



Title	Development of a molecular reel for mechanical manipulation of single-molecule DNA
Author(s)	You, Huijuan
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/27580
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ユウ フェイジエン You Huijuan (游 慧娟)
博士の専攻分野の名称	博 士 (工学)
学 位 記 番 号	第 2 5 7 1 3 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 24 年 11 月 22 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科生命先端工学専攻
学 位 論 文 名	Development of a molecular reel for mechanical manipulation of single-molecule DNA (DNA を巻き取る「分子リール」の開発 : DNA の曲げを操る新手法)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 紀ノ岡 正博 (副査) 教 授 大竹 久夫 教 授 原島 俊 教 授 福崎 英一郎 教 授 渡邊 肇 教 授 福井 希一 教 授 村中 俊哉 教 授 金谷 茂則 教 授 藤山 和仁 教 授 仁平 卓也 教 授 永井 健治 東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻教授 野地 博行

論 文 内 容 の 要 旨

Chapter 1 Introduction

Many significant protein-DNA interactions involve sharp bending and looping of double-stranded DNA (dsDNA) with curvature radius of 2–20 nm. A remarkable example is the histone-DNA complex in eukaryotic cells; genomic DNA is wrapped around histone complexes with radii of 4.5 nm. The mechanistic properties of the histone-DNA complex are thought to be involved in the control of transcription activity. Most transcription factors also deform DNA by bending or looping DNA strands to regulate gene expression. DNA condensation occurs in extremely small viral capsids (radius of 15–50 nm) and is another example involving extensive winding or bending of DNA. Thus, revealing the mechanical properties of DNA is crucial for understanding the molecular mechanisms of DNA-protein systems, and has been a focal issue in the physicochemical research on DNA.

Mechanical property of DNA has been described by the worm-like chain (WLC) model as a rod that is smoothly bent by thermal energy. The resistance of DNA to thermal bending is characterized by single parameter called persistence length (L_p , 40–50 nm). However, the WLC model is refuted when DNA is tightly bent and its curvature diameter is smaller than the L_p . Recent experiments have suggested that the breakdown of the WLC model for tightly bent DNA might be caused by deformations such as kinks or melting bubbles, but those findings are still controversial.

Fundamental aspects of DNA bending mechanics have been studied using biochemical bulk measurements and by pioneering single-molecule DNA stretching experiments. However, previous measurements were based on the analysis of thermal bending of DNA, tight bending to curvature radius of 2–20 nm was rarely occurred thermally. Therefore, methodology that controls the bending curvature of DNA is required to explore the micromechanics of tightly bent DNA.

Chapter 2: Material and methods

Chapter 2 focuses on the construction of the experimental system. Conventional mechanical manipulation of DNA was limited to large-scale attempts, such as stretching or twisting DNA. Bending or looping of DNA on small scales has been difficult to achieve. The uniqueness of our construction is that the rotary motor protein F₁-ATPase was used as a molecular reel to wind DNA. In this chapter, F₁-ATPase structure and single-molecule manipulation of F₁ was introduced first. As a molecular reel for DNA winding, F₁ has an ideal size; the radius of the central shaft of the γ subunit is ~1 nm. Later, optical tweezers technique for applying force to DNA was introduced. Finally the assembly methods of DNA and F₁-ATPase and beads was introduced.

Chapter 3: Persistence length of DNA measured by stretching experiment

In this chapter, the force-extension curve for single-molecules dsDNA was measured. The persistence length of dsDNA at small bending condition was measured based on the fit of force-extension curve. Verification of the experimental system was one purpose of this experiment, since the persistence length was sensitive to buffer conditions such as ion strength and Mg²⁺ concentration. Another purpose was to correct the extension of wound dsDNA in winding experiment. We obtained a persistence length of 48 nm, which is consistent with previous measurement.

Chapter 4: Persistence length of DNA measured by winding experiment

The molecular reel was built using F₁, a magnetic bead, and the Fab fragment of the anti-digoxigenin (DIG) antibody. The anti-DIG antibody was covalently cross-linked to the γ subunit of F₁ and connected to the magnetic bead through biotin-streptavidin interaction. The complex of the γ subunit, anti-DIG Fab fragment, and the magnetic bead acted as a rotor while the $\alpha_3\beta_3$ stator was immobilized on the glass surface. DNA molecules of 8.7 kb labelled with DIG and biotin at distal 5' ends were grabbed through the anti-DIG Fab fragment of the reel and a streptavidin-coated polystyrene bead that was trapped using optical tweezers. By manually rotate the magnetic bead using a magnetic tweezers system, dsDNA was wound around the molecular reel.

The bending stiffness of dsDNA was determined from the winding tension (0.9–6.0 pN) and the diameter of the wound loop (21.4–8.5 nm). Our results were in good agreement with the conventional WLC model and a persistence length of 54 ± 9 nm was estimated. This value agrees well with persistence length measured from stretching experiment (~48 nm). This agreement suggests that sharply bent dsDNA retains the same mechanical properties as dsDNA in the relaxed state, implying that deformation of dsDNA, such as local melting or kinking, does not occur in the present condition.

Chapter 5: General conclusions

The data of this study was analyzed with other non-harmonic models for comparisons with WLC model. The data fit better with WLC model than other models. The potential applications of our experimental system are also discussed, such as sequence-dependent bendability of dsDNA and the effect of dsDNA topology on the affinity of DNA-associating proteins. Our molecular reel system is expected to be applicable for the elucidation of the molecular mechanism of DNA-associating proteins on highly bent dsDNA strands.

論文審査の結果の要旨

DNA は生命の遺伝情報が刻まれたヒモ状の高分子であり、細胞の中では非常にコンパクトに折りたたまれている。細胞内で DNA を折りたたまれた状態に維持することは、DNA の保存や遺伝子の発現スイッチを制御する上で重要である。遺伝子スイッチング機構を理解するには、DNA の曲げ弾性の研究は重要である。本論文では、分子ヒモである DNA を巻き取る「分子リール」を開発して、DNA の曲げに必要な具体的な力とエネルギーを明らかにした。

第 1 章においては、研究の背景、先行研究における問題点について紹介してある。DNA の硬さを記述するもっとも一般であるミミズ鎖 (Worm-like chain) モデルは持続長 Lp (persistence length) というパラメーターによって特徴付けられている。持続長 Lp はフィラメントの向きの自己関数係数である。従来のバルクの実験と 1 分子 DNA の伸張実験の結果はミミズ鎖モデルと一致している。しかしながら、生体内、ヒストンタンパク質と転写因子が積極的に DNA を数~10 数ナノメートルの曲率半径に折り曲げている。今まで、DNA をきつく曲げる方法がないから、数~10 数ナノメートルの曲率半径範囲ではミミズ鎖モデルの正当性はまだ検証されていない。

第 2 章においては、実験の手法を紹介してある。具体的に 1) 分子リールとして使った回転分子モーター F₁-ATPase。2) 力学操作のための光ピンセット。3) DNA を F₁ モーターに固定する方法を紹介してある。

第 3 章においては、一分子 DNA の伸長実験によって、DNA の力-伸長曲線 (force-extension curve) が測定された。この実験によって、DNA の持続長 Lp を求めた。この値は長い DNA が熱エネルギーによって曲がれた平均的な性質を示している。

第 4 章においては、DNA を巻き取る実験によって、DNA を直径 8.5~20 ナノメートルのループ状に曲げるのに必要な力 (0.9~6.5 ピコニュートン) を直接計測する実験を行っている。この結果はミミズモデルによくフィットして、さらにここで求めた Lp の値が第 3 章で測定した Lp が同じ範囲であることから、DNA がきつく曲げられた時の弾性エネルギーもミミズ鎖モデルと一致することがわかった。

第 5 章においては、本研究の意義、今後の展望について議論している。今回の実験の意義が、DNA 結合タンパク質が DNA を曲げるのに必要な力とエネルギーを明らかにした。その結果、一部の DNA-タンパク質複合体が形成する時の結合しやすさ、安定性などの問題をエネルギー的観点から再考が必要であることが示された。このように、今回の研究は、遺伝子スイッチングに関するエネルギー論の実験的・理論的な基礎の一部を確立した。さらに、今回開発した分子リールは DNA 分子の 1 分子操作、DNA のマイクロメカニクスの研究に新たな道具を提供している。DNA の配列と曲げやすさには相関があり、遺伝子スイッチングに関係するとの説がある。今回開発したシステムを応用して、DNA の配列と曲げやすさの関係を検証する。また遺伝子のスイッチのオン/オフをになう DNA 結合タンパク質子は特定の曲率半径を持つ DNA に結合しやすいと言われている。本計測システムと、DNA 結合タンパク質 1 分子イメージング技術を併用すれば、この点も直接計測することが可能である。本研究は細胞の遺伝子スイッチング機構の解明に重要な意義があり、方法論としても貢献している。

よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。