液中動作 FM-AFM による真核生物 DNA 複製の初期過程イメージング

Initiation of eukaryotic DNA replication imaged by FM-AFM in liquids

京大院エ¹,国立遺伝研²,京大白眉セ³

[°]木南 裕陽 ¹,日詰 光治 ²,荒木 弘之 ²,小林 圭 ^{1,3},山田 啓文 ¹

Dept. of Electronic Sci. & Eng., Kyoto Univ.¹, National Institute of Genetics², The Hakubi Center, Kyoto Univ.³

^oH. Kominami¹, K. Hizume², H. Araki², K. Kobayashi^{1,3}, H. Yamada¹

E-mail: h.kominami@piezo.kuee.kyoto-u.ac.jp

【はじめに】近年、液中環境下における生体分子の観察手法として原子間力顕微鏡 (Atomic force microscopy :AFM) が幅広く用いられている。われわれは周波数変調 (Frequency modulation: FM) AFM によりナノスケール分解能でのイメージングを実現し、plasmid DNA の2 重らせん構造の高分解能観察に成功している[1]。今回、次の段階として DNA-タンパク質複合体に注目し、その中でも真核生物 DNA の複製初期過程を対象としてイメージングを行った。複製の初期過程では ORC (Origin recognition complex) と呼ばれるタンパク質複合体が DNA と結合し複製開始点を決定し、その後、Cdc6、Cdt1、ヘリカーゼである MCM (Minichromosome maintenance) 複合体が結合し pre-RC を形成することが知られている (図 1)。大気中における DNA と ORC の結合の観察は既に報告されている[2]が、より生理的な状態に近い溶液中での観察報告はない。本発表では DNA と pre-RC を構成するタンパク質との複合体を液中環境下で観察した結果について報告する。

【実験方法と結果】試料として、1.4 kbp もしくは 1.9 kbp の DNA と ORC を用いた。DNA と ORC を反応に必要な物質 (ATP および MgCl₂) を含む溶液に加え、30℃で1時間静置することで容器内 において反応させた。DNA に ORC を結合させた後に、0.1% グルタルアルデヒドを含む 50 mM HEPES-K 溶液 (pH 7.6) を用いて適度に希釈をするとともに、室温で 30 分静置することで DNA と ORC の架橋固定を行った。作製した試料をへき開したマイカ基板上へ滴下し、5 分間静置した後 に観察溶液 (50 mM NiCl₂) を用いて5 回リンスを行い、液中 FM-AFM 観察を行った。図 2 に DNA と ORC が結合している様子を観察した液中 FM-AFM 像を示す。マイカ基板上に吸着した DNA の 側面に ORC が存在しているが、これは結合もしくは解離の途中の遷移的な状態でグルタルアルデ ヒド固定されたものが検出されている可能性が考えられる。また、図 3 に高分解能観察を行った 結果を示す。6 量体である ORC の凹凸を明瞭に可視化することに成功し、若干 ORC のサブユニットが解離している様子が観察されているものの、DNA 上に ORC が結合しており Cdc6 が結合する くぼみが DNA 側に向いている様子が検出された。また、ORC 上部をスキャンする際に探針が引 っかかるような挙動を示しており、これは ORC のサブユニットの中に自由度の高いドメインが存 在しているためと考えられる。



図 2: DNA と反応途中である ORC の液 中 FM-AFM 像 (50 mM NiCl₂中観察). インセット: コントラスト調整後. 図 3: DNA に結合した ORC の液中 FM-AFM 高分解能像 (50 mM NiCl₂ 中観察).

[1]S. Ido et al, ACS Nano 7, 1817 (2013). [2]K. Hizume et al, Genes Cells 18, 764 (2013).

ル図.