂などの非 B 型構造が DNA 複製反応の開始に何らかの影響を与えると考えるようになり、真核生物の無細胞 DNA 複製系のモデルとして利用されている Simian virus 40 (SV40) の DNA 複製開始反応を適用することによって、負の超らせんや局所的な開裂が DNA 複製反応の開始の制御にどのような影響を与えるのか、を明らかにできると考えた。

そこで、本博士論文第 7 章の研究では SV40 の複製起点を含む直鎖状 DNA である SV40ori- λ DNA の弛緩状態と負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原 (Large Tumor Antigen, TAg) による DNA 鎖巻き戻し反応を直接観察することを試みた。SV40 ラージ T 抗原は複製開始と DNA ヘリカーゼ活性の機能を合わせ持つ複製因子であり、SV40 複製起点に特異的に集合し、DNA 二重らせんを巻き戻す [14]。SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応は RPA-YFP により 1 本鎖 DNA (single-stranded DNA, ssDNA) 領域を標識した後、インターカレーター型蛍光色素 YOYO-1 により 2 本鎖 DNA (double-stranded DNA, dsDNA) 領域を染色することにより直接観察された。以上の結果、高い負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 複製反応の開始段階の頻度の増加に効果的であること、高い負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を併せて促進することを明らかにした。

7.1.1 十字構造の生理学的役割

DNA 塩基配列に強く依存した 6 ヌクレオチド鎖以上の完全または不完全な逆方向の反復配列である十字構造は、ホリデイジャンクション、湾曲状 DNA、屈曲状 DNA、グアニン四重鎖などを形成することが知られている。また、十字構造には各十字構造に対して特異的に相互作用する十字構造認識タンパク質が存在することが知られており、十字構造認識タンパク質は DNA 複製、DNA 修復、転写などの DNA 代謝反応に関与することが示されている。例えば、ホリデイジャンクションに対して特異的に働く十字構造認識タンパク質はホリデイジャンクションを解消することによりゲノムの安定性の維持し、アロジェニック DNA の解消に対しても重要な役割を果たす [1]、[8]。

7.1.2 Z 型構造の生理学的役割

12 の GC 塩基対からなる左巻き二重らせん構造である Z 型構造は転写開始領域近傍に存在することから、Z 型構造が転写開始の制御に影響を与えることが考えられている。Z 型構造には Z 型構造に対して特異的に結合する Z-DNA 結合タンパク質が存在することが知られており、Z-DNA 結合タンパク質は転写開始領域近傍の Z 型構造に結合することより転写反応を促進することが示唆されている。しかしながら、試験管内実験では DNA に指定した超らせん密度の負の超らせんを導入し、Z 型構造を誘導することや転写反応の過程を解析することが困難であるため、Z 型構造が転写の制御に与える影響を解析することが極めて困難である。これらの要因から、Z 型構造の生理学的役割は未だ限られた知見しかないのが実情である [1]、[15]。

7.1.3 三重らせん構造の生理学的役割

DNA 三重らせん構造は 3 つ目の鎖であるホモピリミジン鎖が Watson-Crick 型塩基対のホモプリン-ホモピリミジン鎖からなる DNA 二重らせんの主溝に潜り込むことにより形成される。負の超らせんは DNA 三重らせん構造を誘導することが知られており、DNA 三重らせん構造が DNA 合成反応の妨害、DNA 複製や DNA 修復の抑制、転写の妨害、二本鎖 DNA の切断など DNA 代謝反応を阻害することが既往の研究から報告されている [16]。

7.1.4 Simian virus 40

独立した生活環をもたないウイルスは動植物の細胞に感染することにより増殖する独自の増殖体系をもつ。これまでの真核生物の DNA 複製の研究ではウイルスの DNA 複製系を利用することより哺乳類の DNA 複製反応の機構を解明しようと数多くの試みがなされてきた。そのなかで最も成功した無細胞 DNA 複製系がアカゲザルのウイルスである Simian Virus 40 (SV40) を利用した無細胞 SV40 DNA 複製系である。SV40 は 5,243 塩基対の閉環状 DNA であり、SV40 DNA が球形のカプシド内に包括することによって構成されている。SV40 ゲノムは遺伝子発現段階の全てを制御する制御領域を持つ。この制御領域はラージ T 抗原と 3 種類のカプシドタンパク質 VP1、VP2、VP3 のタンパク質の発現段階を制御することが可能である [14]。

ラージ T 抗原はウイルス感染後、速やかに遺伝子発現することが知られている。転写因子が SV40 ゲノムの制御領域の中心にある TATA 配列を認識することによって転写が開始され、反時計回りの方向に RNA ポリメラーゼが進行する。その後、3 種類のカプシドタンパク質 VP1、VP2、VP3 が遺伝子発現する。このとき、転写因子が SV40 ゲノムの制御領域の中心にある TATA 配列を認識することによって転写が開始され、時計回りの方向へ RNA ポリメラーゼが進行する。

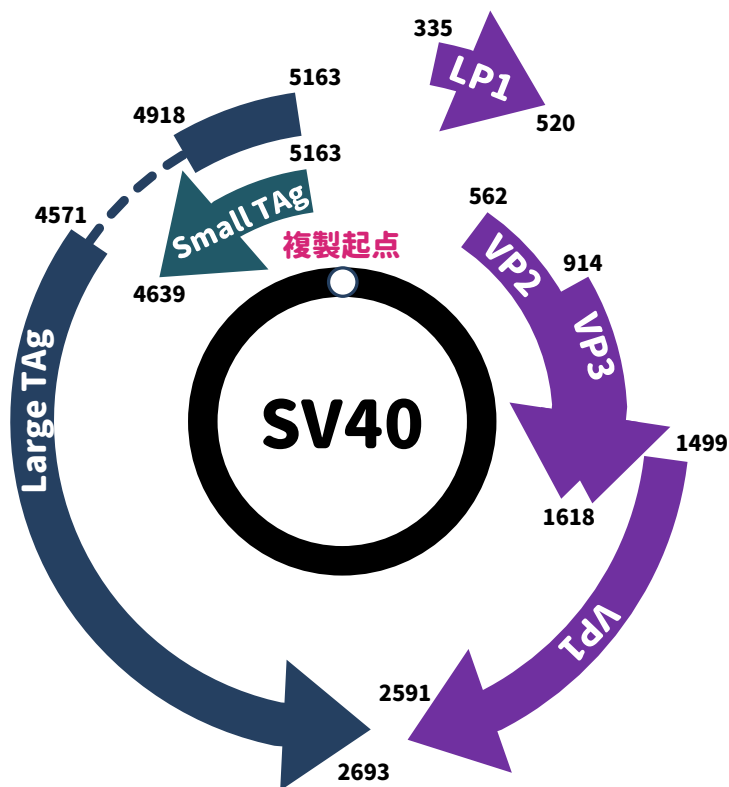


図 7-1. 遺伝子転写での RNA ポリメラーゼの伸長方向 SV40 は SV40 ゲノムの遺伝子発現段階の全てを制御する制御領域を持つ。この制御領域はラージ T 抗原と 3 種類のカプシドタンパク質 VP1、VP2、VP3 のタンパク質の発現段階を制御することが可能である。図の数字は SV40 複製起点を 1 番目塩基としたときの塩基対の番号を示す。

7.1.5 SV40 origin

SV40 の DNA 複製起点は以下の必須な領域から構成されている [14]。SV40 複製起点は 5'-CACTACTTCTGGAATAG-3' の early palindrome、4 つの 5'-GAGGC-3' の配列が連続する origin palindrome、17 塩基対の A + T-rich 配列領域の 70 塩基対から構成されており、SV40 core origin と呼ばれている。SV40 ラージ T 抗原は SV40 core origin の early palindrome 領域にあるラージ T 抗原結合サイト I と origin palindrome 領域にあるラージ T 抗原結合サイト II の 2 つラージ T 抗原結合サイトに結合することによって DNA 複製を開始させる [14]。SV40 core origin の上流には、転写因子 Sp1 の 6 つの Sp1 結合配列 5'-GGGCGG-3' 領域を含む 3 つの 21 塩基対 G + C-rich 反復配列と転写促進に必須な配列エレメントを含む 2 つの 72 塩基対反復配列がある。3 つの 21 塩基対 G + C-rich 反復配列と 2 つの 72 塩基対反復配列は転写反応の制御に重要な役割を果たすことが示されている。また、2 つの 72 塩基対反復配列には Z 型構造を形成することが実験的に示されている [14]。

7.1.6 SV40 Large Tumor Antigen の機能と構造

アカゲザルなどの霊長類に感染した SV40 は増殖する。SV40 ラージ T 抗原は SV40 の増殖の鍵となるタンパク質である。SV40 ラージ T 抗原は複製開始と DNA ヘリカーゼの機能を持ち合わせており、SV40 複製起点領域に ATP 依存的に結合することによって DNA 複製を開始させる。モノラージ T 抗原はアミノ酸残基の 131 ~ 627 番残基のヘリカーゼドメイン、アミノ酸残基の 131 ~ 250 番残基の SV40 core origin 結合ドメイン、ATPases associated with diverse cellular activities (AAA) + スーパーファミリーであるヘリカーゼスーパーファミリー III の 3 つのモチーフを含む 708 のアミノ酸残基から構成されている [17]。図 7-2 は SV40 core origin 結合ドメインを除いたラージ T 抗原のヘリカーゼドメイン領域であるアミノ酸残基の 251 ~ 627 番残基のモノ 6 量体の立体構造を示す。環状の 6 量体ラージ T 抗原は上側のスモール 6 量体層と下側のラージ 6 量体層の異なる直径の 2 つの層に分かれて

おり、上側のモノスモール T 抗原が下側のモノラージ T 抗原層に積み重なっている (図 7-2 左)。また、下側の 6 量体ラージ T 抗原層のモノマー間の空間は ATP 依存的に DNA の構造の変化を引き起こすための空間であると考えられている (図 7-2 右)。

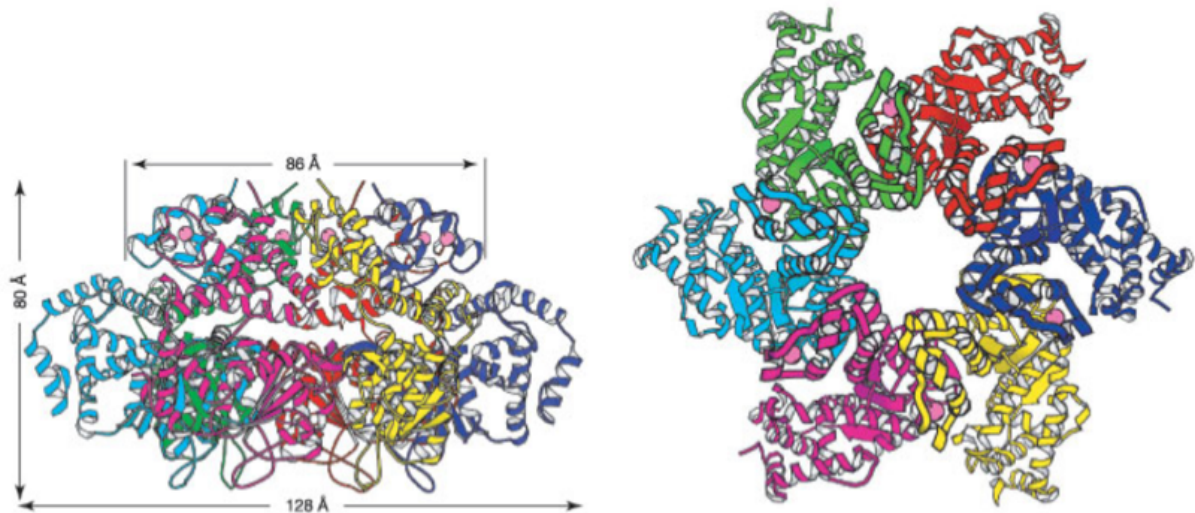


図 7-2. SV40 ラージ T 抗原のヘリカーゼドメイン領域であるアミノ酸残基の 251 ~ 627 番残基の 6 量体の立体構造 [17]

右図は側面からの SV40 ラージ T 抗原の 251 ~ 627 番残基の 6 量体の立体構造

左図は頂上からの SV40 ラージ T 抗原の 251 ~ 627 番残基の 6 量体の立体構造

単量体ラージ T 抗原は 16 個の α -helix と 5 個の β -sheet を含む 3 つのタンパク質ドメイン 1 (D1)、D2、D3 のドメイン構造のエレメントを持つ (図 7-3) [17]。D1 は 5 つの α -helix (α 1-5) を含むアミノ基末端から構成されるジंकフィンガーのタンパク質ドメインである。D2 は α -helix に挟まれた 5 つの平行な β -sheet の折り畳み構造から構成されるタンパク質ドメインである。このドメインは修飾型 SF3 ヘリカーゼに関与する Walker A、Walker B、モチーフ C の 3 つのヘリカーゼモチーフを含んでいる。D3 はアミノ基末端領域 (α 6-8) とカルボキシル基末端領域 (α 13-16) の 7 つの α -helix の折り畳み構造構成される ATP 結合に必須なタンパク質ドメインである。

§7.2 実験手順及び操作

7.2.1 実験試薬と装置

RPA-YFP の調製、微細流路装置の作製は、本博士論文第 3 章の研究に記載した「3.2.2 RPA-YFP の培養、発現、精製、ssDNA 結合活性の測定」、「3.2.5 微細流路装置の作成」の実験操作と同様な実験操作で実行した。改質ガラス基板の作製、脂質二重層の作製は、本博士論文第 5 章の研究に記載した「5.2.3 微細流路内でのガラス基板修飾法」の実験操作と同様な実験操作で実行した。また、片端ビオチン化・他片端ジゴキシゲニン化 SV40ori- λ DNA である Forward-SV40ori- λ DNA (F-SV40ori- λ DNA) 及び Reverse-SV40ori- λ DNA (R-SV40ori- λ DNA) の調製、抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズの調製は、本博士論文第 6 章の研究に記載した「6.2.3 片端ビオチン化・他片端ジゴキシゲニン化 λ DNA 及び SV40ori- λ DNA の作製」、「6.2.7 抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズの調製」の実験操作と同様な実験操作で調製した。SV40 ラージ T 抗原は国立研究開発法人 理化学研究所 今本細胞核機能研究室 専任研究員 水野武 博士のご厚意により提供いただいた [18]。本研究では、マイクロシリッジポンプは KD Scientific 社製 KDS-100 を用いて、マイクロシリッジはハミルトン社製 250 μ L マイクロシリッジ及び 100 μ L マイクロシリッジを用いた。

図 7-4 は片端ビオチン化・他片端ジゴキシゲニン化 SV40ori- λ DNA のイラストを示す。なお、左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 SV40ori- λ DNA 及び右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 SV40ori- λ DNA は特に指定しない限り F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA と記載した。F-SV40ori- λ DNA の左端のビオチン化部位はガラス基板表面に固定し、右端のジゴキシゲニン化部位には磁気ビーズを結合させた。また、R-SV40ori- λ DNA の右端のビオチン化部位はガラス基板表面に固定し、左端のジゴキシゲニン化部位には磁気ビーズを結合させた。

Forward SV40ori- λ DNA



Reverse SV40ori- λ DNA

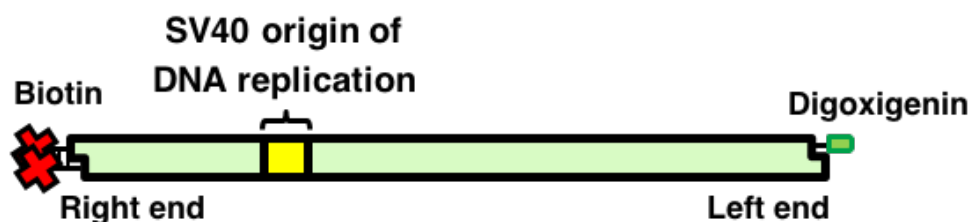


図 7-4. F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA の概要図

F-SV40ori- λ DNA : 左端ビオチン化・右端ジゴキシゲニン化 SV40ori- λ DNA

R-SV40ori- λ DNA : 右端ビオチン化・左端ジゴキシゲニン化 SV40ori- λ DNA

7.2.2 1分子蛍光観察装置

微細流路装置の作製は本博士論文第3章の研究に記載した「3.2.5 微細流路装置の作成」の実験操作と同様な実験操作で実行した。磁気ピンセット装置の詳細は本博士論文第6章の研究の「6.2.5 磁気ピンセット装置の開発」に記載したため、ここでは記載しない。また、微細流路の PDMS シリコンラバーは Fluidware Technologies 社製カスタムデザインチップのチップパターン D2-2 (Saitama, Japan) を購入した。本研究ではこの PDMS を用いて微細流路装置を作製し、実験に用いた。

7.2.3 微細流路内でのガラス基板修飾

微細流路内でのニュートラアビジンと脂質二重層によるガラス基板修飾には本博士論文第5章の研究に記載した「5.2.3 微細流路内でのガラス基板修飾法」の実験操作と同様な実験操作で実行した。下記にその手順を述べる [19]。

1. 微細流路装置に改質したガラス基板を貼り付け、微細流路装置を組み立てた。
2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、330 nM ニュートラアビジンを含む 1 x Avidin Lipid Bilayer (ALB) Buffer B (40 mM Tris-HCl pH 7.8、1 mM DTT、1 mM MgCl₂、0.2 mg/mL BSA) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、50 μL/h、20 分間流路内に注入することによってガラス基板表面にニュートラアビジンを吸着させた。

[試薬調製表 7-1]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
33 μM ニュートラアビジン	20	330 nM
10 x ALB Buffer B	20	1 x ALB Buffer B
脱気滅菌水	Up to 200 μL	

3. 200 μL の 1 x ALB Buffer A (10 mM Tris-HCl pH 8.0、100 mM NaCl) をシリンジに充填し、50 μL/h、20 分間、微細流路内に注入し、流路内のフリーなニュートラアビジンを洗い流すことよって余剰なニュートラアビジンを取り除いた。
4. 100 μL の DOPC リポソーム溶液をシリンジに充填し、50 μL/h、80 ~ 90 分間、流路内に注入することよって基板表面に脂質二重層を形成させた。これにより、ガラス基板表面の pH の変動を抑え、DNA やタンパク質の非特異的吸着を防いだ [19]。
5. 200 μL の 1 x ALB Buffer A をシリンジに充填し、50 μL/h、20 分間、微細流路内に注入することよって流路内のフリーな DOPC リポソーム溶液を洗い流し、余剰な DOPC リポソーム溶液を取り除いた。

7.2.4 微細流路内での直鎖状 DNA のガラス基板表面と磁気ビーズの固定

本実験では微細流路内にて F-SV40ori-λDNA 及び R-SV40ori-λDNA の片端ピオチン化部位をガラス基板表面に固定し、他片端ジゴキシゲニン化部位に抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを結合させた。

1. 上記の「7.2.3 微細流路内でのガラス基板修飾」の実験操作と同様な実験操作にて、ガラス基板表面にニュートラアビジンを吸着後、脂質二重層を覆うことよって流路内のガラス基板表面を修飾した。

2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、60 ng の F-SV40ori- λ DNA を含む緩衝液 (40 mM HEPES pH 7.5、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System [2.3 mg/mL of D-(+)-glucose、0.1 mg/mL glucose oxidase、18 μ g/mL catalase]) を調製 (全量 100 μ L) 後、シリンジに充填し、50 μ L/h、30 分間、流路内に注入することによって F-SV40ori- λ DNA の左端ビオチン化部位をガラス基板表面に固定した。一方、R-SV40ori- λ DNA では、R-SV40ori- λ DNA の右端ビオチン化部位をガラス基板表面に固定した。

[試薬調製表 7-2]

Sample	Vol. (μ L)	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M HEPES pH 7.5	4	4	40 mM
10% 2-Mercaptoethanol	10	10	1%
60 ng/ μ L F-SV40ori- λ DNA	1	-	0.6 ng/ μ L
60 ng/ μ L R-SV40ori- λ DNA	-	1	0.6 ng/ μ L
230 mg/mL glucose	1	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μ L		

3. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、調製した抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを含む緩衝液 (40 mM HEPES pH 7.5、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 100 μ L) 後、シリンジに充填し、30 μ L/h、40 分間、流路内に注入することによってガラス基板表面に左端固定した F-SV40ori- λ DNA の右端ジゴキシゲニン化部位に抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを結合させた。一方、R-SV40ori- λ DNA では、ガラス基板表面に左端固定した R-SV40ori- λ DNA の左端ジゴキシゲニン化部位に抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを結合させた。

[試薬調製表 7-3]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M HEPES pH 7.5	4	40 mM
10% 2-Mercaptoethanol	10	1%
約 3 μ g 抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズ	-	-

230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μ L	

4. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、緩衝液 (40 mM HEPES pH 7.5、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、30 μ L/h、40 分間、流路内に注入することによって流路内の余剰な磁気ビーズを取り除いた。

[試薬調製表 7-4]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M HEPES pH 7.5	4	40 mM
10% 2-Mercaptoethanol	10	1%
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μ L	

7.2.5 弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察

本実験では RPA-YFP により ssDNA 領域を標識後、YOYO-1 により dsDNA 領域を染色することによって SV40ori- λ DNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を直接観察した。ここでは、F-SV40ori- λ DNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察の実験操作を述べる。

1. 上記の「7.2.4 微細流路内での直鎖状 DNA のガラス基板表面と磁気ビーズの固定化」の実験操作と同様な実験操作にて、磁気ビーズを付加した F-SV40ori- λ DNA の左端ビオチン化部位はガラス基板表面に固定した後、右端ジゴキシゲニン化部位には抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを結合させた。一方、磁気ビーズを付加しない F-SV40ori- λ DNA には、F-SV40ori- λ DNA の右端ジゴキシゲニン化部位に抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを結合させていない。

2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、255 ng の SV40 ラージ T 抗原を含む緩衝液 (SV40 TAg Buffer [30 mM HEPES pH 7.5、7 mM MgCl₂、50 μg/mL BSA]、1% 2-Mercaptoethanol、ATP regeneration mixture [4 mM ATP、15 mM creatine-phosphate、10 ng/μL creatine phosphokinase]、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 50 μL) 後、シリンジに充填し、20 μL/h にて流路内に注入することによって 45 分間、インキュベートし、SV40 ラージ T 抗原を SV40 複製起点領域に結合させた。

[試薬調製表 7-5]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1 M HEPES pH 7.5	1.5	30 mM
1 M MgCl ₂	0.35	7 mM
10 mg/mL BSA	0.25	50 μg/mL
50% 2-Mercaptoethanol	2	2%
85 ng/μL SV40 TAg	3	5.1 ng/μL
100 mM Creatine-phosphate	7.5	15 mM
5 μg/μL Creatine phosphokinase	0.1	10 ng/μL
100 mM ATP	2	4 mM
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 50 μL	

3. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、15 μg の RPA-YFP を含む緩衝液 (SV40 TAg Buffer、1% 2-Mercaptoethanol、10% glycerol、0.1% Tween 20、ATP regeneration mixture、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 100 μL) 後、シリンジに充填し、30 μL/h、40 分間、流路内に注入した。

[試薬調製表 7-6]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1 M HEPES pH 7.5	3	30 mM
1 M MgCl ₂	0.7	7 mM

10 mg/mL BSA	0.5	50 µg/mL
50% 2-Mercaptoethanol	4	2%
50 % glycerol	20	10%
10% Tween 20	1	0.1%
15 µg/µL RPA-YFP	15	0.1 µg/µL
100 mM Creatine-phosphate	15	15 mM
5 µg/µL Creatine phosphokinase	0.2	10 ng/µL
100 mM ATP	4	4 mM
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 µL	

4. 磁気ビーズを付加した F-SV40ori- λ DNA の微細流路の真上に磁石を設置し、そのまま維持した。
5. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、緩衝液 (30 mM HEPES pH 7.5、10% glycerol、0.1% Tween 20、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を 0 調製 (全量 200 µL) 後、シリンジに充填し、30 µL/h、40 分間、流路内に注入することによって流路内のフリーな RPA-YFP の余剰な蛍光を取り除き、SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域を観察した。

[試薬調製表 7-7]

Sample	Vol. (µL)	Final conc.
1 M HEPES pH 7.5	6	30 mM
50% 2- Mercaptoethanol	8	2%
50 % glycerol	40	10%
10% Tween 20	2	0.1%
230 mg/mL glucose	2	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	2	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	2	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 200 µL	

6. 流路内の緩衝液の流れを利用することによって磁気ビーズを付加しない F-SV40ori- λ DNA を伸張させた。その後、RPA-YFP により標識した ssDNA 領域を観察した。一方、もう一つの磁石を微細流路装置の側面から慎重に設置することによって磁気ビーズを付加した F-SV40ori- λ DNA を伸張させた。その後、RPA-YFP により標識した ssDNA 領域を観察した。
7. 観察後、0.6 mL のマイクロチューブ内にて、0.1 μ M YOYO-1 を含む緩衝液 (30 mM HEPES pH 7.5、10% glycerol、0.1% Tween 20、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μ L) 後、シリンジに充填し、30 μ L/h、40 分間、流路内に注入することによって DNA の dsDNA 領域を染色した。その後、実験操作 6 と同様な伸張操作により伸張させた F-SV40ori- λ DNA を観察した。

[試薬調製表 7-8]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M HEPES pH 7.5	6	30 mM
50% 2- Mercaptoethanol	8	2%
50 % glycereol	40	10%
10% Tween 20	2	0.1%
10 μ M YOYO-1	2	0.1 μ M
230 mg/mL glucose	2	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	2	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	2	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

8. 磁気ビーズを付加しない R-SV40ori- λ DNA 及び磁気ビーズを付加した R-SV40ori- λ DNA に同様な実験操作をすることによって SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を観察した。
9. 磁気ビーズを付加しない F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA、磁気ビーズを付加した F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応は、同一の顕微鏡視野内にてビデオレート (30 frames/sec) で撮影した後、画像化した。ImageJ を用いて各々の SV40ori- λ DNA の dsDNA 領域の蛍光領域をもとに各々の SV40ori- λ DNA の長さを計測した。

10. ImageJ を用いることによって磁気ビーズを付加しない F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA、磁気ビーズを付加した F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の位置を光学マッピングした。

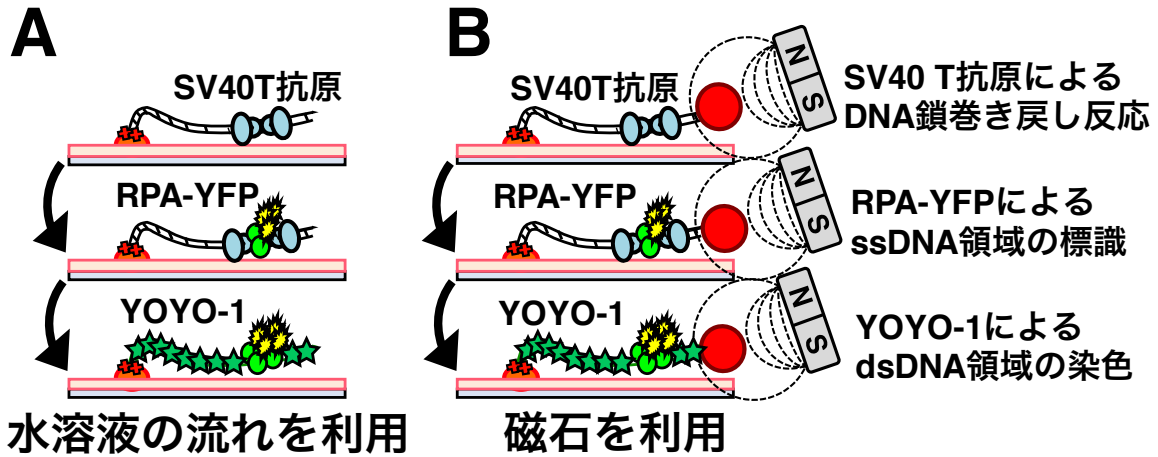


図 7-5. 磁気ビーズを付加した・しない F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原 (T 抗原) による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察の実験概要図

- A 水溶液の流れを利用することによって磁気ビーズを付加しない F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA を伸張させた。
- B 磁石を用いることによって磁気ビーズを付加した F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA を伸張させた。

7.2.6 負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察

本実験では ssDNA 領域を標識後、YOYO-1 により dsDNA 領域を染色することによって SV40ori- λ DNA の指定した超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を直接観察した。以下にその実験操作を述べる。

- 上記の「7.2.4 微細流路内での直鎖状 DNA のガラス基板表面と磁気ビーズの固定化」の実験操作と同様な実験操作にて、F-SV40ori- λ DNA の左端ビオチン化部位はガラス基板表面に固定した後、右端ジゴキシゲニン化部位には抗ジゴキシゲニン抗体磁気ビーズを結合させた。

2. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、255 ng の SV40 ラージ T 抗原を含む緩衝液 (SV40 TAg Buffer [30 mM HEPES (pH 7.5)、7 mM MgCl₂、50 µg/mL BSA]、1% 2-Mercaptoethanol、ATP regeneration mixture、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 50 µL) 後、シリンジに充填し、20 µL/h にて流路内に注入することによって 45 分間インキュベートし、SV40 ラージ T 抗原を SV40 複製起点に結合させた。

[試薬調製表 7-9]

Sample	Vol. (µL)	Final conc.
1 M HEPES pH 7.5	1.5	30 mM
1 M MgCl ₂	0.35	7 mM
10 mg/mL BSA	0.25	50 µg/mL
50% 2-Mercaptoethanol	2	2%
85 ng/µL SV40 TAg	3	5.1 ng/µL
100 mM Creatine-phosphate	7.5	15 mM
5 µg/µL Creatine phosphokinase	0.1	10 ng/µL
100 mM ATP	2	4 mM
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 50 µL	

3. インキュベートの前、磁気ピンセット装置を用ることによって F-SV40ori-λDNA に 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度の負の超らせんを導入した。磁石を微細流路の真上に設置し、磁気ビーズを付加した直鎖状 DNA を引きつけた。負の方向に指定した回転数 (1 秒あたり 1 回転する回転速度) 磁石を回転させた後、磁石の回転を停止した。これにより、F-SV40ori-λDNA の負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を開始させた。
4. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、15 µg の RPA-YFP を含む緩衝液 (TAg Buffer、1% 2-Mercaptoethanol、ATP regeneration mixture、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 100 µL) 後、シリンジに充填し、30 µL/h、40 分間、流路内に注入した。

[試薬調製表 7-10]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1 M HEPES pH 7.5	3	30 mM
1 M MgCl_2	0.7	7 mM
10 mg/ml BSA	0.5	50 $\mu\text{g}/\text{mL}$
50% 2-Mercaptoethanol	4	2%
50 % glycerol	20	10%
10% Tween 20	1	0.1%
1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ RPA-YFP	15	0.1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
100 mM Creatine-phosphate	15	15 mM
5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Creatine phosphokinase	0.2	10 $\text{ng}/\mu\text{L}$
100 mM ATP	4	4 mM
230 mg/mL glucose	1	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	1	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	1	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 100 μL	

5. 0.6 mL のマイクロチューブ内にて、緩衝液 (40 mM HEPES pH 8.0、10% glycerol、0.1% Tween 20、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System) を調製 (全量 200 μL) 後、シリンジに充填し、30 $\mu\text{L}/\text{h}$ 、40 分間、微細流路内に注入することによって流路内のフリーな RPA-YFP の余剰な蛍光を取り除き、SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域を観察した。

[試薬調製表 7-11]

Sample	Vol. (μL)	Final conc.
1 M HEPES pH 7.5	6	30 mM
50% 2-Mercaptoethanol	8	2%
50 % glycerol	40	10%
10% Tween 20	2	0.1%
230 mg/mL glucose	2	2.3 mg/mL
1.8 mg/mL catalase	2	0.018 mg/mL
10 mg/mL glucose oxidase	2	0.1 mg/mL

脱気滅菌水	Up to 200 μ L	
-------	-------------------	--

6. もう一つの磁石を微細流路装置の側面から慎重に設置することによって F-SV40ori- λ DNA を伸張させた。その後、RPA-YFP により標識した ssDNA 領域を観察した。
7. 観察後、0.6 mL のマイクロチューブ内にて、0.1 μ M YOYO-1 を含む緩衝液（40 mM HEPES pH 8.0、10% glycerol、0.1% Tween 20、1% 2-Mercaptoethanol、Oxygen-Scavenging System）を調製（全量 200 μ L）後、シリンジに充填し、30 μ l/h、40 分間、流路内に注入することによって F-SV40ori- λ DNA の dsDNA 領域を染色した。その後、実験操作 6 と同様な伸張操作により伸張させた F-SV40ori- λ DNA を観察した。

[試薬調製表 7-12]

Sample	Vol. (μ L)	Final conc.
1 M HEPES pH 7.5	6	30 mM
50% 2- Mercaptoethanol	8	2%
50 % glycereol	40	10%
10% Tween 20	2	0.1%
10 μ M YOYO-1	2	0.1 μ M
230 mg/ml glucose	2	2.3 mg/mL
1.8 mg/ml catalase	2	0.018 mg/mL
10 mg/ml glucose oxidase	2	0.1 mg/mL
脱気滅菌水	Up to 200 μ L	

8. SV40ori- λ DNA の負の超らせん状態下にて SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応は同一の顕微鏡視野内にてビデオレートでの撮影後、画像化した。ImageJ を用いることによって画像化した DNA の dsDNA 領域の蛍光領域をもとに F-SV40ori- λ DNA の長さを計測した。
9. ImageJ を用いることによって F-SV40ori- λ DNA の負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域を光学マッピングした。

負の超らせん状態下でのSV40ラージT抗原によるDNA鎖巻き戻し反応を直接観察した。

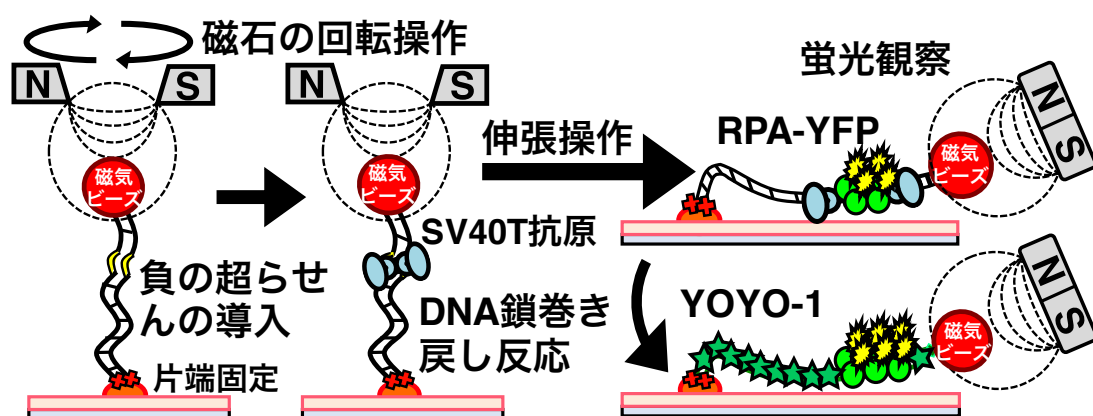


図 7-6. SV40ori- λ DNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度の負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原 (TAg) による DNA 鎖巻き戻し反応の観察実験の概要図

§7.3 結果及び考察

7.3.1 弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察

本研究では、磁気ビーズを付加した・付加しない SV40ori- λ DNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を直接観察した。このとき、F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA を用い、流路内のガラス基板表面に SV40ori- λ DNA の左端と右端とを各々固定することによって SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された SV40ori- λ DNA 上の位置を調査した。図 7-7 は磁気ビーズを付加しない F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の蛍光画像である。観察の結果、RPA-YFP により標識した ssDNA 領域の輝点が YOYO-1 により染色した DNA の dsDNA 領域上に出現した。SV40 ラージ T 抗原が非添加である同様な実験では、SV40ori- λ DNA 上に ssDNA 領域の輝点が出現しなかった。SV40 ラージ T 抗原によって DNA が局所的に巻き戻された結果、ssDNA 領域が観察された。また、光学マッピングによって SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の位置を解析したところ、F-SV40ori- λ DNA 上の輝点の位置は F-SV40ori- λ DNA の固定端の位置から約 33,000 塩基対の SV40 複製起点の位置と一致した。一方、R-SV40ori- λ DNA 上の輝点の位置は R-SV40ori- λ DNA の固定端の位置から約 11,400 塩基対の SV40 複製起

点の位置と一致した。また、SV40 複製起点を含まない λ DNA を用いた SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察では輝点が出現しなかった。以上の結果、SV40ori- λ DNA の SV40 複製起点から SV40 ラージ T 抗原によって SV40 DNA 複製反応が開始されることが示された。

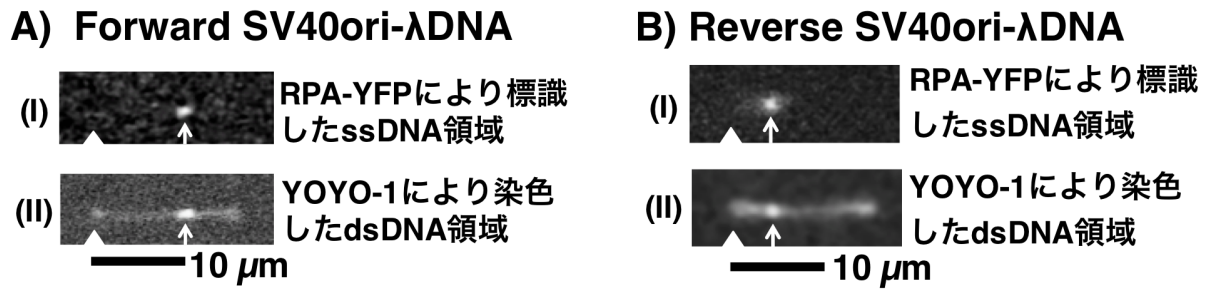


図 7-7. 磁気ビーズを付加しない SV40ori- λ DNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察 磁気ビーズを付加しない SV40ori- λ DNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応は、(I) RPA-YFP により ssDNA 領域を標識後、(II) YOYO-1 により dsDNA 領域を染色することによって直接観察された。

A 弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された磁気ビーズを付加しない F-SV40ori- λ DNA の蛍光画像

B 弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された磁気ビーズを付加しない R-SV40ori- λ DNA の蛍光画像

白三角：DNA の固定端

白矢印：DNA の ssDNA 領域の蛍光領域

黒線：10 μ m のスケールバー

次に、本研究では磁気ビーズを付加した F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を直接観察した。図 7-8 は F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の蛍光画像である。観察の結果、RPA-YFP により標識した ssDNA 領域の輝点が YOYO-1 により染色した dsDNA 領域上に出現した。光学マッピングによって SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の位置を解析したところ、磁気ビーズを付加したときと磁気ビーズを付加しないときの F-SV40ori- λ DNA 及び R-SV40ori- λ DNA 上の輝点の位置が一致したことから、SV40ori- λ DNA の SV40 複製起点領域から SV40 ラージ T 抗原によって DNA 複製反応が開始されることが実証された。以上の結果、SV40ori- λ DNA

に指定した超らせん密度の超らせんを導入することによって超らせんが SV40 DNA 複製開始反応に与える影響の評価に適用することが可能であることが示された。

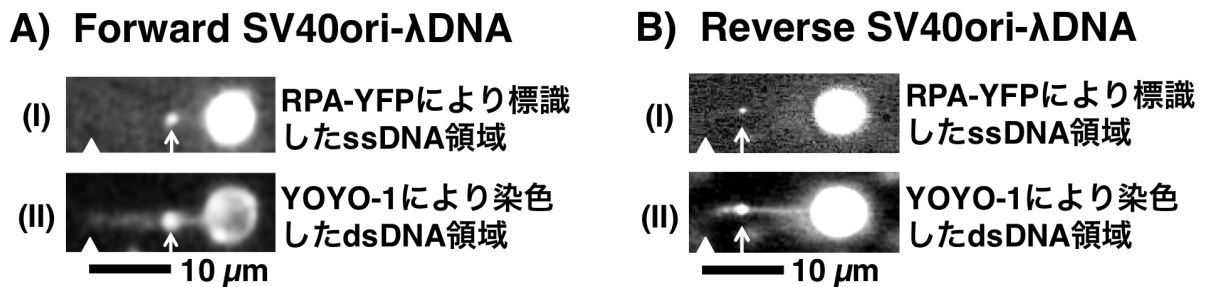


図 7-8. 磁気ビーズを付加した SV40ori-λDNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察 磁気ビーズを付加した SV40ori-λDNA の弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応は、(I) RPA-YFP により ssDNA 領域を標識後、(II) YOYO-1 により dsDNA 領域を染色することによって直接観察された。

A 弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された磁気ビーズを付加した F-SV40ori-λDNA の蛍光画像

B 弛緩状態下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された磁気ビーズを付加した R-SV40ori-λDNA の蛍光画像

白三角：DNA の固定端

白矢印：ssDNA 領域の蛍光領域

黒線：10 μm のスケールバー

7.3.2 負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応

の直接観察

本研究では 1 回転あたり 10.5 塩基対の DNA の弛緩状態下での回転数に対して DNA 二重らせんを巻き戻したらせんの回転数を負の超らせんの超らせん密度として定義することによって、F-SV40ori-λDNA に 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度の負の超らせんを導入したときの SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を直接観察した。図 7-9 は F-SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の蛍光画像である。F-SV40ori-λDNA の 0、-0.02 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域は輝点として現れた (図 7-9A、B)。光学マッ

ピングによって SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の位置を解析したところ、F-SV40ori- λ DNA 上の輝点の位置が SV40 複製起点の位置と一致した。一方で、SV40 ラージ T 抗原が非添加である同様な実験では SV40ori- λ DNA 上に輝点が出現しなかったことから、SV40 ラージ T 抗原によって SV40ori- λ DNA の SV40 複製起点領域から DNA 複製反応が開始されたと考えられる。興味深いことに、F-SV40ori- λ DNA の -0.04、-0.06 の超らせん密度下では SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域はさらに拡張され、長い直線状の蛍光領域として観察された (図 7-9C、D)。この結果は DNA が高い超らせん密度の負の超らせん状態のときのみ出現したことから、高い負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を促進させることが示された。

試験管内実験による多分子の挙動の平均値の測定では、熱運動によって局所的に様々な密度の超らせんが導入されている状態である閉環状 DNA の超らせん密度を制御すること、DNA 複製反応の開始の過程は覆い隠されてしまうこと、DNA トポイソメラーゼによって超らせん状態の閉環状 DNA の超らせんが弛緩されることなどにより、超らせんが DNA 複製反応に与える影響を解析することが困難であることから、本研究の結果と同様な結果を得ることは事実上、不可能である。本研究では DNA 1 分子を操作することによって直鎖状 DNA に負の超らせんを導入し、さらに、DNA 複製反応の開始を直接観察することによって負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応に影響を与えることをはじめて実証することができた。また、既往の研究にて報告されている DNA に付加した磁気ビーズの挙動を追跡する磁気ピンセット装置のみ用いた間接的な解析では、DNA の末端間距離の変化の情報しか得ることができないため、SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の位置や長さを決定することができず、負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応に与える影響の実態を明らかにすることは極めて困難である。一方、本研究では、1 分子レベルの蛍光観察によって SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の位置や長さを捉えることができるため、負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を促進させることを明らかにした。

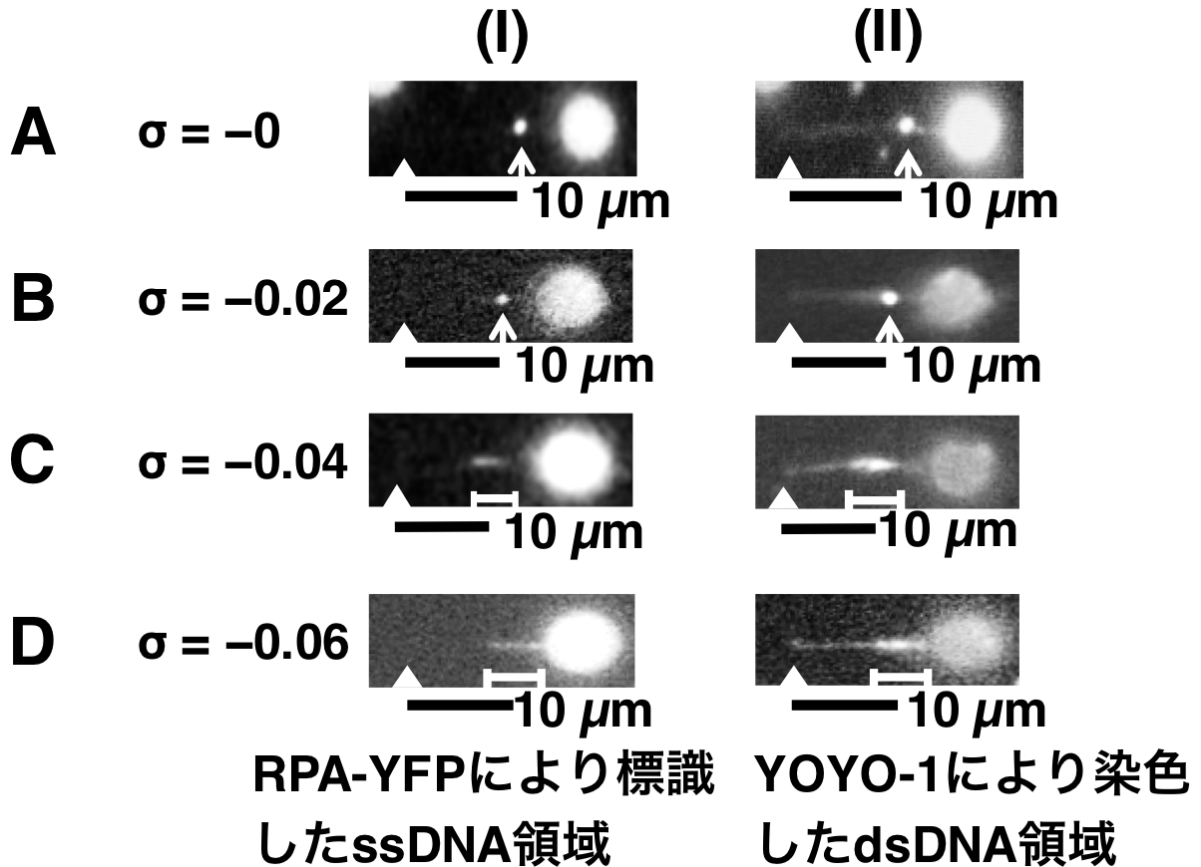


図 7-9. SV40ori-λDNA の負の超らせん状態下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の直接観察 F-SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応は (I) RPA-YFP により ssDNA 領域を標識後、(II) YOYO-1 により dsDNA 領域を染色することより直接観察された。

- A 0 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された SV40ori-λDNA の蛍光画像
- B -0.02 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された SV40ori-λDNA の蛍光画像
- C -0.04 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された SV40ori-λDNA の蛍光画像
- D -0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された SV40ori-λDNA の蛍光画像

白三角：鋳型 DNA の固定端

白矢印：ssDNA 領域の蛍光領域

黒線：10 μm のスケールバー

さらに、本研究では DNA の負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 複製反応の開始にどのような影響を与えるのか、を調査するために、実験により獲得された蛍光画像を解析した。図 7-10 は 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の実験と 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での F-SV40ori- λ DNA の局所的な開裂の実験の 2 つの実験条件により得られた DNA の ssDNA 領域の発生の確率分布を示す。解析の結果、いかなる超らせん密度の負の超らせんにおいても、SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の出現頻度が高いことが示された。これらの有意水準値 5% の両側 t 検定による統計解析では、各超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応と各超らせん密度下での DNA 二重らせんの局所的な開裂との ssDNA 領域の出現頻度に有意差が示された ($P = 0.008$ [$\sigma = 0$], 0.001 [$\sigma = -0.02$], 0.006 [$\sigma = -0.04$], 0.012 [$\sigma = -0.06$])。以上の結果、出現した DNA の ssDNA 領域の大部分は SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応に依っていることが示された。また、F-SV40ori- λ DNA の -0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下では 0 の超らせん密度下 (弛緩状態) よりも SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の出現頻度が 1.8 倍、4.0 倍、4.8 倍程度増加した。これらの有意水準値 5% の片側 t 検定による統計解析では、F-SV40ori- λ DNA の 0 の超らせん密度下と F-SV40ori- λ DNA の -0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下とでの SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の出現頻度に有意差が示された ($P = 0.012$ [$\sigma = 0$ vs -0.02], 0.002 [$\sigma = 0$ vs -0.04], 0.009 [$\sigma = 0$ vs -0.06])。以上の統計的な解析の結果、負の超らせんが SV40 DNA 複製反応の開始の発生の頻度に重要な影響を与えることを明らかにした。

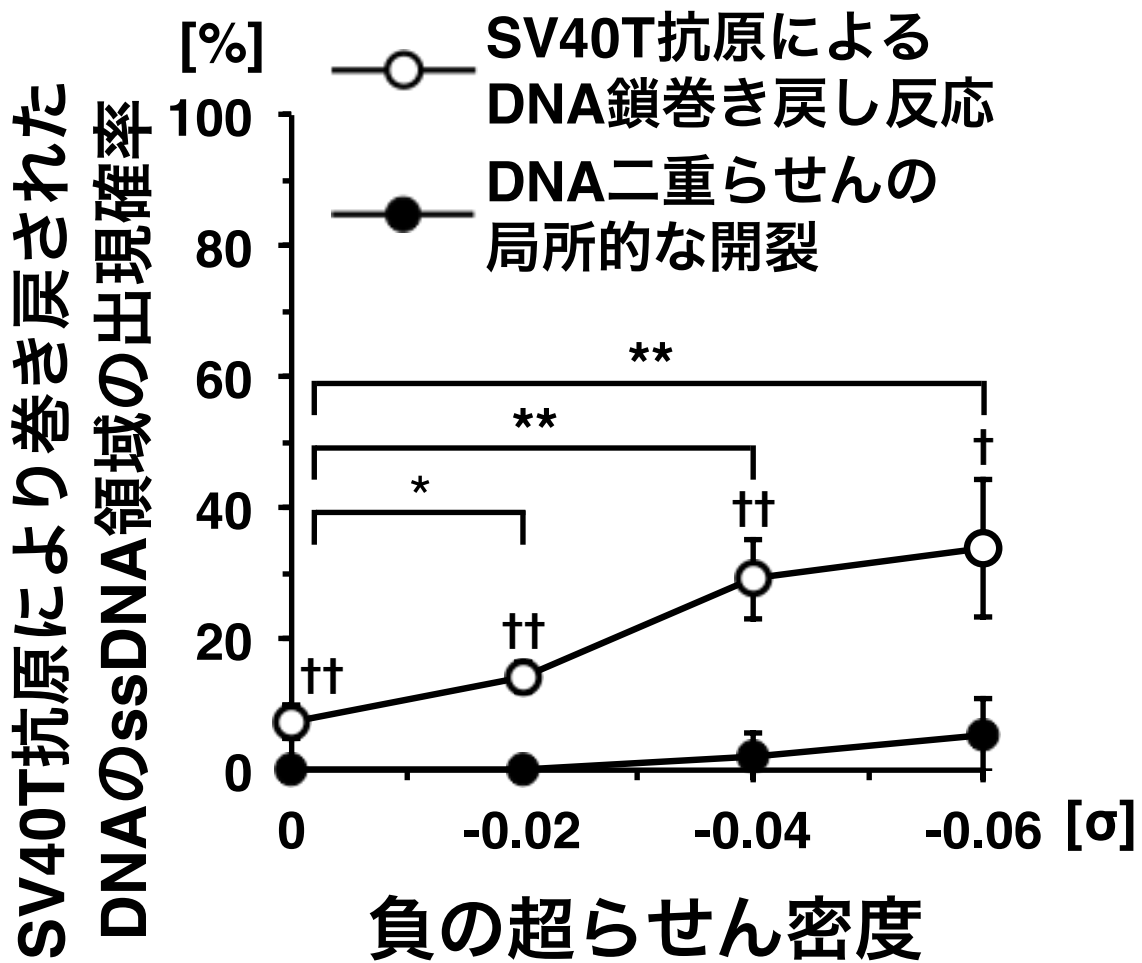


図 7-10. F-SV40ori-λDNA の指定した超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応と局所的な開裂の出現頻度の確率分布

白丸 : F-SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された ssDNA 領域の出現頻度の確率分布

黒丸 : 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での F-SV40ori-λDNA の局所的な開裂の出現頻度の確率分布

SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応の実験を通して観察した DNA の分子の数 : 46 ($\sigma = 0$)、38 ($\sigma = -0.02$)、53 ($\sigma = -0.04$)、43 ($\sigma = -0.06$) 分子

負の超らせん歪みによる DNA 二重らせんの局所的な開裂の実験を通して観察した DNA の分子の数 : 55 ($\sigma = 0$)、54 ($\sigma = -0.02$)、46 ($\sigma = -0.04$)、49 ($\sigma = -0.06$) 分子

エラーバー : F-SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により DNA 鎖巻き戻し反応の実験と 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での F-SV40ori-λDNA の局所的な開裂の実験の各 4 回の実験を通して得られた標準偏差

ダガー : F-SV40ori- λ DNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された ssDNA 領域の出現頻度と 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での DNA 二重らせんの局所的な開裂の出現頻度を比較したときの有意水準値 5%とした両側 t 検定による統計解析

アスタリスク : F-SV40ori- λ DNA の 0 の超らせん密度下と-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下とでの SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された ssDNA 領域の出現頻度の比較したときの有意水準値 5%とした片側 t 検定による統計解析

図 7-11 は F-SV40ori- λ DNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の長さのヒストグラムを示す。これらの結果、F-SV40ori- λ DNA の-0.04、-0.06 の超らせん密度下は 0、-0.02 の超らせん密度下よりも SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の長さが 4.5 倍程度拡張したことが示された。また、有意水準値 5%の両側 t 検定による統計解析では、F-SV40ori- λ DNA の-0.02 の超らせん密度下と-0.04 の超らせん密度下とでの SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の長さの有意差が示された ($P = 0.047$ [$\sigma = -0.02$ vs -0.04])。DNA 鎖巻き戻し反応は負の超らせんを弛緩するために、SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応は、負の超らせん状態下ではエネルギー的に有利に進行する。この理由から、SV40 ラージ T 抗原によって巻き戻された DNA の ssDNA 領域の長さもまた拡張されたと考えられる。高い負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を促進させることが示された。

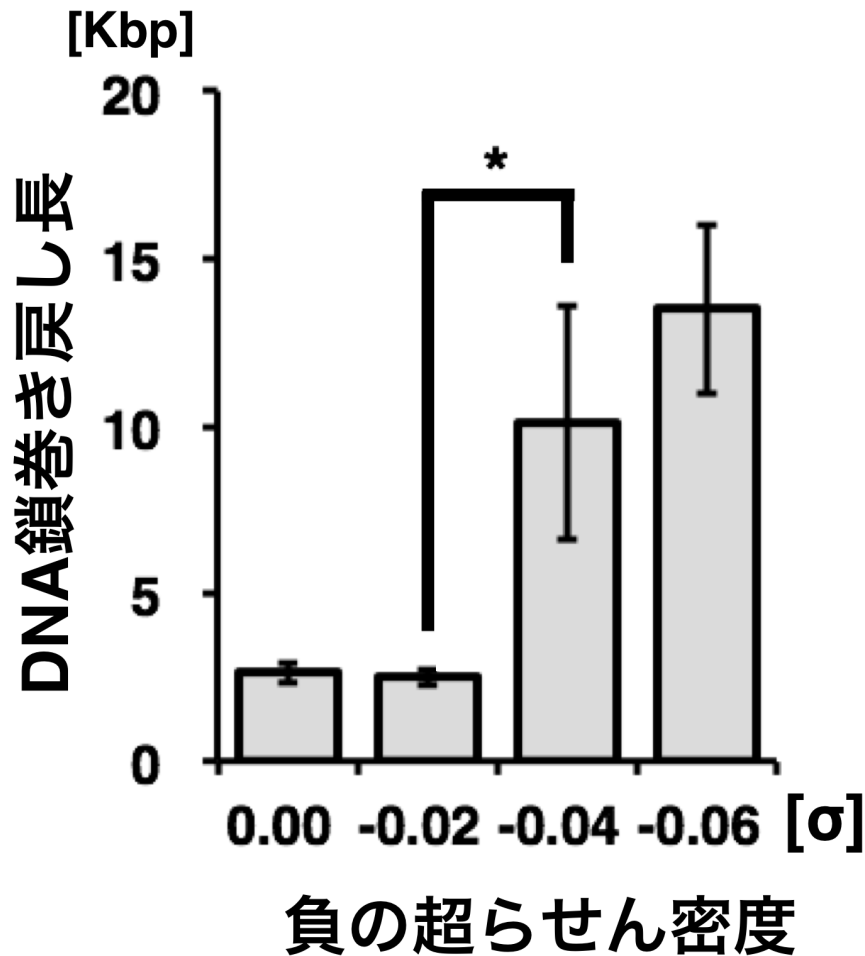


図 7-11. SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の長さのヒストグラム

F-SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の長さを測定した分子の数：4 ($\sigma = 0$)、4 ($\sigma = -0.02$)、3 ($\sigma = -0.04$)、3 ($\sigma = -0.06$) 分子

エラーバー：F-SV40ori-λDNA の 0、-0.02、-0.04、-0.06 の超らせん密度下での SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の長さの標準偏差

アスタリスク：F-SV40ori-λDNA の-0.02 の超らせん密度下と-0.04 の超らせん密度下とでの SV40 ラージ T 抗原により巻き戻された DNA の ssDNA 領域の長さを比較したときの有意水準値 5%とした両側 t 検定による統計解析

試験管内実験にて超らせんが DNA 複製反応に与える影響を解析しようとしても、試験管内の反応溶液では室温程度の熱平衡状態でも熱擾乱により閉環状 DNA に対して様々な密度の超らせんが局所的に導入されるために、DNA 複製反応がいかな

る超らせんにおいても非依存的に開始されるのか、熱擾乱により偶発的にある閾値を越えた超らせん状態の DNA のみ DNA 複製反応が開始されるのかどうかは明らかにすることができない [20]。一方、本研究は1分子レベルの蛍光観察により負の超らせん状態下にて SV40 ラージ T 抗原によって SV40 複製起点から DNA 複製が開始され、巻き戻された DNA の ssDNA 領域を捉えることができること、高い負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 複製反応の開始段階の頻度の増加に効果的であること、高い負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 鎖巻き戻し反応を併せて促進することを明らかにした。従って、私は負の超らせんが SV40 DNA 複製反応の開始の制御に重要な役割を果たすことを結論づける。

一方で、転写と SV40 DNA 複製の開始との関係性において考えてみると、SV40 ゲノムにコードされたラージ T 抗原やカプシドタンパク質 (VP1, VP2, VP3) の遺伝子転写の間、SV40 DNA 複製起点領域は RNA ポリメラーゼの進行方向の背後に位置する [21]、[22]。このため、A+T-rich 配列、early palindrome、origin palindrome を含む SV40 DNA 複製起点近傍には、負の超らせんが導入される可能性が高い [22]、[23]。従って、負の超らせんや負の超らせんによって生じる非 B 型構造 (SV40 複製起点の A+T-rich 配列領域など) が SV40 ラージ T 抗原による SV40 DNA 複製反応の開始を促進させる可能性が高いと思われる。なぜならば、転写により誘導された負の超らせんが SV40 ラージ T 抗原による DNA 複製開始と DNA 合成を促進させたという試験管内実験による研究成果が石見らのグループから報告されており、この結果から転写と SV40 DNA 複製開始は超らせんを通して相互に連係していると考えられること [22]、また、負の超らせんが SV40 DNA 複製反応の開始の制御に影響を与える結果を本研究によって得ることができたからである。

E. coli、*Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)、*S. pombe*、*D. melanogaster*、*Xenopus laevis* (*X. laevis*) などの様々な生物種において、負の超らせんが DNA 複製反応の開始を促進させる可能性があることが考えられている [8]。この理由として、バクテリアの核様体 DNA や真核生物の染色体 DNA には負の超らせんの状態を維持していること、RNA ポリメラーゼ [8]、[23]、[24]、DNA ジャイレース [8]、[25]、クロマチンリモデリング因子 [8]、[26]、ヒストンアセチル基転移酵素 [27]、DnaA 及び ORC [8]、[9]、[10] などの複製開始となる因子により負の超らせんが導入されることが挙げられるからである。例えば、転写により誘導された負の超らせんが大腸菌複製起点 origin of Chromosome (*oriC*) 領域の DNA 複製開始の活性を高めたという結果が報告されている [28]。このように、負の超らせんや負の超らせん歪みにより生じる非 B 型構造は原核生物及び真核生物の DNA 複製開始の制御に重要や役割を果たしていると考えられる。

§7.4 第7章のまとめ

本研究はDNA 1分子の負の超らせん状態下でのSV40 ラージT抗原によるDNA鎖巻き戻し反応を直接観察することによって、高い負の超らせんがSV40 ラージT抗原によるDNA複製反応の開始段階の頻度の増加に効果的であること、高い負の超らせんがSV40 ラージT抗原によるDNA鎖巻き戻し反応を併せて促進することを実験的に示した。

試験管内実験では熱擾乱による超らせんの導入による影響やDNA複製反応の反応過程でのDNAトポイソメラーゼによる鑄型DNAの超らせん状態の弛緩などの影響によって鑄型DNAの超らせん密度の超らせんを把握することが極めて困難であるために、超らせんがDNA複製反応に与える影響を評価することは事実上、極めて困難であるのが実情である。一方、本研究は熱擾乱やDNAトポイソメラーゼなどの影響を受けることなく、DNAに任意のタイミングで任意の超らせん密度の超らせんを導入することが可能であるため、超らせんがDNA複製反応に与える影響を厳密に解析することが可能である。このため、本研究は複製開始点のコンセンサス配列が存在しないヒトやマウスなどの高等生物の真核生物染色体のDNA複製反応がいつどこから開始されているかなどを明らかにすることができる可能性があり、さらに超らせん状態を動的に制御しながら進行しているDNA修復、組換え、その他のDNA代謝反応にも応用することができると考えている。従って、本研究は超らせんや非B型構造がDNA代謝反応の制御に果たしている役割を解き明かすための研究として大きく貢献できるであろう。この理由から、本研究によって得られた結果は細胞核内の環境でのDNA複製反応の開始を考える上で非常に重要な結果であると考えている。本研究にて得られた結果が細胞核内の核マトリクスに固定化された染色体DNAの性質を反映していると想定すると、染色体DNAではDNA複製反応の開始とそれに引き続くDNA鎖巻き戻し反応を伴うDNA複製の伸長が進行しやすい可能性があると考えている。

§7.5 参考文献

[1] Palecek., E.

Local Supercoil-Stabilized DNA Structure.

Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology, 1991, **26**, 151-226

[2] Hirose, S., and Suzuki. Y.

In vitro transcription of eukaryotic genes is affected differently by the degree

- of DNA supercoiling.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1988, **85**, 718-722
- [3] Mizutani, M., Ohta, T., Watanabe, H., Handa, H., and Hirose, S.
Negative supercoiling of DNA facilitates an interaction between transcription factor IID and the fibroin gene promoter.
Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1991, **88**, 718-722.
- [4] Travers, A., and Muskhelishvili, G.
DNA supercoiling-a global transcriptional regulator for enterobacterial growth?
Nature Reviews Microbiology, 2005, **3**, 157-169.
- [5] Brooks, T. A., and Hurley, L. H.
The role of supercoiling in transcriptional control of MYC and its importance in molecular therapeutics.
Nature Reviews Cancer, 2009, **9**, 849-861.
- [6] Hirose, S., and Matsumoto, K.
Possible Roles of DNA Supercoiling in Transcription.
In *DNA Conformation and Transcription*, T. Ohyama, Edition., Springer-Verlag, New York, 2005, Chap. 10. pp. 138-143
- [7] Wang, J. C.
Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective.
Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2002, **3**, 430-440.
- [8] Rampakakis, E., Gkogkas, C., Di Paola, D., and Zannis-Hadjopoulos, M.
Replication initiation and DNA topology: The twisted life of the origin.
Journal of Cellular Biochemistry, 2010, **110**, 35-43.
- [9] Houchens, C. R., Lu, W., Chuang, R. Y., Frattini, M. G., Fuller, A., Simancek, P., and Kelly, T. J.
Multiple mechanisms contribute to *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex-DNA interactions.
Journal of Biological Chemistry, 2008, **283**, 30216-30224.
- [10] Remus, D., Beall, E. L., and Botchan, M. R.
DNA topology, not DNA sequence, is a critical determinant for *Drosophila* ORC-DNA binding.

- The EMBO Journal*, 2004, **23**, 897-907.
- [11] Walter, J., and Newport, J.
Initiation of eukaryotic DNA replication: origin unwinding and sequential chromatin association of Cdc45, RPA, and DNA polymerase α .
Molecular Cell, 2000, **5**, 617-627.
- [12] Koster, D. A., Crut, A., Shuman, S., Bjornsti, M. A., and Dekker, N. H.
Cellular strategies for regulating DNA supercoiling: a single-molecule perspective.
Cell, 2010, **142**, 519-530.
- [13] Oshige, M., Kawasaki, S., Takano, H., Yamaguchi, K., Kurita, H., Mizuno, T., Matsuura, S-I., Mizuno, A., and Katsura, S.
Direct observation method of individual single-stranded DNA molecules using fluorescent replication protein A.
Journal of Fluorescence, 2011, **21**, 1189-1194.
- [14] Fanning, E., and Zhao, K.
SV40 DNA replication: from the A gene to a nanomachine.
Virology, 2009, **384**, 352-359.
- [15] Rich, A., and Zhang, S.
Z-DNA: the long road to biological function.
Nature Reviews Genetics, 2003, **4**, 566-572.
- [16] Jain, A., Wang, G., and Vasquez, K. M.
DNA triple helices: biological consequences and therapeutic potential.
Biochimie, 2008, **90**, 1117-1130.
- [17] Li, D., Zhao, R., Lilyestrom, W., Gai, D., Zhang, R., DeCaprio, J. A., Fanning, E., Jochimiak, A., Szakony, G., and Chen, X. S.
Structure of the replicative helicase of the oncoprotein SV40 large tumour antigen.
Nature, 2003, **423**, 512-518.
- [18] Ishimi, Y., Sugasawa, K., Hanaoka, F., and Kikuchi, A.
Replication of the simian virus 40 chromosome with purified proteins.
Journal of Biological Chemistry, 1991, **266**, 16141-16148.
- [19] Granéli, A., Yeykal, C. C., Prasad, T. K., and Greene, E. C.
Organized arrays of individual DNA molecules tethered to supported lipid bilayers.

- Langmuir*, 2006, **22**, 292-299.
- [20] Horowitz, D. S., and Wang, J. C.
Torsional rigidity of DNA and length dependence of the free energy of DNA supercoiling.
Journal of Molecular Biology, 1984, **173**, 75-91.
- [21] Gazdar, A. F., Butel, J. S. and Carbone, M.
SV40 and human tumours: myth, association or causality?.
Nature Review Cancer, 2002, **2**, 957-964.
- [22] Ohba, R., Matsumoto, K., and Ishimi, Y.
Induction of DNA replication by transcription in the region upstream of the human c-myc gene in a model replication system.
Molecular and Cellular Biology, 1996, **16**, 5754-5763.
- [23] Roca, J.
The torsional state of DNA within the chromosome.
Chromosoma, 2011 **120**, 323-334.
- [24] Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N., and Oda, M.
Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how?.
Annual Review of Biochemistry, 2010, **79**, 89.
- [25] Wang, J. C.
DNA topoisomerases.
Annual Review of Biochemistry, 1996 **65**, 635-692.
- [26] Cairns, B. R.
Chromatin remodeling: insights and intrigue from single-molecule studies.
Nature Structural & Molecular Biology, 2007, **14**, 989-996.
- [27] Gilbert, N., and Allan, J.
Supercoiling in DNA and chromatin.
Current Opinion in Genetics & Development, 2014, **25**, 15-21.
- [28] Asai, T., Chen, C. P., Nagata, T., Takanami, M., and Imai, M.
Transcription *in vivo* within the replication origin of the Escherichia coli chromosome: a mechanism for activating initiation of replication.
Molecular and General Genetics MGG, 1992, **231**, 169-178.

第 8 章

総括

§ 8.1 本研究の結論

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。本博士論文では、微細反応場の制御が可能な微細流路装置、DNA の 1 分子操作が可能な磁気ピンセット装置、高感度カメラを装備した蛍光顕微鏡装置の組合せから構成された 1 分子蛍光観察装置を用いることにより DNA の形態を制御し、DNA 及びタンパク質を蛍光標識することによって 1 本鎖 DNA (single-stranded DNA、ssDNA) の動態挙動の直接観察 (3 章)、DNA 合成反応 (4 章)、DNA 分解反応の直接観察 (5 章)、負の超らせんによる DNA 二重らせんの局所的な開裂 (6 章)、負の超らせん状態下での DNA 複製開始反応の直接観察 (7 章) の得られた研究成果をまとめた。

個々の DNA を蛍光観察するためには、DNA を蛍光染色する必要がある。特に、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。これらの結果は ssDNA の可視化技術の開発に大いに貢献できたと考えている。以上の研究成果は、*Journal of Fluorescence* 誌にて発表した。

次に、本博士論文第 4 章の研究において、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。これらの結果は、原核生物や真核生物などの各種の DNA ポリメラーゼの機能・特性の役割の違いを明らかにすることができると考えている。以上の研究成果は、*Sensors* 誌に発表した。

次に、本博士論文第 5 章の研究において、私は 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 分解反応の中間過程は 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。研究の結果、DNA 修復や組換え修復の解析に 1 分子観察技術を適用することができることが示された。以上の研究成果は、*Analytical Biochemistry* 誌にて発表した。

これまでの私の研究では 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、本博士論文第 6 章の研究において、私は微細流路装置、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。以上の研究成果は *Analytical Chemistry* 誌にて発表した。

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、本博士論文第 7 章の研究において、私は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、引き続き 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。本研究は、超らせんが DNA 複製反応の開始に果たしている役割を解析することができることから、コンセンサス配列のないヒト複製開始点の構造的特徴を明らかにすることができる可能性があると考えている。

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。

Appendix

§ Appendix 1 共通プロトコル

A1.1 序論

本章では本研究で扱う主要となる操作の原理および操作手順、共通の緩衝液の試薬の調製について記述した。本研究は、分子生物学・生化学的実験を行うにあたり、カルタヘナ議定書を理解し、教育訓練を受け、認可を受けた実験室において実験を遂行した。

本研究において、マイクロピペットは Gilson 社製の PIPETMAN (P シリーズ、Villiers Le Bel France) である 2 μ L (P-2)、10 μ L (P-10)、20 μ L (P-20)、100 μ L (P-100)、200 μ L (P-200)、1000 μ L (P-1000)、10 mL (P-10mL) を使用した。

A1.2 滅菌処理

本研究にて使用した試薬、機器は事前に滅菌処理をした。滅菌処理の操作は、オートクレーブ装置 (SS-325、トミー精工) 内に実験器具、試薬などの滅菌対象物を投入し、高圧高温条件 121°C、15 分間にてオートクレーブした。オートクレーブ処理直後は装置内部が高温、高圧状態であるために、2 時間程度低温、減圧した後、オートクレーブ装置から滅菌対象物を取り出した。滅菌対象物は以下の準備をした後、オートクレーブ装置にて滅菌処理を施した。

- 調製試薬：試薬を試薬びんに入れた後、蓋を軽く閉め、口周辺にアルミホイルを被せた。
- マイクロチューブ：50 μ L、600 μ L、1.5 mL のマイクロチューブ、25 mL、50 mL のコニカルチューブなどは適当なガラスびんに詰めた後、アルミホイルで口を塞いだ。
- 10 μ L、200 μ L、1 mL のマイクロチップ：ピペットマンで使用するマイクロチップは専用のケースに詰めた後、オートクレーブバックに入れ、軽く縛った。
- 生物実験ゴミ：バイオハザードを防ぐために、生理学的試薬のゴミはオートクレーブバックに入れ、滅菌処理を施した。なお、本研究での分子生物学・生化学的実験によるゴミは全てオートクレーブバックに入れることによりオートクレーブ処理することによってバイオハザードを防いだ。

A1.3 ミリ Q 水、滅菌水の定義

本研究で使用したミリ Q 水は水道水から純水製造装置 (Elix UV 3、Millipore) を用いてイオン交換水を製造し、イオン交換水を超純水製造装置 (Simplicity UV、Millipore) により超純水としたものである。Simplicity UV は比抵抗値 $18 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ 以上の超純水を調製することができる。また、滅菌処理したミリ Q 水は滅菌水と定義し、滅菌済みチューブに分注した。

A1.4 脱気滅菌水の定義

本実験では滅菌水に含む溶存酸素の取り除くために、水流アスピレーター (AS-01、As One) と遠心エバポレーター (CVE-1000、EYELA) を用いることによって滅菌水を真空脱気した。本研究では真空脱気した滅菌水を脱気滅菌水として定義した。以下に脱気滅菌水の調節方法を示す。

1. 12本の1.5 mLのマイクロチューブを用意して、1.5 mLのマイクロチューブ1本あたり1.5 mLの滅菌水を加えた。
2. 水道のホースに水流アスピレーター (AS-01、As One) を繋げ、水道水を水流アスピレーターの容器の上流にある排水溝から水道水が排出されるまで水道水を加えた。
3. 水流アスピレーターと遠心エバポレーターを真空用ホースで繋げた。
4. 滅菌水を含む1.5 mLのマイクロチューブの蓋を開けた状態で、遠心エバポレーターに滅菌水を含む1.5 mLのマイクロチューブをセットした後、遠心エバポレーターの蓋を閉めた。
5. 水流アスピレーターの電源を ON にした後、遠心エバポレーターの電源を ON にした。
6. 遠心エバポレーターのバルブを閉め、30~60分間程度真空状態で遠心することによって滅菌水を脱気した。
7. 30~60分間経過後、遠心エバポレーターのバルブを開け、遠心エバポレーターの電源を OFF にした後、水流アスピレーターの電源を OFF にした。
8. 遠心エバポレーターの蓋を開けた後、脱気滅菌水を含む1.5 mLのマイクロチューブの蓋を閉め、4°Cで保存した。

A1.5 調節試薬の pH の調節

本研究で使用した pH 調節装置は pH モニターである $\Phi 10$ pH Meter (Bcekman) とガラス電極 pH メーター (Bcekman) を用いた。ガラス電極 pH メーター先端のガラス電極は割れないように丁寧に扱い、保存の際には KCl 溶液を含む容器に保存した。pH 調節溶液は 2 ヶ月ごとに交換した。pH 調節は温度によって変化するため注意した。以下に試薬調節の際に必要な pH 調節の方法を示した。

1. pH モニター ($\Phi 10$ pH Meter、Bcekman) の電源を入れ、AUTO を示すマークが現れないことを確認した。
2. ガラス電極 pH メーター先端のガラス電極を KCl 溶液の含む容器から取り出し、ミリ Q 水で洗浄することによってキムワイプで軽く拭いた。これを 3 回繰り返し、入念に洗浄した。
3. pH 7.0 調節溶液を含む 15 mL のコニカルチューブにガラス電極 pH メーターを挿入した後、STD を押すことによって AUTO マークが停止するまで待機した。
4. AUTO マークの停止後、ガラス電極 pH メーターのガラス電極をミリ Q 水で洗浄することによってキムワイプで軽く拭いた。これを 3 回繰り返し、入念に洗浄した。
5. pH 4.0 調節溶液を含む 15 mL のコニカルチューブの溶液にガラス電極 pH メーターを挿入した後、STD を押し、AUTO マークが停止するまで待機した。
6. AUTO マークの停止後、ガラス電極 pH メーターのガラス電極をミリ Q 水で洗浄することによってキムワイプで軽く拭いた。これを 3 回繰り返し、入念に洗浄した。
7. 測定する調節試薬溶液内にガラス電極 pH メーターを挿入し、pH モニターにある pH のボタンを押すことによって調節試薬溶液を適切な pH に調節した。
8. 調節試薬溶液を適切な pH に調節した後、ガラス電極 pH メーターのガラス電極をミリ Q 水で洗浄することによってキムワイプで軽く拭いた。これを 3 回繰り返し、入念に洗浄した。その後、ガラス電極 pH メーターの先端のガラス電極は KCl 溶液を含む容器に保存した。

A1.6 各試薬の調製

各試薬の調製では本実験で共通して扱った試薬の調製の操作を下記に記載す [1]。本節に記述した試薬は調製後、保存可能な試薬である。また、試薬調製欄の Up to ~ mL ないし μL という表記は全量となるまで対象となる試薬にてメスアップしたことを意味する [例 : Up to 1000 mL]。

50% グリセロール

100% グリセロール (グリセリン [Wako]) に等量のミリ Q 水を加えた。

表記 : v/v%

保存 : 室温

10% グルコース

4 g の D(+)-グルコース (Wako) を 40 mL のミリ Q 水に溶解させることにより調製した。

表記 : w/v%

保存 : 4°C

5 M 塩化ナトリウム (NaCl)

292.2 g の NaCl (分子量 58.44、Wako) を 1,000 mL ミリ Q 水に溶解させた後、オートクレーブした。

保存 : 室温

1 M 塩化マグネシウム (MgCl₂)

101.7 g の MgCl₂·6H₂O (分子量 203.30、Wako) を 500 mL のミリ Q 水に溶解させた後、オートクレーブした。

保存 : 室温

3 M 酢酸ナトリウム (酢酸 Na)

123 g の酢酸 Na 無水和物 (分子量 82.03、Wako) を 500 mL のミリ Q 水に溶解させた後、オートクレーブした。

保存 : 室温

1 M 塩化カルシウム (CaCl₂)

55.5 g の CaCl_2 無水和物 (分子量 110.98、Wako) を 500 mL のミリ Q 水に溶解させた後、オートクレーブした。

保存：室温

1 M Tris-HCl pH6.5/pH7.5/pH8.0/pH8.5

121.1 g の Tris (分子量 121.2、Wako) を 400 mL のミリ Q 水に溶解させた後、HCl (Wako) を加え pH 調節後、ミリ Q 水にて 1000 mL までメスアップした。

使用 pH 範囲：pH = 7.1 ~ 8.9

保存：室温

1.5 M Tris-HCl pH8.8

181.6 g の Tris を 400 mL のミリ Q 水に溶解させた後、HCl を加え pH 調節後、ミリ Q 水にて 1000 mL までメスアップした。

使用 pH 範囲：pH = 7.1 ~ 8.9

保存：室温

0.5 M Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) pH8.0

186.1 g の $\text{EDTA} \cdot 2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (分子量 372.24、Wako) を 400 mL のミリ Q 水に溶解させた後、NaOH を加え pH 調節後、ミリ Q 水にて 1000 mL までメスアップした。

使用 pH 範囲：pH = 7.0 ~ 8.0

保存：室温

その他：重金属キレート剤、酵素の不活化

1 M HEPES pH7.0/pH8.0

23.83 g の HEPES (分子量 238.3、Wako) を 60 mL のミリ Q 水に溶解させた後、NaOH を加え pH 調節後、ミリ Q 水にて 100 mL までメスアップした。

使用 pH 範囲：pH = 7.0 ~ 8.2

保存：4°C

その他：生理的条件に近い

0.2 M リン酸緩衝液 pH 8.0

1. 31.21 g の NaH_2PO_4 二水和物 (分子量 156.01、Wako) を 1,000 mL のミリ Q 水に溶解させることにより 0.2 M NaH_2PO_4 に調製後、28.39 g の Na_2HPO_4

無水和物 (分子量 141.96、Wako) を 1,000 mL のミリ Q 水に溶解させることにより 0.2 M Na_2HPO_4 に調製した。

2. 試薬ビンに 250 mL の 0.2 M Na_2HPO_4 に調製を加え、pH 測定しながら 0.2 M NaH_2PO_4 を添加して pH 調節をした。

使用 pH 範囲 : pH = 5.8 ~ 8.0

保存 : 4°C

その他 : 雑菌などコンタミネーションに注意が必要

10% Sodium dodecylsulphate (SDS)

20 g の SDS (分子量 288.38、Wako) を 200 mL の滅菌水に溶解させた。

保存 : 室温

その他 : オートクレーブしない

10% Polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Tween 20)

20 mL の 100% Tween 20 (分子量 1,228、Wako) を 200 mL の滅菌水と混合した。

使用範囲濃度 : 0.01 ~ 1%

保存 : 4°C

その他 : タンパク質の保護

10 x SDS-PAGE 泳動緩衝液

Sample	調製分量	Final conc.
Tris	30.3 g	250 mM
Glycine (Wako)	144 g	1.92 M
SDS	10 g	1% SDS
ミリ Q 水	Up to 1000 mL	

1 x SDS-PAGE 泳動 Buffer として使用することで SDS 含有 Tris-Glycine Buffer pH 8.3 となる。

保存 : 室温

その他 : オートクレーブしない

Tris-EDTA (TE) 緩衝液

Sample	調製分量	Final conc.
--------	------	-------------

1 M Tris-HCl pH8.0	25 mL	10 mM
0.5 M EDTA pH8.0	1 mL	1 mM
ミリ Q 水	Up to 500 mL	

試薬は調製後、オートクレーブした。

保存：室温

その他：DNA を保存溶液

5 x Tris-Borate-EDTA (TBE)

Sample	調製分量
Tris	27 g
Borate (Wako)	13.75 g
0.5 M EDTA pH8.0	20 mL
ミリ Q 水	Up to 500 mL

試薬は調製後、オートクレーブした。

保存：室温

その他：電気泳動用緩衝液など

Tris-EDTA-Glycerol (TEG) 緩衝液

Sample	調製分量	Final conc.
1 M Tris-HCl pH8.0	25 mL	10 mM
0.5 M EDTA pH8.0	1 mL	1 mM
100% Glycerol	50 mL	10%
ミリ Q 水	Up to 500 mL	

試薬は調製後、オートクレーブした。

保存：4℃

その他：タンパク質溶液の希釈など

Luria-Bertani (LB) 培地

Sample	調製分量	
Tryptone (nacalai tesque)	5 g	1 g
Bacto Yeast Extract (nacalai tesque)	2.5 g	0.5 g
NaCl (Wako)	2.5 g	0.5 g

Agar (Wako)	-	1.5 g
ミリ Q 水	Up to 100 mL	

試薬は調製後、オートクレーブした。

LB 寒天培地の作製ではオートクレーブ後、少し熱い内にクリーンベンチにてシャーレに移した。

保存：4°C

Terrific Broth (TB) 培地

Sample	調製分量
Tryptone	12 g
Bacto Yeast Extract	24 g
Glycerol	8 mL
K ₂ HPO ₄	9.4 g
KH ₂ PO ₄	2.2 g
ミリ Q 水	Up to 500 mL

試薬は調製後、オートクレーブした。

保存：4°C

その他：栄養豊富な培地で、大腸菌の培養に使用

1000 x アンピシリン溶液

500 mg のアンピシリンナトリウム塩 (Ampicillin sodium salt、Wako) を 10 mL のミリ Q 水に溶解させた後、1.5 mL のマイクロチューブに 1 mL ごとにアンピシリン溶液を分注した。

保存：-20°C

その他：1 x アンピシリン溶液 (Amp) に希釈して使用した

1000 x カナマイシン溶液

500 mg のカナマイシン硫酸塩 (Kanamycin sulfate、Wako) を 10 mL のミリ Q 水に溶解させた後、1.5 mL のマイクロチューブに 1 mL ごとにカナマイシン溶液を分注した。

保存：-20°C

その他：1 x カナマイシン溶液 (Kan) に希釈して使用

1000 x クロラムフェニコール溶液

200 mg クロラムフェニコール (Chloramphenicol, Wako) を 10 mL の 100 % エタノールに溶解させた後、1.5 mL マイクロチューブに 1 mL ごとにクロラムフェニコール溶液を分注した。

保存：-20°C

その他：1 x クロラムフェニコール溶液 (Chl) に希釈して使用

1000 x テトラサイクリン溶液

200 mg の塩酸テトラサイクリン (Tetracycline, Wako) を 10 mL の 100% エタノールに溶解させた後、1.5 mL のマイクロチューブに 1 mL ごとにテトラサイクリン溶液を分注した。

保存：-20°C

その他：1 x テトラサイクリン溶液 (Tet) に希釈して使用

1 M Isopropyl 1-thio-β-D-galactoside (IPTG) 溶液

1 g の IPTG (分子量 238.3, Wako) を 4.2 mL の滅菌水に溶解させた後、1.5 mL のマイクロチューブに 1 mL ごとに IPTG 溶液を分注した。

保存：-20°C

その他：0.1 ~ 1 mM IPTG 溶液に希釈して使用

CBB 染色液

Sample	調製分量	Final conc.
CBB R-250 (Wako)	1 g	0.25%
100% メタノール (Wako)	20 mL	10%
100% 酢酸 (Wako)	30 mL	10%
ミリ Q 水	Up to 500 mL	

保存：室温

その他：SDS-PAGE のポリアクリルアミドゲル染色用

10 x Phosphate buffered saline (PBS) (-) pH7.5

Sample	調製分量	Final conc.
NaCl (Wako)	24 g	1.37 M
KCl (Wako)	0.6 g	27 Mm

Na ₂ HPO ₄ 無水和物 (Wako)	3.3 g	100 Mm
KH ₂ PO ₄ (Wako)	0.6 g	18 mM
ミリ Q 水	Up to 300 mL	

試薬を混合した後、オートクレーブした。

保存：4℃

その他：ミリ Q 水で 10 倍に希釈し、1 x PBS (-) として使用した。

マグネシウムイオンないし、カルシウムイオンの有無にて PBS (-)か PBS (+)かに表記が変わる。

10 mg/mL Glucose oxidase

Sample	調製分量	Final conc.
50,000 units glucose oxidase (Wako)	50 mg (100 units/mg)	10 mg/mL
1 M Tris-HCl pH8.0	50 µL	10 mM
50 mM EDTA	100 µL	1 mM
100% Glycerol	2.5 mL	50%
滅菌水	Up to 5 mL	

試薬は調製後、1.5 mL のマイクロチューブに 500 µL ごとに glucose oxidase 溶液を分注した。

保存：-20℃

その他：glucose oxidase は 100 units/mg である (Wako)。

1.8 mg/mL Catalase

Sample	調製分量	Final conc.
100 mg Catalase (Wako)	100 mg	1.8 mg/mL
1 M Tris-HCl pH8.0	550 µL	10 mM
50 mM EDTA	1.11 mL	1 mM
100% Glycerol	27.78 mL	50%
滅菌水	Up to 55.5 mL	

試薬は調製後、1.5 mL のマイクロチューブに 1 mL ごとに Catalase 溶液を分注した。

保存：-20℃

Salt-magnesium (SM) Phage Buffer

Sample	調製分量	Final conc.
NaCl	2.9 g	100 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g	8 mM
1 M Tris-HCl pH7.5	25 mL	50 mM
2% ゼラチン	2.5 mL	0.1%
ミリ Q 水	Up to 500 mL	

試薬は調製後、オートクレーブをかけた。

保存：室温ないし 4°C

NZYMM 寒天培地

Sample	調製分量	Final conc.
NZ アミン	1 g	1%
Yeast Extract	0.5 g	0.5%
NaCl	0.5 g	0.5%
1 M MgCl ₂	1 mL	10 mM
Maltose	0.2 g	0.2%
Agar	1.5 g	1.5%
NaOH	400 µL	pH 調節
ミリ Q 水	Up to 100 mL	

試薬は調製後、オートクレーブをかけた。シャーレに寒天を注ぎ、蒸らした後、4°Cで保存した。

NZYMM-Top-agar

Sample	調製分量	Final conc.
NZ アミン	1 g	1%
Yeast Extract	0.5 g	0.5%
NaCl	0.5 g	0.5%
1 M MgCl ₂	1 mL	10 mM
Maltose	0.2 g	0.2%
Agar	0.75 g	0.75%
NaOH	400 µL	pH 調節
ミリ Q 水	Up to 100 mL	

試薬は調製後、オートクレーブをかけた。

保存：4°C

NZYM Medium 液体培地

Sample	調製分量	Final conc.
NZ アミン	5 g	1%
Yeast Extract	2.5 g	0.5%
NaCl	2.5 g	0.5%
1 M MgCl ₂	5 mL	10 mM
5 N NaOH	400 μL	pH 調節
ミリ Q 水	Up to 500 mL	

試薬は調製後、オートクレーブをかけた。

保存：4°C

A1.7 参考文献

- [1] 田村隆明著、バイオ試薬調製ポケットマニュアル：欲しい溶液・試薬がすぐに作れるデータと基本操作、羊土社、東京、2008

§ Appendix 2 デザインした合成オリゴヌクレオチドの一覧表

本研究にてデザインした合成オリゴヌクレオチドの一覧表である。

λ_Rv_primer 48478-48502	5'-CGTAACCTGTCCGATCACCGGAAAG-3'	25 mer
λ_Rv_primer 38772-38795	5'-AAGCAGCATATTTGATAGTCTGGCG-3'	25 mer
λ_Rv_primer 29068-29092	5'-GCGGAGACTTTGCGATGTACTTGAC-3'	25 mer
λ_Rv_primer 19364-19388	5'-CCGTCTTACGGTAATCCATTGTACT-3'	25 mer
λ_Rv_primer 9660-9684	5'-TGACGGTAATTTCTGCAACCGCAGC-3'	25 mer
λ_Fw_primer 48478-48502	5'-CTTTCGGGTGATCCGACAGGTTACG-3'	25 mer
λ_Fw_primer 993-1017	5'-GAGCATAAGCAGCGCAACACCCTTA-3'	25 mer
λ_Fw_primer 47993-48017	5'-ACACGCAGTCTGTCACTGTCAGGAA-3'	25 mer
λ_Fw_primer 47508-47531	5'-GTTTCAATCTGGTCTGACCTCCTT-3'	25 mer
λ_Fw_primer 5013-5037	5'-GTGCTGCGCTGGAGAAACAGGGTGT-3'	25 mer
λ_Fw_primer 9988-10012	5'-CCACGGAGGCAATTTCTCATGCTGA-3'	25 mer
λ_右末端 Fw_biotin 1 ; 48502~	5'-Biotin-CGTAGTGTCTATCT	15 mer
λ_右末端 Rv_biotin 2 ; 48502~	5'-GGGCGGCGACCTAGATAGGACACTACG-Biotin-TEG-3'	27 mer
λ_左末端 Fw_biotin 1 ; ~1	5'-Biotin-GTACTCCAGACTTAGAAGATGAT	23 mer
λ_左末端 Rv_biotin 2 ; ~1	5'-AGGTCGCCGCCATCATCTTCTAAGTCTGGAGTAC-Biotin-TEG-3'	35 mer
λ_右末端 Fw_thiol 1 ; 48502~	5'-Thiol-CGTAGTGTCTATCT	15 mer
λ_右末端 Rv_thiol 2 ; 48502~	5'-GGGCGGCGACCTAGATAGGACACTACG-Thiol-TEG-3'	27 mer
λ_右末端_cos site_fill-in	5'-GGGCGGCGACCT-3'	12 mer
λ_左末端_cos site_fill-in	5'-AGGTCGCCGCC-3'	12 mer
E.coli_oriC_EcoR I	5'-CCGGAATTCGGATTGCCTCGCATAACGCGGT-3'	32 mer
E.coli_oriC_Xba I	5'-GCTCTAGAGCGACACCTTTTGTGGGGCTAT-3'	30 mer
pcDNA3.1A_POLD_EcoRI	5'-CCGGAATTCGGATGGATGGCAAGCGGCGG-3'	30 mer
pcDNA3.1A_POLD_XhoI	5'-CCGCTCGAGCGGCCAGGCCTCAGGTCCAGG-3'	30 mer
RFC1_N555_HindIII	5'-CCCAAGCTTGGGTTCAAGGAGCAGGTGGCT-3'	30 mer
RFC1_N555_XhoI	5'-CCGCTCGAGCGGTTTCTTCAACTTTTTCCTTTTCC-3'	36 mer
Rfc2p40_HindIII	5'-CCCAAGCTTGGGATGGAGGTGGAGGCCG-3'	28 mer
Rfc2p40_XhoI	5'-CCGCTCGAGCGGACTGGCCACCGGGGC-3'	27 mer

Rfc4p37_HindIII	5'-CCCAAGCTTGGGATGCAAGCATTTCCTTAAAGGTA-3'	34 mer
Rfc4p37_XhoI	5'-CCGCTCGAGCGGACAATTCTGAGATAACTGCTGC-3'	34 mer
Rfc5p36_HindIII	5'-CCCAAGCTTGGGATGGAGACCTCAGCACTCAA-3'	32 mer
Rfc5p36_XhoI	5'-CCGCTCGAGCGGGGCCTCTGCAACAATCAG-3'	30 mer
DsRed_HindIII_F	5'-CCCAAGCTTGGGCGATGGACAACACCGAGGACGTC-3'	37 mer
DsRed_XhoI_R	5'-CCGCTCGAGCGGCTGGGAGCCGGAGTGGCG-3'	30 mer
eYFP_HindIII_F	5'-CCCAAGCTTGGGCGATGGTGAGCAAGGGCG-3'	30 mer
eYFP_XhoI_R	5'-CCGCTCGAGCGGCTTGACAGCTCGTCCA-3'	29 mer
LAMINB2ori_EcoR1_F	5'-CCGGAATCCGGAGCCTGCACGCGGCAG-3'	28 mer
LAMINB2ori_XbaI_R	5'-GCTCTAGAGCCGTCGGAGGCTCACTAG-3'	27 mer
T4Lig_KpnI_F	5'-GGGGTACCCCGATGATTCTTAAAATTCTGAACGAAATAGC-3'	40 mer
T4Lig_NcoI_R	5'-CATGCCATGGCATGTAGACCAGTTACCTCATGAAAATC-3'	38 mer
SSB-Fw (BamH I)	5'-CGCGGATCCGCGATGGCCAGCAGAGGCGT -3'	29 mer
SSB-Rv (EcoR I)	5'-CCGGAATCCGGGAACGGAATGTCATCATC -3'	30 mer

研究業績

査読付き国際学術誌

1. **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, vol. 87, pp. 3490-3497, 2015
2. **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, Elsevier, vol. 457, pp. 24-30, 2014
3. **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, Molecular Diversity Preservation International (MDPI), vol. 14, pp. 5174-5182, 2014
4. **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, vol. 23, pp. 635-640.
5. Oshige, M., Yumoto, K., Miyata, H., **Takahashi, S.**, Nakada, M., Ito, K., Tamegai, M., Kawaura, H., Katsura, S.
Immobilization of His-Tagged Proteins on Various Solid Surfaces Using NTA-Modified Chitosan.
Open Journal of Polymer Chemistry, Scientific Research Publishing Inc., vol. 3, pp. 6-10, 2013.
6. Miyata, H., Yumoto, K., Ito, K., Sasahara, M., Kawaura, H., Oshima, N., **Takahashi, S.**, Oshige, M., Katsura, S.

Immobilization of His-tagged Proteins through Interaction with L-cysteine Electrodeposited on Modified Gold Surfaces.

Key Engineering Materials, Trans Tech Publications, vol. 596, pp. 219-223, 2013.

査読無し国際・国内学術誌 (紀要・論文集なども含む)

1. **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.
Proceedings of the 11th International Workshop on Radiation Effects on Semiconductor Devices for Space Applications (RASEDA) & the 7th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (AMDE)., The 11th International Workshop on RASEDA & The 7th International Conference on AMDE., vol. 1, pp. 259-262., 2015.
2. Hayashi, K., Kishi, K., **Takahashi S.**, Oshige, M., Katsura, S.
Development of Immobilization Technique for Circular DNA.
Proceedings of the 11th International Workshop on Radiation Effects on Semiconductor Devices for Space Applications (RASEDA) & the 7th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (AMDE), The 11th International Workshop on RASEDA & The 7th International Conference on AMDE., vol. 1, pp 243-246., 2015.
3. Hatakeyama, T., Shioda, C., Takisawa, Y., **Takahashi S.**, Oshige, M., Katsura, S.
Development of a Protein Refolding Method Based on Application of DC Electric.
Proceedings of the 11th International Workshop on Radiation Effects on Semiconductor Devices for Space Applications (RASEDA) & the 7th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (AMDE), The 11th International Workshop on RASEDA & The 7th International Conference on AMDE., vol. 1, pp 263-266., 2015.
4. 宮田英史、川浦啓希、大島伸紀、**高橋俊介**、大重真彦、桂進司
DNA分子の高効率固定化法の開発
2013年度静電気学会春期講演会論文集、静電気学会、vol.1、pp 65-68、2013
5. 宮田英史、石黒勇斗、大島伸紀、内海歩、**高橋俊介**、大重真彦、桂進司
高電圧パルスを用いた新規 *in vivo* プロテインアレイの開発
静電気学会講演論文集 2013、静電気学会、vol.1、pp 257-260、2013

国際会議における発表

1. **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 (Japan)., November 2015.
2. Hayashi, K., Kishi, K., **Takahashi S.**, Oshige, M., Katsura, S.
Development of Immobilization Technique for Circular DNA.
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, P8-34., kiryu (Japan)., November 2015.
3. Hatakeyama, T., Shioda, C., Takisawa, Y., **Takahashi S.**, Oshige, M., Katsura, S.
Development of a Protein Refolding Method Based on Application of DC Electric.
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, P8-40, kiryu (Japan)., November 2015.
4. **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 & MADE 2014), Poster presentation, P041 Kiryu (Japan), December 2014.
5. Hayashi, K., **Takahashi, S.**, Miyata, H., Oshige, M., Katsura, S.
Development of Immobilization Technique for Circular DNA.
The 1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation

- and the 6th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (GUMI & MADE 2014), Poster presentation, P042 Kiryu (Japan), December 2014.
6. Miyata, H., Ishiguro, Y., Utsumi, A., Kawachi, O., **Takahashi, S.**, Oshige, M., Katsura, S
A New Fabrication Method of *in vivo* Protein Array with High Voltage Pulse Application.
The 1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation and the 6th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (GUMI & MADE 2014), Poster presentation, P043 Kiryu (Japan), December 2014.
 7. **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 (Japan), 2013.
 8. Miyata, H., Oshima, N., Suzuki, T., Ishiguro, Y., Utsumi, A., Kawachi, O., **Takahashi, S.**, Oshige, M., Katsura, S.
A New Fabrication Method of Protein Array with High Voltage Pulse Application.
The 5th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (AMDE), Poster presentation, P22, Kiryu (Japan), 2013.
 9. Okada, J., **Takahashi, S.**, Miyata, H., Oshige, M., Katsura, S.
Development of Immobilization Technique for Circular DNA.
The 4th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (AMDE), Poster presentation, P05, Kiryu (Japan), 2012.
 10. Miyata, H., Yumoto, K., Itoh, K., Sasahara, M., Kawaura, H., Oshima, N., Suzuki, T., Ishiguro, Y., Utsumi, A., Kato, C., **Takahashi, S.**, Oshige, M., Katsura, S.
Immobilization of His-tagged Proteins through Interaction with L-cysteine Electrodeposited on Modified Gold Surfaces.
The 4th International Conference on Advanced Micro-Device Engineering (AMDE), Poster presentation, P06, Kiryu (Japan), 2012.

国内学会・シンポジウム等における発表

1. **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 (兵庫)、2015 年 12 月
2. **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 (兵庫)、2015 年 12 月
3. 林一貴、岸一希、**高橋俊介**、大重真彦、桂進司
環状 DNA 固定化技術を利用したタンパク質発現法および固定化法の開発
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、1P0880、神戸 (兵庫)、2015 年 12 月
4. 馬場淑行、津田裕太、**高橋俊介**、川上友則、大重真彦、桂進司
バイオマス由来の有機物分解を目指した白金ナノ粒子触媒層の調製法
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、1P0883、神戸 (兵庫)、2015 年 12 月
5. 渡辺祥弘、**高橋俊介**、大重真彦、桂進司
コドン最適化によるリグニン分解酵素リグニンペルオキシダーゼの発現システムの構築
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、1P0884、神戸 (兵庫)、2015 年 12 月
6. 畠山拓也、塩田千夏恵、滝沢勇樹、**高橋俊介**、大重真彦、桂進司
電界を用いたタンパク質リフォールディング技術の開発
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、2P0416、神戸 (兵庫)、2015 年 12 月
7. **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 (群馬)、2015 年 11 月

8. 畠山拓也、塩田千夏恵、滝沢勇樹、高橋俊介、大重真彦、桂進司
電界を用いたタンパク質リフォールディング技術の開発
化学工学会群馬大会 2015、口頭発表、E 101、桐生（群馬）、2015年11月
9. 林一貴、岸一希、高橋俊介、大重真彦、桂進司
環状 DNA 固定化技術の開発
化学工学会群馬大会 2015、口頭発表、E 115、桐生（群馬）、2015年11月
10. 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（静岡）、2015年10月
11. 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（静岡）、2015年10月
12. 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、名古屋（愛知）、2015年7月
13. 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、横浜（神奈川）、2014年11月
14. 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、横浜（神奈川）、2014年11月
15. 碓井智弘、高橋俊介、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
蛍光 T4 DNA Ligase の 1 分子解析の試み

- 第 37 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2P-0151、横浜（神奈川県）、2014 年 11 月
16. 石黒勇登、宮田英史、内海歩、渋谷元規、高橋俊介、大重真彦、桂進司
高電圧パルスを用いたタンパク質固定化技術の開発
第 37 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、3P-0990、横浜（神奈川県）、2014 年 11 月
17. 内海歩、宮田英史、石黒勇登、高橋俊介、大重真彦、桂進司
電界を用いた新規菌体固定化・培養法の開発
第 37 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、3P-0989、横浜（神奈川県）、2014 年 11 月
18. 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（兵庫県）、2014 年 7 月
19. 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（兵庫県）、2013 年 12 月
20. 津田裕太、宮田英史、高橋俊介、川上友則、大重真彦、桂進司
バイオマス由来の有機物分解を目指した白金ナノ粒子触媒の比較検討
第 36 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、1P-0997、神戸（兵庫県）、2013 年 12 月
21. 大島伸紀、宮田英史、内海歩、石黒勇斗、渋谷元規、高橋俊介、大重真彦、桂進司
His-tag 融合タンパク質固定化のための金薄膜表面修飾法の開発
第 36 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2P-0979、神戸（兵庫県）、2013 年 12 月
22. 宮田英史、川浦啓希、大島伸紀、渡辺祥弘、高橋俊介、大重真彦、桂進司
DNA 分子の高効率固定化法の開発
第 36 回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2P-0954、神戸（兵庫県）、2013 年

12月

23. 宮田英史、石黒勇斗、大島伸紀、内海歩、高橋俊介、大重真彦、桂進司
高電圧パルスを用いた新規 *in vivo* プロテインアレイの開発
2013年度(第37回) 静電気学会全国大会、口頭発表、11aC-15、千葉(千葉)、
2013年9月
24. 宮田英史、川浦啓希、大島伸紀、高橋俊介、大重真彦、桂進司
DNA分子の高効率固定化法の開発
2013年度(第14回) 静電気学会春期講演会、口頭発表、2a-6、東京(本郷)、
2013年3月
25. 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(福岡)、2012年
12月
26. 岡田淳、高橋俊介、宮田英史、大島伸紀、大重真彦、桂進司
環状DNA分子の固定化技術開発
第35回日本分子生物学会年会、ポスター発表、1P-0648、福岡(福岡)、2012年
12月
27. 笹原美樹、宮田英史、高橋俊介、大重真彦、桂進司
微生物代謝反応の電気化学的検出法の開発
第35回日本分子生物学会年会、ポスター発表、1P-0673 福岡(福岡)、2012年
12月
28. 川浦啓希、宮田英史、大島伸紀、高橋俊介、大重真彦、桂進司
DNA分子の高効率固定化法の開発
第35回日本分子生物学会年会、ポスター発表、1P-0649、福岡(福岡)、2012年
12月
29. 渡邊拓己、宮田英史、高橋俊介、大重真彦、桂進司
バイオマス由来の有機化合物分解を目指した金ナノ粒子の比較検討
第35回日本分子生物学会年会、ポスター発表、2P-0808、福岡(福岡)、2012年
12月
30. 宮田英史、川浦啓希、大島伸紀、内海歩、石黒勇斗、加藤千紗都、高橋俊介、大
重真彦、桂進司
高電圧パルスを用いた新規プロテインアレイ作成法の開発
第35回日本分子生物学会年会、ポスター発表、3P-0773、福岡(福岡)、2012年

12月

31. 村上 太滝、川崎祥平、高橋俊介、大重真彦、栗田弘史、松浦俊一、水野武、水野彰、桂進司

開発した2種類の1本鎖DNA可視化方法の比較検討

第34回日本分子生物学会年会、ポスター発表、1P-0779、横浜（神奈川）、2011年12月13日

受賞歴、職歴などその他の重要事項

■ 受賞歴

1. 化学工学会、奨励賞、DNA および DNA 代謝酵素の 1 分子蛍光観察による動態解析、2015 年
2. 群馬大学工業会、群馬大学工業会奨励賞、2014 年
3. 静電気学会、優秀賞、DNA の高効率固定化法の開発、2013 年

■ 競争的研究資金獲得実績

1. 日本学術振興会特別研究員奨励費、DNA および DNA 代謝酵素の 1 分子蛍光観測による動態解析、研究代表者、2015 年
2. 群馬大学高度人材育成センター、平成 26 年度若手研究者研究助成、DNA 形態制御技術を用いた 1 分子レベルでの DNA 複製開始反応のリアルタイム観測、研究代表者、2014 年

■ 資格

1. 公益社団法人化学工学会、化学工学修習士
2. 文部科学省、高等学校教諭一種免許（工業）

■ 職歴

1. 平成 27 年度 日本学術振興会特別研究員 DC2
2. 平成 26 年度 群馬県桐生市サイエンスドクター事業 中学校派遣型科学インストラクター

■ その他

1. 平成 29 年度採用分特別研究員及び海外特別研究員の募集に関する説明会、群馬大学、講演者
2. 一般財団法人 林レオロジー記念財団、平成 26 年度奨学生
3. 独立行政法人日本学生支援機構、大学院(修士課程)第一種奨学金全額返還免除者
4. 群馬大学 大学院工学研究科博士前期課程 環境プロセス工学専攻、学位授与式代表者、2014 年
5. 公益財団法人 日揮・実吉奨学会、日本人向け給与奨学金、平成 25 年度給与奨学生
6. 公益社団法人日本技術士会、修習技術者（化学部門）

謝辞

本研究に於きまして主指導教員である群馬大学大学院 理工学府研究科 環境創生理工学部門 桂進司 教授および指導をご担当頂きました大重真彦 准教授には、6年におわたる貴重かつ多大なご指導、ご助言を頂きました。先生方には研究を遂行していくうえで、最良の研究環境を与えて頂くとともに、他大学との関係も積極的に取り次いで頂きました。また、幾度もの論文や学会など研究成果を発表する機会を与えて頂きましたこと、ここに感謝の意を表するとともに厚く御礼申し上げます。

博士審査の主査をお引き受け頂くとともにご指導、ご鞭撻を賜りました大嶋孝之教授のご厚意に心から深く謝意を表します。また、中川紳好 教授、渡邊智秀 教授、箱田優 准教授には副査の労を頂き、ご指導、ご鞭撻を賜りましたこと、深く感謝の意を表します。

本研究を遂行するにあたり、産業技術総合研究所 材料・化学領域化学プロセス研究部門 主任研究員 松浦俊一 博士および豊橋技術科学大学 環境・生命工学 (系) 栗田弘史 助教には幾度となく貴重なご意見、ご指導を賜りました。また、励ましのお言葉を頂きましたこと、心より深く感謝申し上げます。同じく、豊橋技術科学大学 環境・生命工学 (系) 水野彰 教授には貴重なご意見と励ましのお言葉を頂きましたこと、心より深く感謝申し上げます。

DNA 複製などの研究を遂行するのにあたり、理化学研究所 今本細胞核機能研究室 専任研究員 水野武 博士ならびに学習院大学 理学部生命科学科 花岡文雄 教授には実験試薬ならびに大変貴重なご指導、ご鞭撻を賜りましたこと、ここに深く感謝の意を表するとともに厚く御礼申し上げます。

本研究室を通してともに学び、実験の準備などご協力頂きました群馬大学大学院 理工学府研究科 環境創生理工学専攻 マイクロプロセス研究室 (桂・大重研究室) 卒研究生・院生の方々に厚く御礼申し上げます。6年と半年にもわたり在籍期間の大半を過ごした桂・大重研究室では、先輩・後輩に恵まれ有意義な研究生活を送ることができましたこと、誠に感謝申し上げます。

群馬大学大学院 理工学府研究科 環境創生理工学部門 谷野孝徳 助教、石飛宏和 助教、松井雅義 助教の先生方には研究のみならず、貴重なご意見と励ましのお言葉を頂いたこと、心より深く感謝申し上げます。

最後に、辺境の地より陰ながら見守り、支え続けてくれた両親および祖母に深く感謝しています。