

伸長固定化DNA上の単鎖損傷部位に対する 可視化リガーゼ酵素のセンシング機構の解明

加畑 博幸

京都大学工学研究科機械工学専攻

マイクロマシン工学分野ナノバイオロジーグループ

phone/fax, 075-753-4752; e-mail, kabata@mech.kyoto-u.ac.jp

§ 研究の目的と問題解決のためのアプローチ §

DNAの2本鎖のうち1本が開裂したり（ニック）、切除を受けたり（ギャップ）する単鎖損傷は、DNA連結酵素（リガーゼ）やDNA合成酵素（ポリメラーゼ β ）によって認識され、修復されている。これら修復酵素の単鎖損傷部位への結合に伴う一連の分子運動を直に「目で見える」ことにより、ゲノム修復機構に関する未解決問題、

「修復酵素は、長大なDNA上でのランダムな解離と結合の繰り返しの過程で偶発的に単鎖損傷部位と結合するのか、それともDNA上に沿った滑り拡散（スライディング）を行なうことで単鎖損傷部位を探索しながら結合するのか？」
を決定する。

その実現のために必須の研究項目は、つぎの3つであった。

- 1) 修復酵素のT4 DNAリガーゼおよびrat DNAポリメラーゼ β に対して酵素活性を損なうことなく蛍光基を導入し、水溶液中での修復酵素1分子の位置を光学顕微鏡下で輝点として可視化すること（タンパク質1分子の可視化）。
- 2) 修復酵素がDNAと結合するのに要する十分な濃度の、かつ光学顕微鏡の空間分解能より大きいサイズのDNAに対して、ニック／ギャップ部位を導入すること。そして、スライディングを直線運動として容易に検出するために、ニック／ギャップ化DNAを伸長してからスライドガラス上に配向し、DNA末端部位でのみ固定することで、つり橋型の形状をしたDNA試料のプレパラートを調製すること（長鎖ニック／ギャップDNAの伸長固定）（図1，2）。
- 3) 修復酵素分子の伸長固定化ニック／ギャップDNAへの結合を、光学顕微鏡が有する実時間分解能で直視観察し、DNA上での分子運動の実体を直接同定すること（*in situ* DNA結合運動アッセイ）（図3）。

これら3項目に関して、貴財団の研究助成によって得られた結果を以下に報告する。

§ タンパク質 1 分子の可視化 §

DNAの構造類似体であるヘパリン樹脂とT4 DNAリガーゼとの複合体を形成させてから、リガーゼに含まれる50のリジン残基にローダミン蛍光基 (TRITC) を共有結合で導入する新しい蛍光標識法を実現した。

この蛍光標識法の特長は、

1. ヘパリンが、リガーゼのDNA結合部位およびその近傍の触媒活性中心へのTRITCの結合を防ぐことで、リガーゼのDNA修復活性に無関係な部位だけを標識できる、
2. 標識されたりリガーゼは低塩濃度溶液中ではヘパリン樹脂と結合したままであるため、低塩濃度溶液で樹脂を洗うことで観察の妨げとなる未反応のTRITCを容易に除去できる、
3. 溶出液の塩濃度を高めることによりDNA結合活性が低下したりリガーゼ分子を排除し、

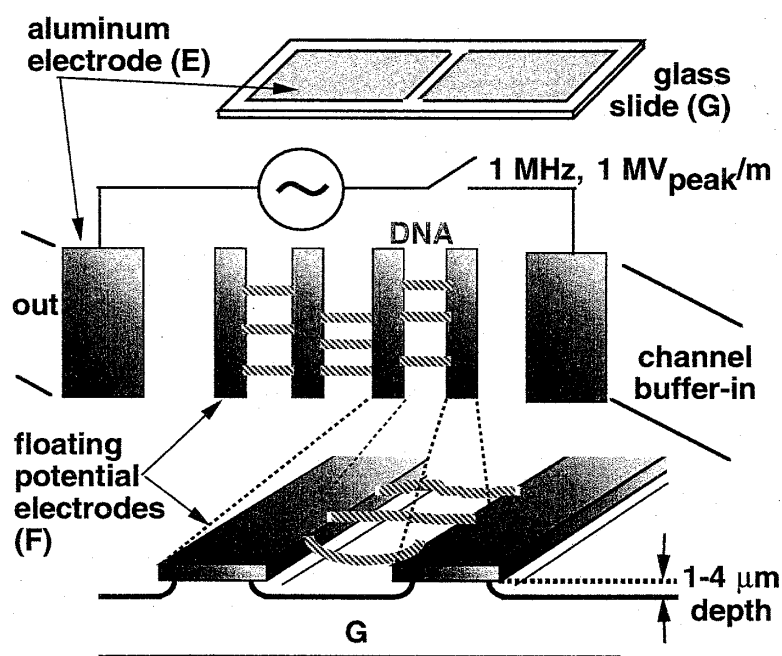


図1. DNA伸長固定プレパラート

スライドガラス上にアルミを蒸着して薄膜電極対を構築する。交流電場中のDNA分子は電極間で整列し、伸長する。DNA端がアルミと吸着することにより、伸長した形状は電界印加終了後も保持される。電極間のガラス部分はエッチングにより掘り下げられ、電極とガラス表面は畝溝構造しており、修復酵素分子のDNAに沿った運動を阻害する可能性がある伸長固定化DNAと電極間のガラス部分との接触を回避している。

DNA結合活性が保持されたりリガーゼ分子だけを精製することができる、点である。

期待通り、精製画分の標識リガーゼ分子は蛍光顕微鏡で明るい光点として可視化され、さらに生化学的アッセイによってDNA連結活性を保持していることが確認された。この蛍光標識法は、rat DNAポリメラーゼβの可視化のみならず、T7 RNAポリメラーゼや制限酵素Eco RIの可視化にも適用できることが実証され、タンパク質の構造と機能によらず汎用であった。

§ 長鎖ニック／ギャップ DNAの伸長固定 §

λgt11 DNA (44 kbp、14 μm長) と希釈DNase I 酵素をMg²⁺存在下で反応させることにより、DNA 1本当たり平均10²個のニック／ギャップを導入できることを見出した (図2)

A)。ニック／ギャップDNA溶液をプレパレート表面のアルミ蒸着電極対の上に滴下し、カバーを掛けてから高周波電界を印加したところ（図1）、DNA分子が電極間（ギャップ長10 μm から20 μm まで）に集まり、電場方向に伸長し、並行に配向する誘電泳動現象が観察された。DNAの末端がアルミ電極端と結合したために、電圧を切っても14 μm より短いギャップ長をもつ電極の間でDNAが伸長したまま固定されることが判明した（DNA端での固定の機構についてはもっか調査中である）。結果、修復酵素分子のDNA上におけるスライディングを直線運動として同定できる一直線状の形状を有したDNA分子のプレパレートを作製することが出来た（図2 B）。

副次的成果として、長鎖DNAの分子弾性を観察することに成功した。これまでにBustamanteらのレーザートラップを用いたDNA物性測定から、DNAはゴム弾性を有しており自長の170%まで伸長可能であるというモデルが提案されてきた。本研究を遂行中、報告者は伸長固定されたニック／ギャップDNA分子のうち、自長の14 μm より長い20 μm のギャップ長をもつ電極間に斜めに固定されている分子が存在することを発見し、伸び率は最大で自長の1.8倍に達していた（図2 B）。自長よりも伸び切った固定化DNA分子はニック／ギャップを導入したときにのみ観察され、ニック／ギャップを導入しないDNA分子には認められなかったことから、自長を越えた過剰な伸びはニック／ギャップに起因していると考えられる。

確かに、自長よりも伸び切ったDNAは、ニック／ギャップ

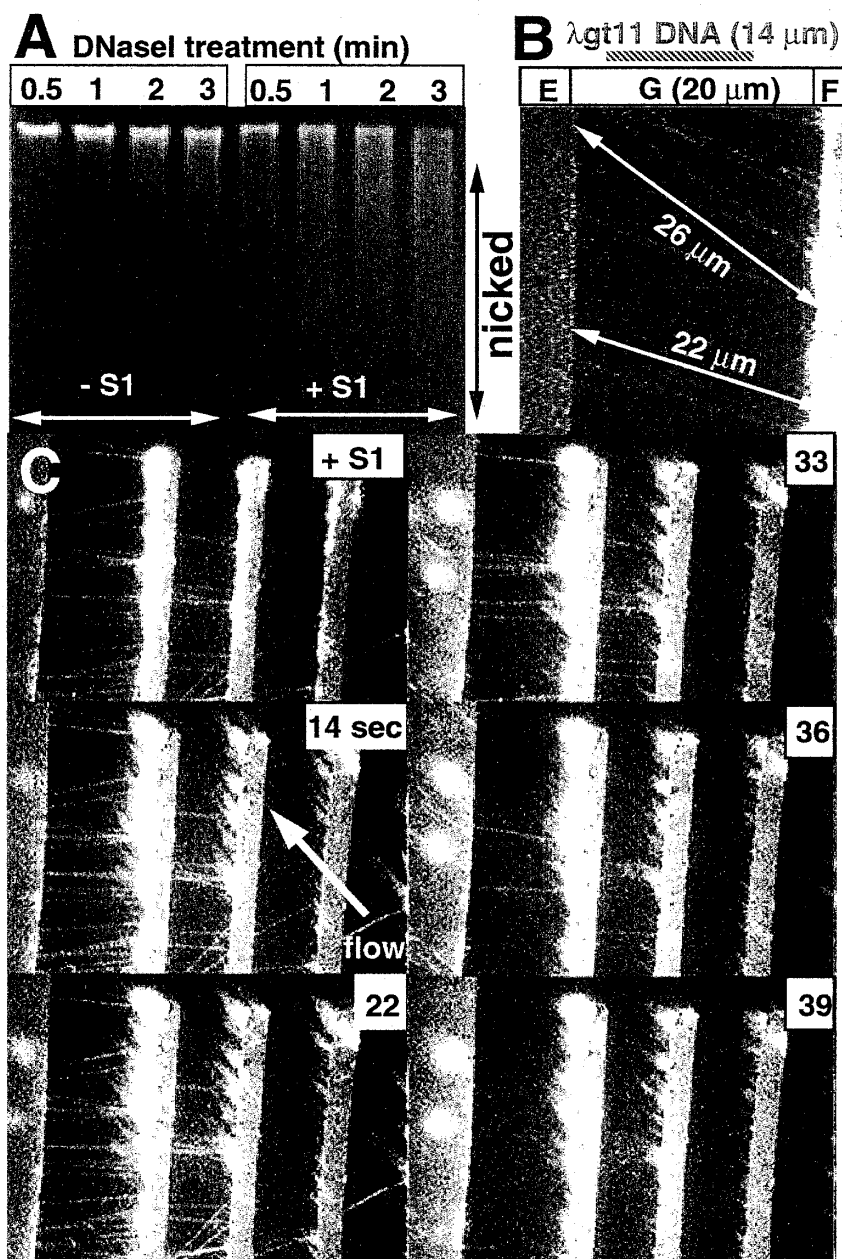


図2. 短鎖損傷DNAの調製(A)と伸長固定(B). 固定化DNAは一本鎖切断酵素S1により消化される(C). DNA分子の一部は自長の1.8倍まで伸びている。DNAはYO-PRO染色により可視化（B励起像）。

部位特異的切断酵素であるS1ヌクレアーゼにより消化されていく様子がリアルタイムで観察された（図2C）。これらの結果は、RecAタンパク質のようなDNAの引き延ばし装置が不在でも、DNAに内在する分子弾性により自らが伸展し得ることを証明している。

§ *in situ* DNA結合運動アッセイ §

伸長固定化ニック／ギャップDNAに蛍光標識T4 DNAリガーゼ溶液を注入したところ、1回の注入で1視野（縦横120 μm 範囲）当たり、0から2分子のリガーゼ分子が溶液の流れに沿って浮遊してくるのが観察された。この数は、標識リガーゼ溶液の濃度から期待される分子数と比較して1/1,000と少なかった。この原因は、アルミ電極との非特異吸着によるリガーゼの損失と、注入された溶液が対物油浸レンズに押されて視野内に効率良く流入されないことに起因していた。この解決策として、吸着防止剤の選定とリガーゼ分子を視野に誘導できる微細流路の作製を現在行なっている。

現状ではまだ分子運動の観察数が少なく統計作業と対照実験を行っていないものの、予備的データとしてリガーゼ分子がニック／ギャップDNAに結合する動態が可視化されている（図3）。当初リガーゼはDNAと結合したあとは複合体を形成しDNA上での運動を停止すると予想していたが、実際はDNAと結合してから2 sec以内にDNAから解離して溶液の流れに沿って移動した。これは、リガーゼのニック／ギャップDNAからの解離の速度定数が、これまで速度論的研究から得られた文献値よりも大きい、もしくは、従来の生化学的アッセイの結果は分子個々の解離の平均像を反映しており1分子レベルで解離速度を測定した場合には早い解離から遅い解離まで分布をとる可能性を示唆している。

現在、リガーゼと並行してポリメラーゼ β

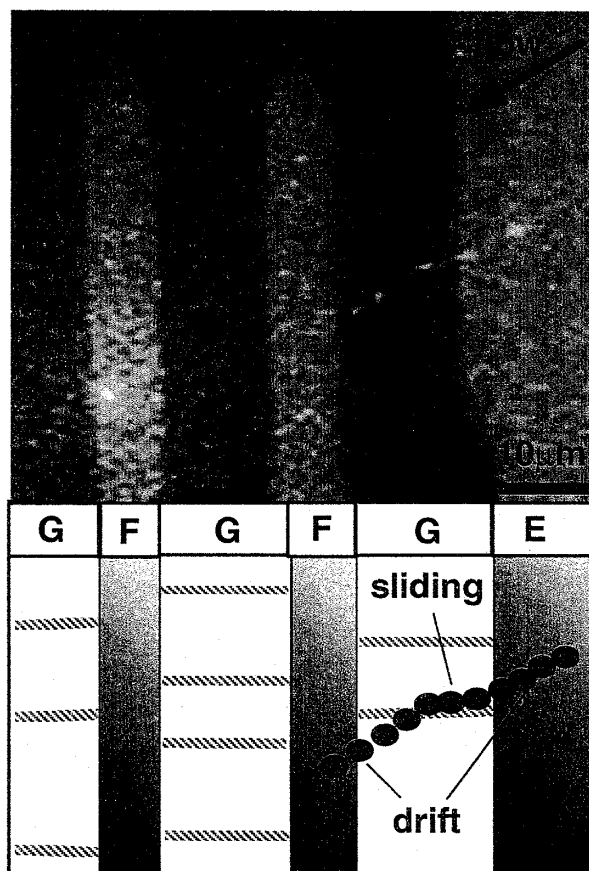


図3. ニック／ギャップ化DNA上を滑り運動する蛍光標識T4 DNAリガーゼ分子。33 msec毎の分子の位置の変位を600 msec間重ね合わせたストロボスコプ像。DNAと結合したリガーゼは流れの方向とは異なる伸長DNAに沿った平行な運動成分（スライディング）を示している。DNAから解離したあとは、再び溶液に運ばれる（ドリフト）。リガーゼに導入されたローダミン蛍光基をG励起で可視化しているため、伸長DNAは不可視。

の分子運動を観察中であり、DNA修復タンパク質群の短鎖損傷部位センシング機構の同一性と多様性を解明していく。

§ 謝辞 §

研究全般を通じて有益のご助言を戴きました嶋本伸雄教授（国立遺伝学研究所構造遺伝学研究センター）と鷺津正夫教授（京都大学工学研究科）に厚く感謝の意を表します。

貴重な酵素試料を快く提供して戴きました坂口謙吾教授（東京理科大学理工学部）と水品善之講師（神戸学院大学栄養学部）に深く感謝いたします。

最後に、本研究は、財団法人新世代研究所の第8回研究助成活動による支援の元で遂行されました。財団関係者のみなさまに心よりお礼申し上げます。

§ 成果の公表 §

<誌上>

1. H. Kabata, H. Aramaki, O. Kurosawa, M. Washizu, and N. Shimamoto, "Direct observation of *Pseudomonas putida* CamR molecules sliding along DNA and enhancement of affinity for its operator", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (in press).
2. H. Kabata, W. Okada, M. Washizu, "Single-molecule dynamics of the *Eco* RI enzyme using stretched DNA: its application to *in situ* sliding assay and optical DNA mapping". *Jpn. J. Appl. Phys.* **39** (Part 1, 12B), 7164-7171 (2000).
3. T. Yamamoto, O. Kurosawa, H. Kabata, N. Shimamoto, and M. Washizu, "Molecular surgery of DNA based on electrostatic micromanipulation", *IEEE Transaction IA*. **36** (4), 1010-1017 (2000).

<口頭>

1. H. Kabata, W. Okada, M. Washizu, "Microscopic demonstration of static- and dynamic-binding of *Eco* RI enzyme to extended DNA at a single-molecule level", International Microprocesses and Nanotechnology Conference, University of Tokyo, Tokyo, July 11, 2000.
2. H. Kabata, M. Washizu, H. Aramaki, N. Shimamoto, "What is the physiological role of negative cooperativity in the binding of inducer to *P. putida cam* repressor?", Molecular Genetics of Bacteria & Phages, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, August 25, 2000.

3. 松本繁一、加畑博幸、黒澤修、鷺津正夫、「DNA結合酵素のための*in vitro*滑り運動測定法の開発と分子運動の可視化」、第38回生物物理学会、東北大学、仙台、9月11日、2000.
4. 加畑博幸、鷺津正夫、荒牧弘範、嶋本伸雄、「誘導物質の結合によるアロステリック効果とDNA長の変化によるアンテナ効果がCamRの転写抑制能を制御する」、第38回生物物理学会、東北大学、仙台、9月13日、2000.
5. 三木貴司、水品善之、坂口謙吾、鷺津正夫、加畑博幸、「DNA複製／修復酵素のDNA結合様式を解明するための1分子運動アッセイ」、第23回分子生物学会、神戸国際会議場、神戸、12月14日、2000.
6. 加畑博幸、鷺津正夫、荒牧弘範、嶋本伸雄「*P. putida* camリプレッサー(CamR)の全結合機構の解明：動的DNA結合と協同的インデューサー結合による2重の転写抑制能制御」、第23回分子生物学会、神戸国際会議場、神戸、12月14日、2000.
7. 加畑博幸、三木貴司、松本繁一、水品善之、坂口謙吾、鷺津正夫、「DNA結合蛋白質モーターの滑り運動の可視化」、2001年生体運動研究合同班会議、早稲田大学、東京、1月8日、2001.
8. 加畑博幸、二階堂恭弘、三好弘晃、鷺津正夫、「マイクロマシーニングによる染色体ダイナミクス」、総研大ミーティング蛍光新技術と生体ダイナミクス、館山寺ロイヤルホテル、浜松、3月28日、2001.