3PA113

大腸菌シャペロニン GroEL への
非協同的ヌクレオチド結合

○伊野部智由、寺田智樹、桑島邦博（東大・理）

GroELに介助されたタンパク質の効率的まき戻りにはヌクレオチド結合によるGroELの構造変化が非常に重要である。現在まで、他のグループの研究などにより、GroELはヌクレオチド結合により協同的な構造変化を示すとされており、このような構造変化がGroELによる標的タンパク質の巻き戻り促進にとって重要であると信じられてきた。しかし、寺田らの滴定型熱量計によるヌクレオチド結合の実験では協同的な効果は全く観測されなかった[1]。この結果は、他のグループの実験で用いられたGroEL低濃度では解離に伴って協同的な構造転移が起こるが、滴定実験を行った μM 濃度のGroELでは解離が起こらないためであると説明された。

われわれはこのようなGroELの解離会合が現実起こっているのかを確かめるために、HPLCゲルろ過実験を行った。その結果、ATP存在下では低濃度（50nM）のGroELは解離する傾向にあることが分かったが、他のヌクレオチド（ADPとATP非加水分解性類似化合物であるAMP-PNP）の存在下では、GroEL濃度を下げてでも全く解離は観測されなかった。これらのATP以外のヌクレオチドの協同的な結合はビレニル化したGroELで蛍光スペクトルを用いて観測されている[2]。そこで、同じビレニル化GroELを調製し、過去の報告にあるような協同的な現象を検討してみた。その結果、Jacksonらの実験には不備があることが判明するとともに、ADP、AMP-PNPについて非協同的な結合を示すビレニル化GroELの蛍光変化が観測された。またその結合定数は滴定型熱量計により求めた値とほぼ一致する。このことは、これらのヌクレオチド結合に伴うGroELリング内のアロステリックな構造変化はないことを示している。

[1] Terada, T.P. & Kuwajima, K. (1999) *Biochim Biophys Acta* 1431:269-281

[2] Jackson G.S. et al. (1993) *Biochemistry* 32:2554-63

T. Inobe, T.P. Terada, K. Kuwajima: Non-cooperative Nucleotide Binding to the *E. coli* Chaperonin GroEL.

3PA115

Molecular dynamics of thymine base damaged DNA - thymine glycol & thymine dimer - structural and energetic origin of recognition and repair process.

Miroslav PINAK, JAERI, Center for Promotion of Comp. Science and Engineering, Tokai

Pyrimidine bases of DNA are a major target either of free radicals induced by ionizing radiation in DNA surrounding environment or UV radiation. Thymine dimer (TD) is UV induced damage to DNA, in which two neighboring thymines in one strand are joined by covalent bonds C(5)-C(5) and C(6)-C(6) atoms of thymines. Thymine glycol (TG) is ionizing radiation induced damage to DNA, in which the free water radical adds to unsaturated bond C(5)-C(6) of thymine.

T4 Endonuclease V is TD specific repair enzyme that catalysis the 1st reaction step of the specific base excision repair pathway. The recognition of TD site and formation of stable enzyme-DNA complex is the key point for the onset of the repair process. TG is recognized and repaired by the UvrABC enzyme complex, of which there are as many as three routes to its repair: endo III, exo III and endo IV. TG repair pathway indicates that repair of TG may be explained by the UV-induced repair mechanisms that is associated with repair of TD and thus both repair processes - TD and TG - may be studied complementarily.

To study the time evolution of the recognition processes the 1-nanosecond molecular dynamics (MD) simulations of the following molecules were performed: two thymine lesions - thymine dimer (TD) and thymine glycol (TG), and their respective specific repair enzyme T4 Endonuclease V and Endonuclease III.

In the case of MD of TD, there is detected strong kink around the TD site, that is not observed in native DNA. This structural distortion is probably one of the factors that is recognized by repair enzyme. In addition there is also observed the statistically significantly different value of electrostatic energy at the TD site - negative ~ 10 kcal/mol¹, in contrary to nearly neutral value of native thymine site.

In the case of TG damaged DNA there is major structural distortion at the TG site, mainly the increased distance between TG and the 5' of adjacent nucleotide. This enlarge gap between the neighboring nucleotides may prevent the insertion of complementary base during replication causing the replication process to stop (NMR study). In which extend this structural feature together with energy properties of TG contributes to the proper recognition of TG by repair enzyme is subject of computational MD study.

3PA114

制限酵素による dsDNA 切断反応の蛍光相関分光法による計測
○西村 吾朗、金城 政孝 (北海道大学・電子科学研究所)

【はじめに】蛍光相関分光 (FCS) 法は、少量の試料溶液中の微量蛍光分子の数や大きさを簡単に計測できる方法である。そのため、多数の試料から特定なものをスクリーニングする応用にも期待されている。特定遺伝子の突然変異などの検出は制限酵素による断片のパターンの解析をゲル電気泳動を用い、そのパターンを解析するのが一般的であるが、FCS 法によれば断片数などが分離操作なく測定できるため、より簡便で高速な分析が可能となると考えられる。

【目的】蛍光相関分光法により制限酵素により生成する断片数、およびその大きさを均一溶液中で解析できることを示し、はじめに述べた応用に対する可能性などを議論したい。

【実験】PCR 法によりランダムに蛍光色素を導入した 約 0.5nM 20 μl の 500bp dsDNA 試料を制限酵素 BcnI, HaeII および PvuI (約 4U から 6U) により切断し、その反応を FCS 法によりモニターした。特に蛍光分子数を反映する蛍光相関振幅の変化をまず解析し、理論と比較した。さらに蛍光相関関数の減衰 (相関時間) を多成分モデルで検討を行った。また、電気泳動による結果とも比較した。

【結果】蛍光相関振幅は、BcnI, HaeII の酵素をそれぞれ加えることにより、常温でも速やかに減衰し、これら酵素により 500bp の dsDNA が断片化されることが確認できた。一方、至適温度が 55°C である PvuI の場合常温では反応がほとんど振幅が変化せず反応が進まないことが示され、また至適温度まで加熱することにより振幅の減衰が見られ反応が進行したことが確かめられた。相関振幅の変化は、各断片の長さを L_i 、もとの dsDNA の長さを L_0 とすると $\sum (L_i/L_0)^2$ となることが期待できる。実験中の試料からの水の蒸発を考慮することにより、ほぼ実験の振幅と一致した。また、電気泳動の結果からも完全に切断されていることが確認できた。

一方、相関時間の方は、変化が極めて小さく、断片の長さもとの dsDNA の相関時間から直接予測されるものより長かった。また実験ごとの変動も大きかった。これらは、酵素溶液の保存溶液中に含まれるグリセロールによる粘性の増加が大きき寄与しているものと考えられる。また、温度やビベッティングなどの実験的にコントロールし難い要因によりその値がばらついたものと考えらる。粘性などにより各断片の相関時間が一様に長くなったと仮定し、複数の成分でデータを解析することにより、相関時間を含めて理解が可能であることが示された。

【考察】これらの結果から考えると、実際の応用では相関振幅の変化を基本的な指標とし、断片数を比較解析する方が、より変化が大きく応用しやすいものと考えられ、その確認として相関時間を解析するのが良いのではないかと結論づけられる。

G.Nishimura and M.Kinjo: The cleavage of dsDNA by restriction endonucleases monitored by fluorescence correlation spectroscopy

3PA116

DNA に対する切断酵素および合成酵素の分子相互作用の可視化

○松本繁一¹、加畑博幸¹、岡田 渉¹、黒澤 修^{1,2}、鷲津正夫¹、¹京大 (工) 機械工マイクロマシン ²(株)アドバンス ³NEDO

当研究室では DNA 上における酵素の結合位置の分布と運動を光顕を用いて検出することにより、1) 酵素が特異的 DNA 部位と結合し機能を発現している状態をリアルタイムで解明する、2) 特異的結合をプローブとして DNA 部位の位置を決定する *in situ* マッピングを実現することを目標としている。本会では、制限酵素 *Eco* RI および T7 RNA ポリメラーゼ (RPase) の DNA との相互作用を直視観察したので報告する。

酵素 1 分子の可視化は、ヘパリン樹脂に酵素を結合させて DNA 結合部位を保護してから、酵素のアミノ基にローダミン蛍光基を化学修飾することで行なった。ヘパリン樹脂を洗うことで未反応のローダミンと DNA 結合活性が低下した酵素分子を排除し、DNA 結合活性を保持した分子を精製した。蛍光標識された *Eco* RI、RPase とともに酵素分子は蛍光顕微鏡下で明るい輝点として検出され、また、生化学的アッセイにより活性を確認した。

DNA 上の特異的部位 (*Eco* RI の制限部位または RPase のプロモーター部位) の位置が特定されなければならない。そこで、スライドガラス表面にフローティングポテンシャル電極を構築し、静電気力で丸まった状態の DNA を伸長して電極端に固定した。ガラス部分をウェットエッチングにより掘り下げることで、固定化 DNA との表面吸着を防いだ。電極の幅と間隔長の違いによる λ DNA と T7 DNA の伸長固定化の効率の変化を調べたところ、電極の幅が 3 μm 、間隔長が 8 μm の場所により多くの DNA 分子が固定された。

Mg²⁺不在のとき、蛍光修飾 *Eco* RI の λ DNA 上での結合位置は物理地図での切断配列の場所と一致した。蛍光修飾 *Eco* RI と伸長固定化 DNA の非特異的部分との結合を観察したところ、*Eco* RI が DNA 上を滑り拡散するスライディング相互作用が同定された。現在、Mg²⁺存在下での *Eco* RI による DNA 切断と RPase の転写の可視化を試みている。

S. Matsumoto, H. Kabata, W.Okada, O. Kurosawa, and M. Washizu: Microscopic observation of *Eco* RI and T7 RNA polymerase interacting with stretched DNA.