

安全に取扱い可能な二本鎖 DNA蛍光標識技術の開発

東京電機大学 工学部理工学科 生命科学系
助教 高橋 俊介

2022年11月10日

研究の背景

DNA分子は、それ自身で蛍光特性を持たないため、DNA分子を視覚化・検出するためには、何かしらの方法でDNAを染色する必要がある。

通常、DNA分子を視覚化・検出するためには、蛍光化合物(核酸染色試薬)で標識する必要がある

このような蛍光化合物について各種開発されている

研究の背景

核酸染色試薬は、次の3種に分類される

- (i) : 2本鎖DNAの副溝及び主溝に結合するタイプ
- (ii) : 2本鎖DNAの塩基対間に挿入するタイプ
- (iii) : (i) 及び (ii) の両方を行うタイプ

これらの色素は、DNA分子や細胞核の蛍光イメージングやフローサイトメトリーにおける諸解析（細胞周期解析、アポトーシス検出等）等に幅広く利用されている

従来技術とその問題点

DNAの蛍光染色には既に核酸染色試薬が実用化されているが、

- DNAの塩基対間に入り込むため、塩基対の間隔を広げてDNAの2重らせん構造を歪める
- DNA構造のゆがみは、転写やDNA複製などのタンパク質とDNAの相互作用を阻害する

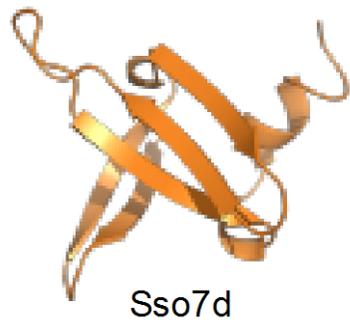
等の作用を及ぼすため、実験者は実験上に取り扱いに注意が必要である

新技術の特徴・従来技術との比較

- 耐熱・耐酸・耐塩基性の特徴を持つ2本鎖DNA結合タンパク質に蛍光タンパク質を融合した**2本鎖DNA蛍光標識タンパク質**の開発に成功した
- 2本鎖DNA蛍光標識タンパク質は、核酸染色試薬と比較し、細胞毒性が低いだけでなく、DNA結合親和性が高く、DNA分子や細胞核の蛍光イメージングが可能である

2本鎖DNA蛍光標識タンパク質

Uniprot	Name	1	10	20	30	40	50	60	Length												
P39476	Sso7d	MAT	VKFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GKMI	SFTYDLGGG	TGRGAV	SEKDAP	KELL	QMLEK	QK	-K	64	+	+	+	+	+	dsDNA
F4B8X5	Aho7c	MATKV	KFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GKMI	SFTYDD	NGKTGR	GAVSEK	DAPKEL	LEK	LK	-----	60	-	-	+	-	-	FP-fused Sso7d
A0A125SJ97	ATSV7	MVS	IKFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GNMVS	SFTYDD	NGKTGR	GALS	SLKEAP	QELL	QKL	NH-----	60	-	-	-	+	-	FP-fused Aho7c
Q96X56	Sto7	MVT	VKFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GKMI	SFTYDD	NGKTGR	GAVSEK	DAPKEL	QMLEK	SG	KK	64	-	-	-	+	-	FP-fused ATSV7
Identity		M....	KFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GKMI	SFTYD...	GKTGR	GA.S	K.AP	ELL...	L.....			-	-	-	-	+	FP-fused Sto7



Sso7d



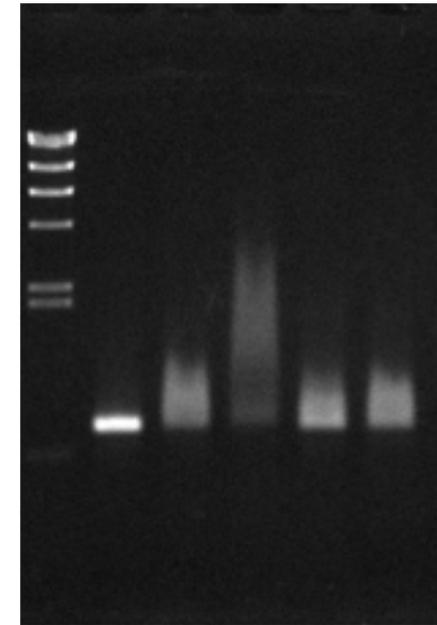
Aho7c



ATSV7



Sto7



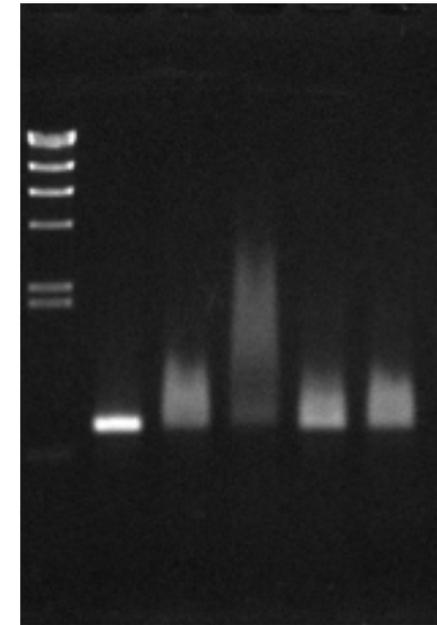
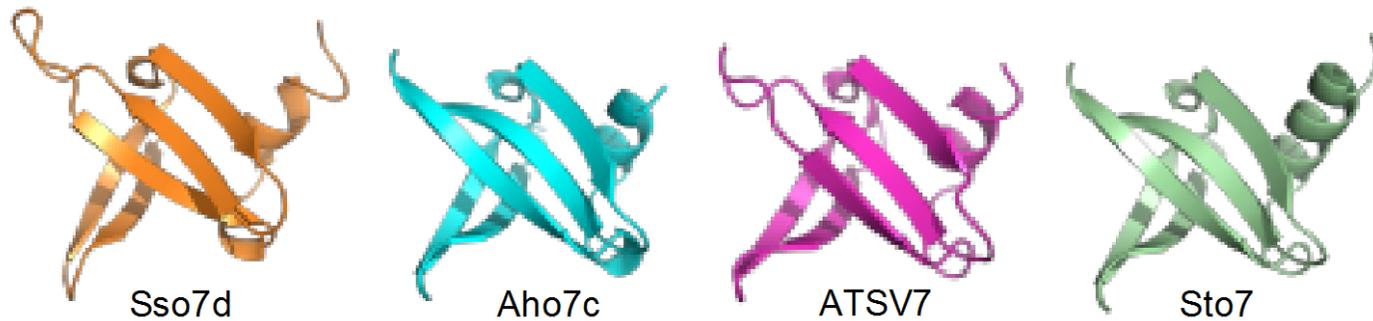
Lanes M 1 2 3 4 5

耐熱、耐酸、耐塩基性のDNA結合タンパク質
に蛍光タンパク質を融合

4種類の2本鎖DNA結合タンパク質は、相同性が高く
(75%程度)、構造予測では非常に似た構造をとる

2本鎖DNA蛍光標識タンパク質

Uniprot	Name	1	10	20	30	40	50	60	Length						dsDNA						
P39476	Sso7d	MAT	VKFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GKMI	SFTYDLGGG	KTGR	GAVSE	KDAPK	ELLQ	MLEKQ	K-K	64	-	+	-	-	-	FP-fused Sso7d
F4B8X5	Aho7c	MAT	KVKFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GKMI	SFTYDD	NGKTGR	GAVSE	KDAPK	ELLE	EKLK	-----	60	-	-	+	-	-	FP-fused Aho7c
A0A125SJ97	ATSV7	MVS	IKFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GNMVS	SFTYDD	NGKTGR	GALS	LKEAP	QELL	QKLNH	-----	60	-	-	-	+	-	FP-fused ATSV7
Q96X56	Sto7	MVT	VKFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GKMI	SFTYDD	NGKTGR	GAVSE	KDAPK	ELLQ	MLEK	SGKK	64	-	-	-	+	-	FP-fused Sto7
Identity		M	KFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GKMI	SFTYD	...GKTGR	GA	S	K	AP	ELL	...L				



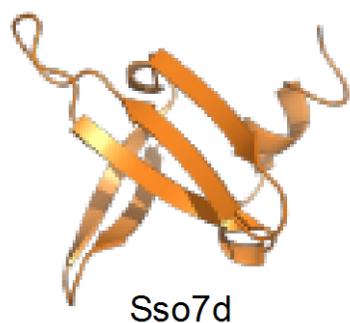
Lanes M 1 2 3 4 5

耐熱、耐酸、耐塩基性のDNA結合タンパク質
に蛍光タンパク質を融合

大腸菌で2本鎖DNA蛍光標識タンパク質を発現後、
Ni-NTA アフィニティークロマトグラフィーで精製

2本鎖DNA蛍光標識タンパク質

Uniprot	Name	1	10	20	30	40	50	60	Length						dsDNA					
P39476	Sso7d	MAT	VKFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GKMIS	SFTYDLGGG	TGRGAV	SEKDAP	KELLQ	MLEKQ	K-K	64	-	+	-	-	-	FP-fused Sso7d
F4B8X5	Aho7c	MATK	VKFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GKMIS	SFTYDD	NGKTGR	GAVSEK	DAPKEL	LEK	LK----	60	-	-	+	-	-	FP-fused Aho7c
A0A125SJ97	ATSV7	MVS	IKFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GNMVS	SFTYDD	NGKTGR	GALS	LKEAPQ	ELLQ	KLNH----	60	-	-	-	+	-	FP-fused ATSV7
Q96X56	Sto7	MVT	VKFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GKMIS	SFTYDD	NGKTGR	GAVSEK	DAPKEL	LQML	EKSGKK	64	-	-	-	+	-	FP-fused Sto7
Identity		M....	KFKYK	GEEKEVDI	SKIKK	VWRV	GKMIS	SFTYD...	GKTGR	GA.S	K.AP	ELL...L							



Sso7d



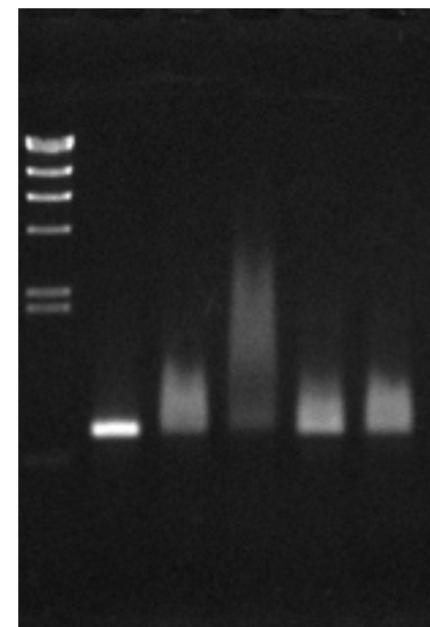
Aho7c



ATSV7



Sto7



Lanes M 1 2 3 4 5

耐熱、耐酸、耐塩基性のDNA結合タンパク質
に蛍光タンパク質を融合

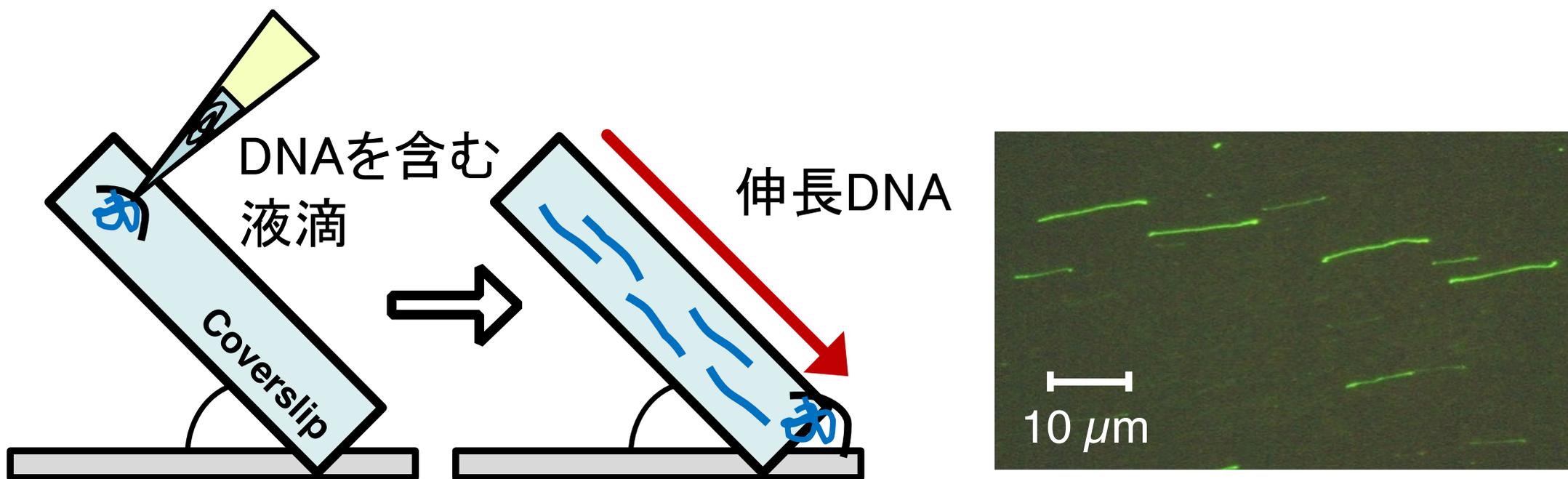
FP-fused Aho7cはDNA結合親和性が高く
FP-fused ATSV7はDNA結合親和性が低い

2本鎖DNA蛍光標識タンパク質

融合する標的タンパク質は、多様な蛍光タンパク質、有用なタンパク質タグなど特段指定はなく、**ユーザーに応じてカスタマイズできる**のでそこが売りだと考えている

DNAを足場として、表面に標的タンパク質を掲示した場合等においても活用ができるため、さまざまなケースに適用可能である

1分子蛍光イメージングによる特性評価



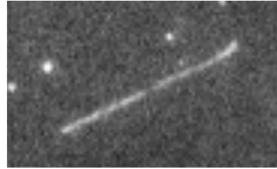
アミノシランコートしたガラス基板（正電荷）を用いて、負に帯電したDNA-タンパク質複合体を引き伸ばすことで、DNA分子の物理的形態を制御した

1分子蛍光イメージングによる特性評価

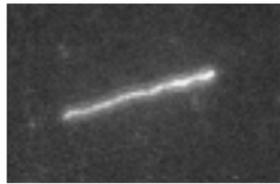
(a) FP-fused Sso7d- λ DNA



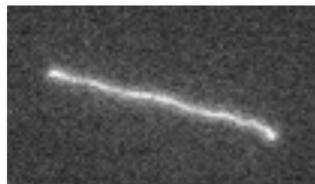
(d) FP-fused Sto7- λ DNA



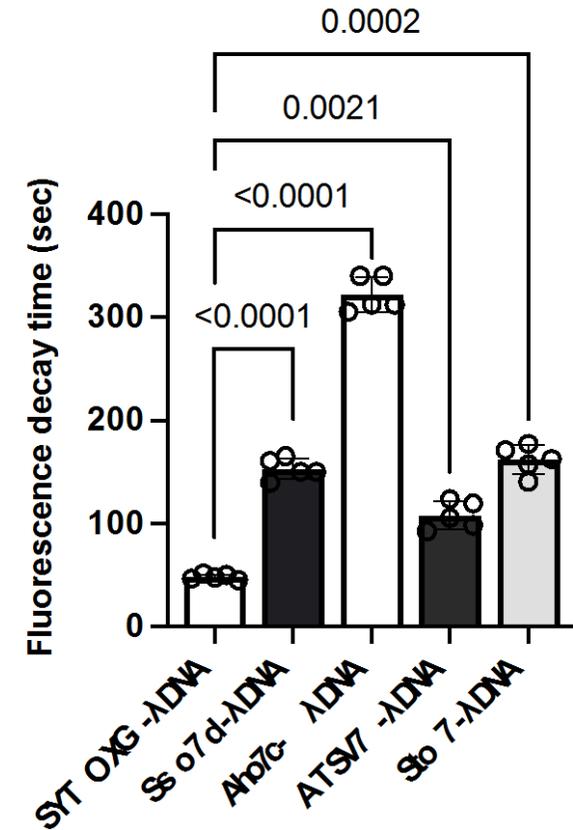
(b) FP-fused Aho7c- λ DNA



(e) SYTOXG- λ DNA



(c) FP-fused ATSV7- λ DNA



1分子DNAの蛍光イメージングが可能

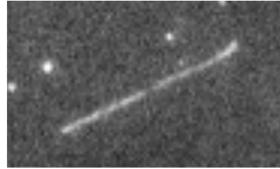
背景光の強さは、2本鎖DNA蛍光標識タンパク質のDNA結合親和性の強さに応じて減少した

1分子蛍光イメージングによる特性評価

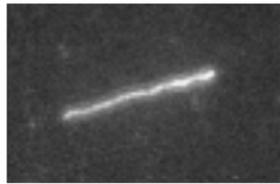
(a) FP-fused Sso7d-λDNA



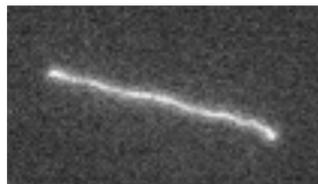
(d) FP-fused Sto7-λDNA



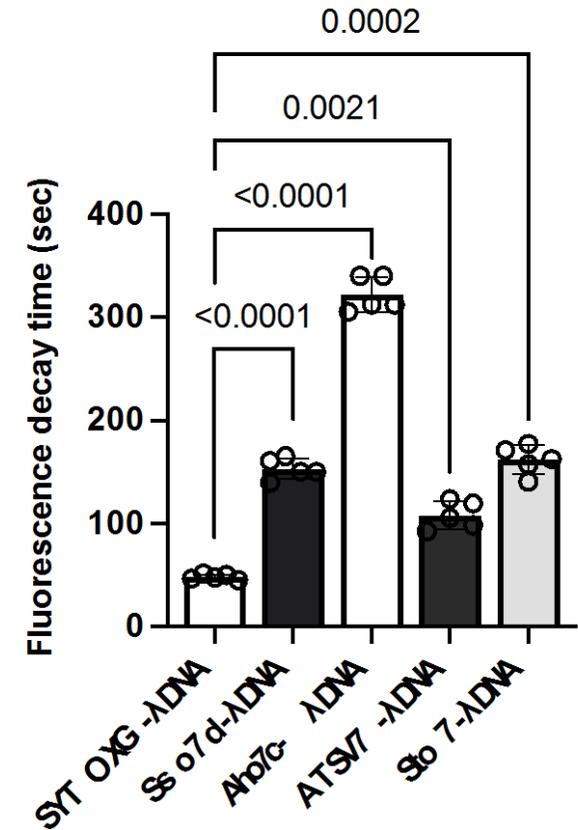
(b) FP-fused Aho7c-λDNA



(e) SYTOXG-λDNA

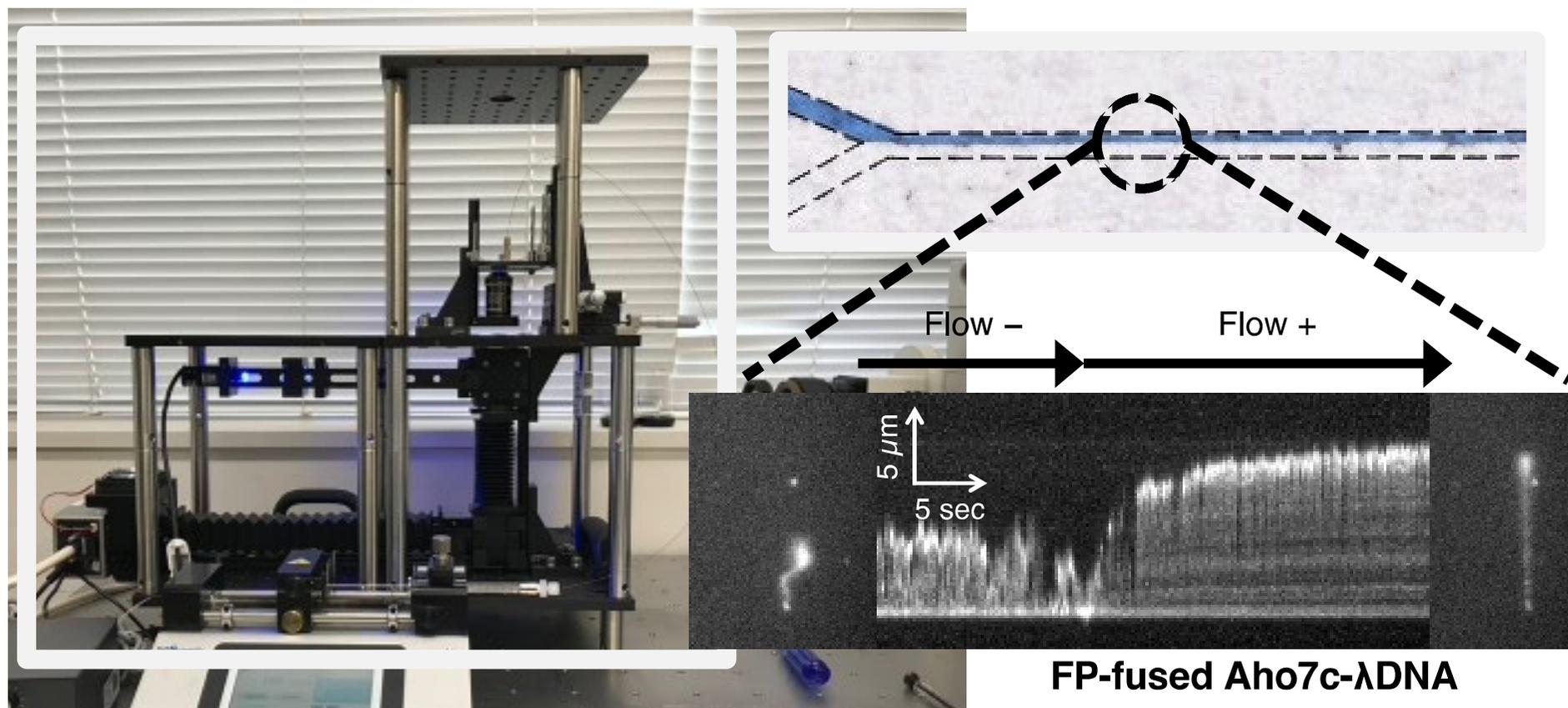


(c) FP-fused ATSV7-λDNA



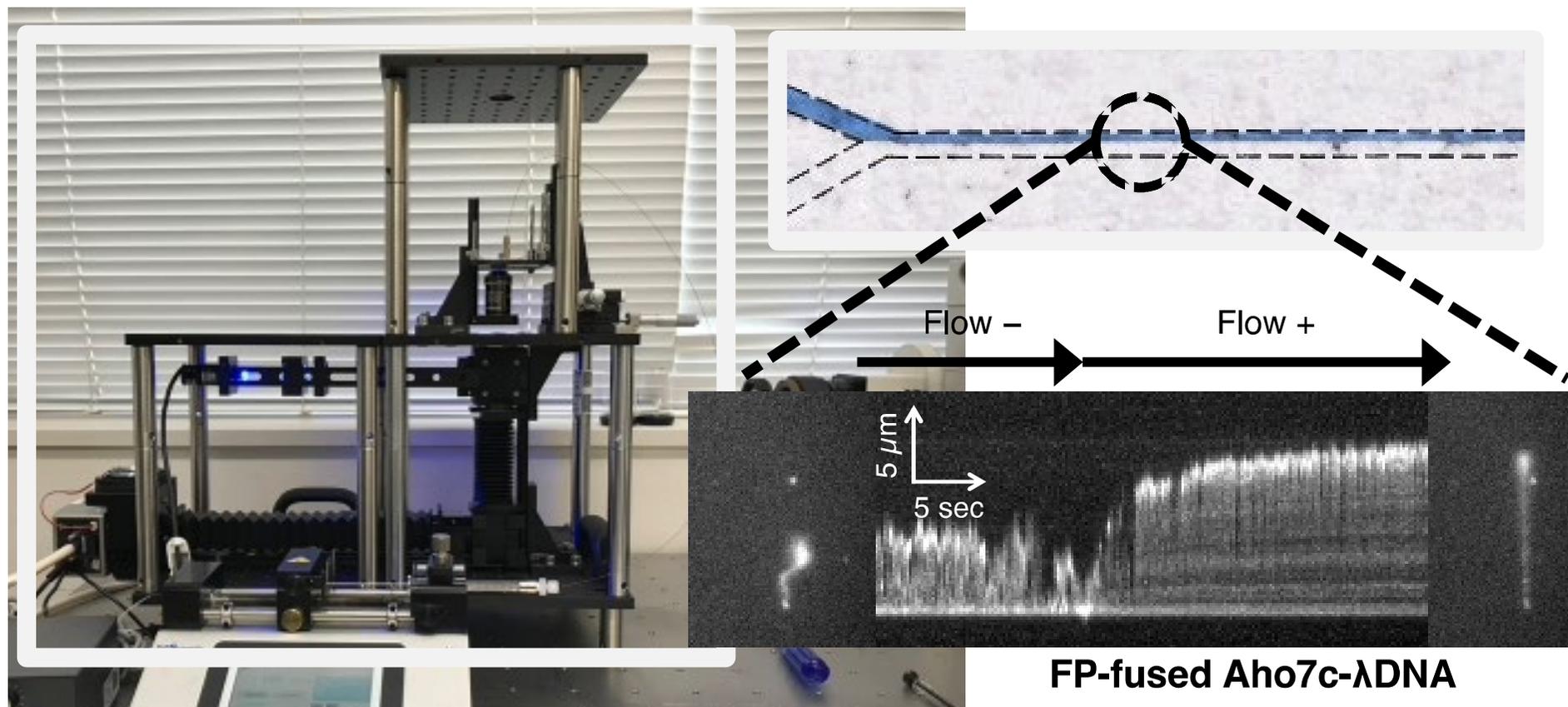
FP-fused Aho7cでのDNAの蛍光退色は、核酸染色剤(SYTOXG)と比べ6.7倍程度時間がかかった長い時間、DNAの蛍光イメージングが可能

1分子蛍光イメージングによる特性評価



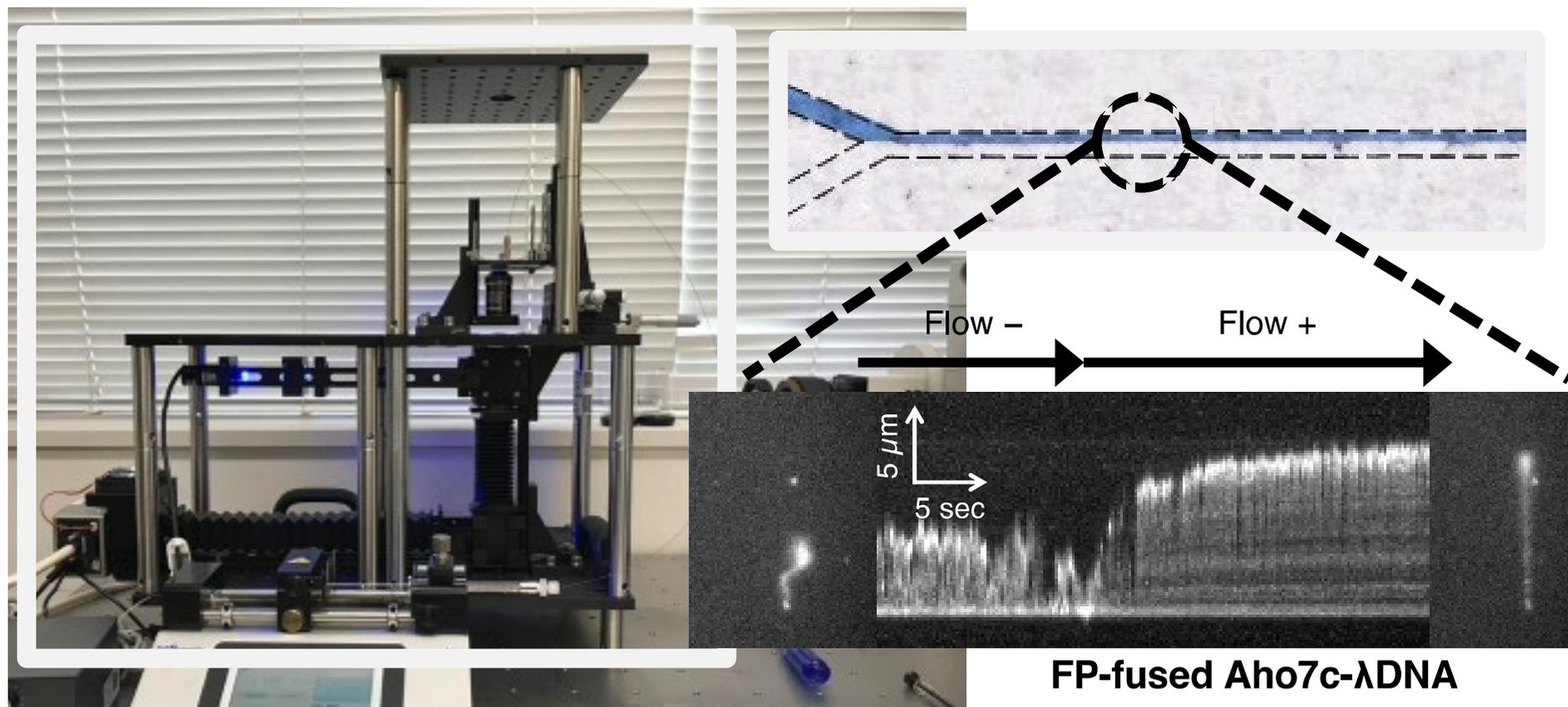
二本鎖DNA蛍光標識タンパク質を用いた
DNA1分子の動的挙動を評価した

1分子蛍光イメージングによる特性評価



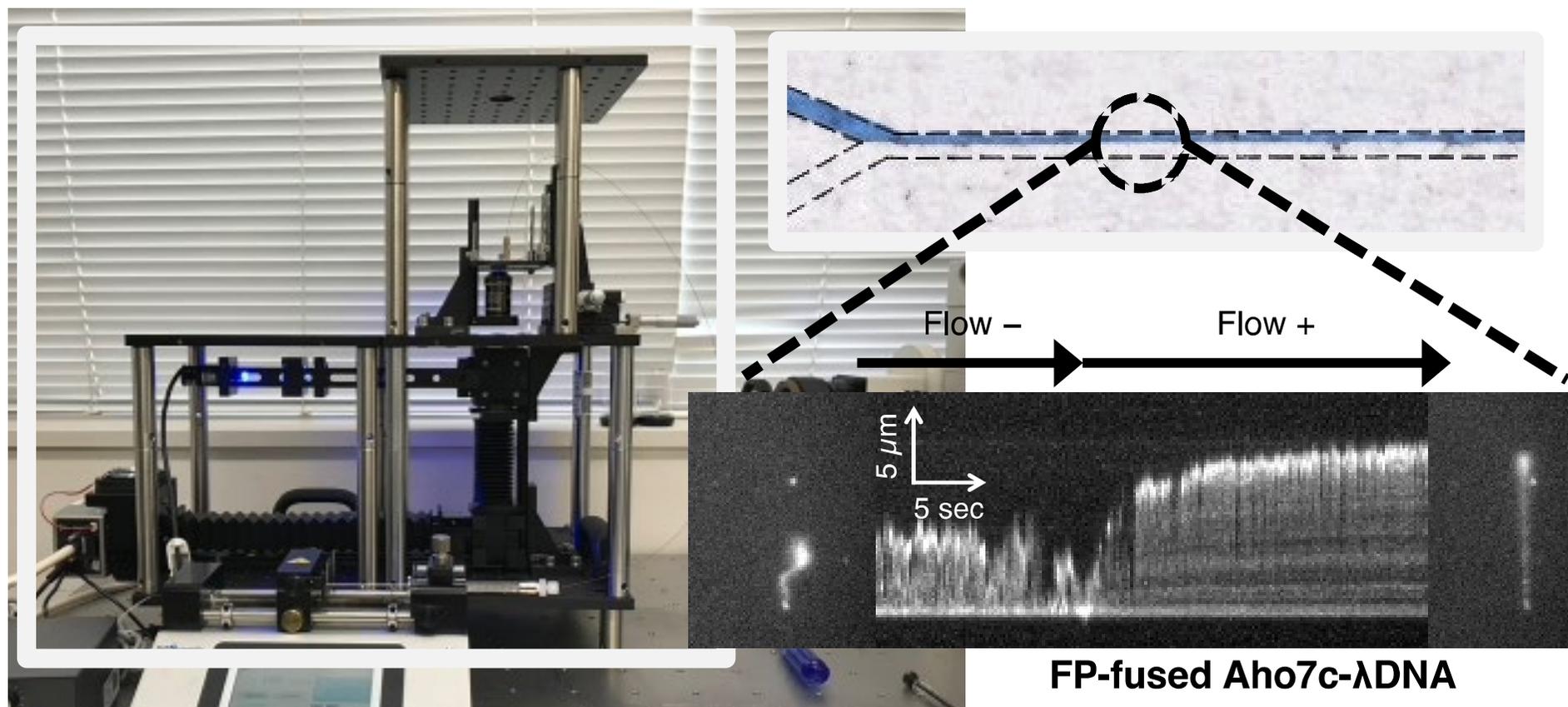
マイクロ流体デバイスを用いて、微細流路中にDNAの片端を固定し、溶液流れの有り無しでのDNA1分子の挙動を評価した

1分子蛍光イメージングによる特性評価



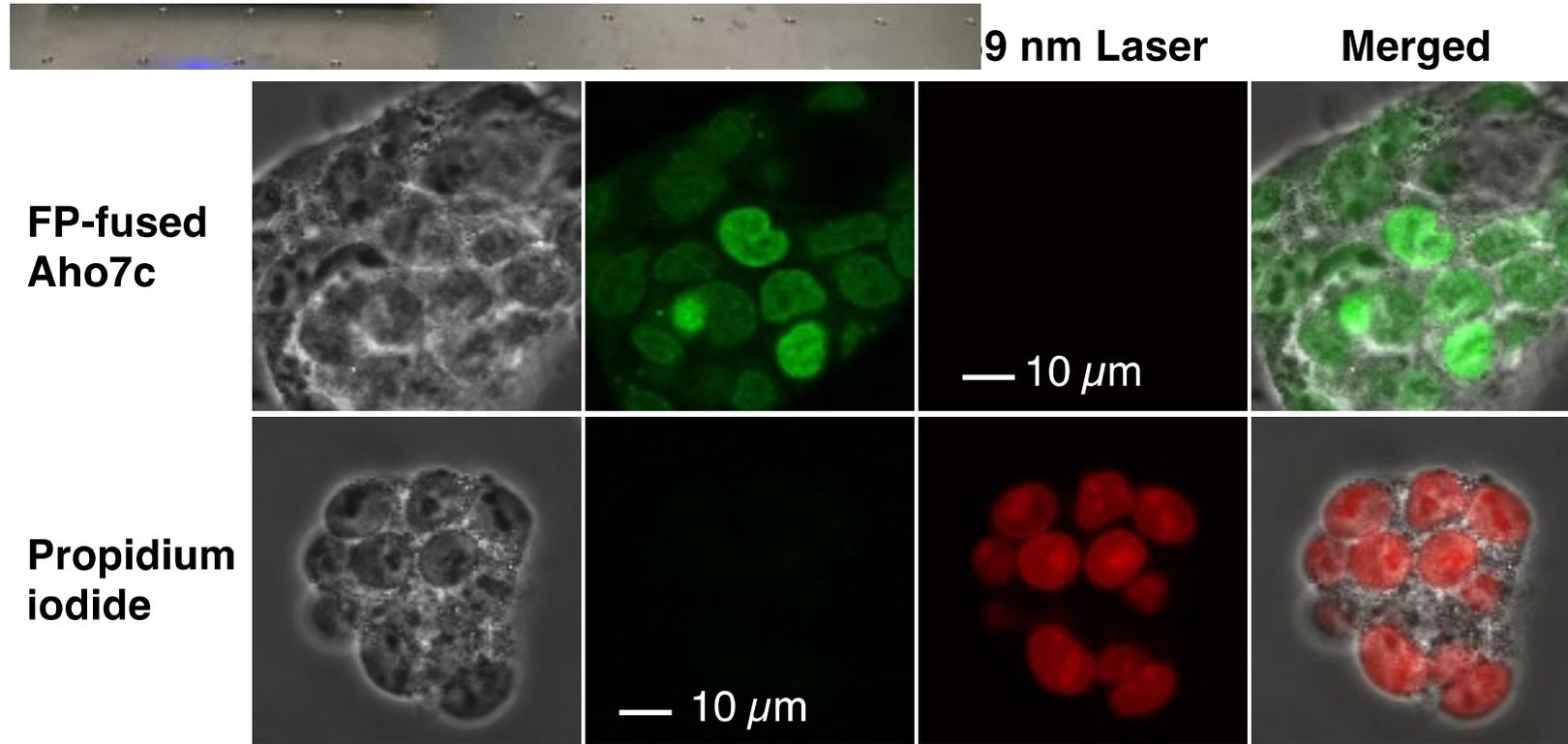
溶液流れの無い条件ではDNAは弛緩された状態、
流れの有る条件下ではDNAは伸長状態になった

1分子蛍光イメージングによる特性評価



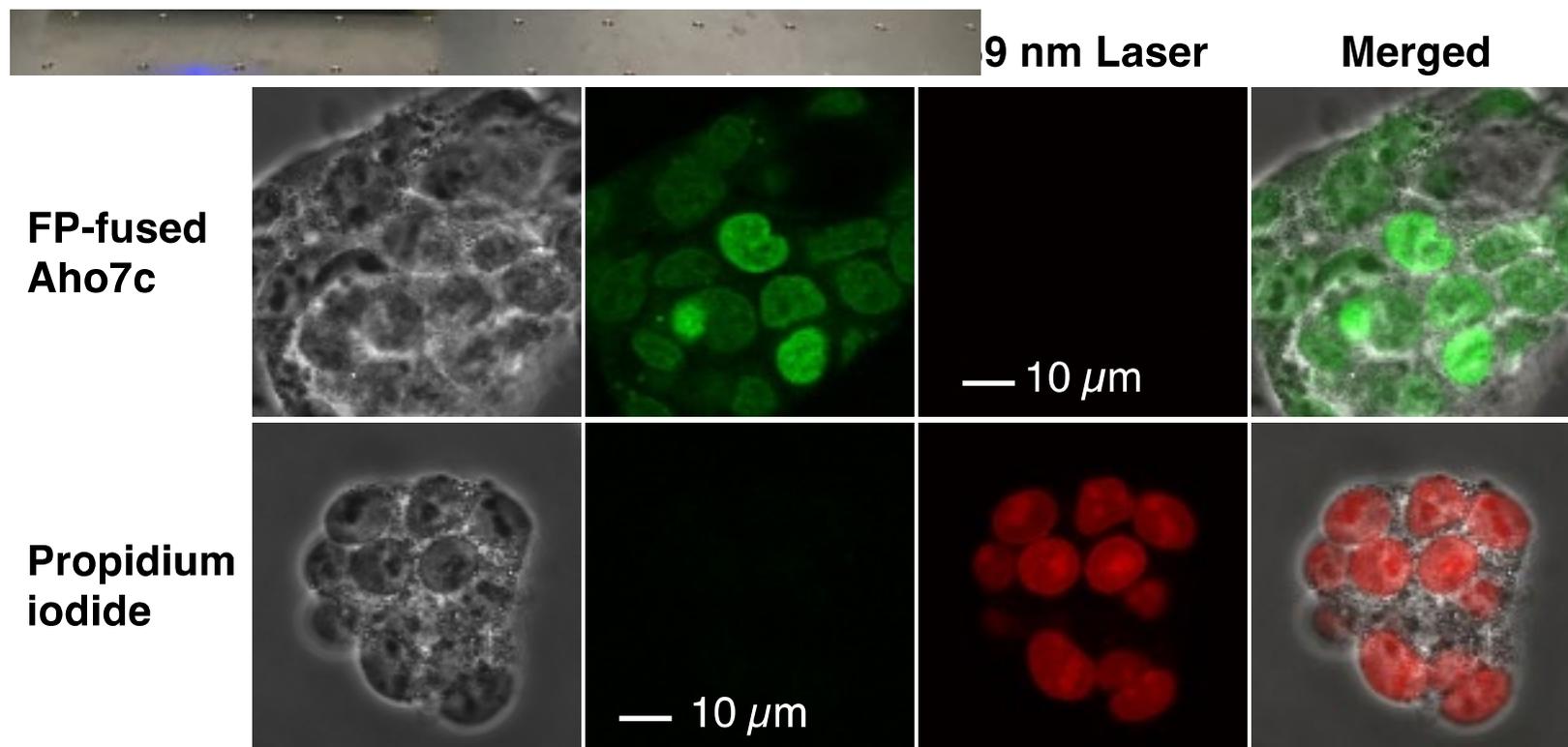
核酸染色剤でのDNAと同じ動的挙動をとった
2本鎖DNA蛍光標識タンパク質はDNA1分子イメー
ジングとして適用可能性が示唆された

細胞核蛍光イメージング



2本鎖DNA蛍光標識タンパク質を用いて細胞核染色への適用可能性を評価した

細胞核蛍光イメージング



共焦点顕微鏡により、細胞核のみ蛍光イメージングが可能であることが示された

細胞核蛍光イメージング

フローサイトメトリー解析においても、核染色された細胞集団解析が可能となった

細胞死解析へのアプローチも可能である可能性が示唆された

DNA1分子イメージング、シングルセルイメージング、ライブセルイメージング、フローサイトメトリー解析など多くのアプローチで適用が可能となることが示された

想定される用途

- 生命・医薬分野の研究試薬など様々なアプローチに適用可能性が期待される
- また、達成された2本鎖DNA結合タンパク質の特性に着目すると、**素材・材料**といった分野や用途に展開することも可能と思われる

実用化に向けた課題

- 現在、2本鎖DNA蛍光タンパク質は特性評価済み。しかし、保存期間についてが未解決である。
- 今後、熱安定性の蛍光タンパク質を融合した2本鎖DNA蛍光タンパク質についても実験データを取得し、保存期間などの条件設定を行っていく。
- 実用化に向けて、細胞毒性評価などを実施する必要もあり。

企業への期待

生命・医薬分野の研究試薬についてを想定しているが、それ以外のアプリケーション用途が期待できる企業においても共同研究希望

本技術に関する知的財産権

- 発明の名称 : 融合タンパク質, 2本鎖DNA標識剤, 2本鎖DNA標識用キット, DNA, 及びベクター
- 出願番号 : 特願2022-95293
- 出願人 : 東京電機大学
- 発明者 : 高橋俊介、長原礼宗

お問い合わせ先

東京電機大学

研究推進社会連携センター 産官学連携担当

TEL 03-5284-5225

FAX 03-5284-5242

e-mail crc@jim.dendai.ac.jp