

ゲノムスケールの DNA 設計・合成による細胞制御技術の創出
2019 年度採択研究者

2021 年度 年次報告書

寺川 剛

京都大学大学院理学研究科
助教

DNA カーテンによるエピゲノム修飾継承の一分子計測

§ 1. 研究成果の概要

本研究の目的は、複製フォークの通過に伴って解離したヒストンタンパク質を、一分子蛍光顕微鏡観察することである。その観察によって、エピゲノム修飾の継承のための最初のステップであるヒストンリサイクルの分子機構を探究する。申請者らはこれまでに、複製装置を構成する 18 種類のタンパク質の精製を終えた。申請者らはこれまでに、複製装置を構成する 18 種類のタンパク質の精製を終えた。また、それらのうち Orc1-6、Mcm2-7、Cdc6 については、昨年度に活性測定を行い、Mcm2-7 のローディング活性を有していることを確認した。今年度の研究では、ヘリカーゼアッセイを行い、これらのタンパク質に加えて、Cdc45、Sld3/7、Dpb11、Sld2、Mcm10、Pol ϵ 、DDK、CDK、RPA で再構成した CMG 複合体がヘリカーゼ活性を有していることを確認した。また、Flag ペプチドで標識した Mcm2-7 (Flag-Mcm2-7) を用いても、ヘリカーゼ活性がなくなることを確認した。さらに、DDK を反応系に加えて Flag-Mcm2-7 のリン酸化を行った後に、蛍光色素付きの Flag 抗体で染色しても、ヘリカーゼ活性がなくなることを確認した。この結果は、Flag-Mcm2-7 を蛍光染色して 1 分子蛍光顕微鏡観察できることを示唆している。次年度以降は、上記の 13 種類のタンパク質に加えて、さらに 5 種類のタンパク質を反応系に加えてレプリケーションアッセイを行い、精製したタンパク質が DNA 複製活性を有していることを確認する。それらのタンパク質を、ヌクレオソームを形成した DNA 上にロードして、ヒストンリサイクルを一分子蛍光顕微鏡観察する。