実験技術

固定化 DNA による転写の動的解析

国立遺伝研・九大大学院医学研究科 寺田博之

国立遺伝研 嶋本伸雄

固定化 DNA

樹脂やカラムマトリックスに DNA を固定化する技術は歴史が古く、DNA セルロースや DNA アガロースカラム¹⁾に起源を持ち、現在も DNA に親和性を持つ蛋白質を精製するために用いられている。この方法は、DNA を結合の対象となるリガンドとして扱っているが、もっと積極的に、DNA を転写の鋳型のように cofactor として用いたり、組み換えや DNA 合成の基質として用いることも可能である。

DNA を端で固定する方法

固定化された DNA をこのように積極的に用いる目的には、DNA を特定の部位で樹脂に強固に結合し、DNA のそれ以外の部分の機能を損なわないようにしなければならない。そのなかで最も単純な方法は、DNA をその一端で固定する方法である。

DNA の端を固定する方法は、オリゴ DNA 合成に用いられるようなやり方もあるが、工業的規模の生産ではない限り、非共有結合でおこなうやりかたが最も便利である。この方法で現在開発されているものは、ビオチン・アビジンの結合を利用するか²⁾、抗原・抗体³⁾の結合を利用するものである。われわれは、バクテリオファージ T4 の DNA ポリメラーゼを利用して、ビオチン化ヌクレオチドを DNA の端に導入し、アビジンを介して樹脂に固定する方法を用いている (図 1)。

ほとんどの制限酵素による切断部位で固定化が可能である。100-10kbp なら、90% 以上の効率で固定化が可能であるし、45kb の λ DNA でも 50% 以上の固定化が可能である。

Immobilized operon as a kinetic tool for analyzing transcription.

Hiroyuki TERADA^{1,2}

Nobuo SHIMAMOTO¹

1 DNA Research Center, National Institute of Genetics

2 Graduate School of Medicine, Kyushu University

図 1. ビオチン・アビジンを用いた固定化オペロンの作製法

●印は DNA ポリメラーゼのエクソヌクレアーゼ III 型活性で削る限界点で塩基は dXTP と同じ

このように固定化された DNA は、固定化部位から 18b しか離れていない制限酵素部位でも、切断が可能で、固定化による立体障害は、固定化部位以外ではほとんど無いことがわかる。また、ビオチン・アビジンで固定化した DNA は 4℃ で保存すると、半年は安定で解離は観測できない。

固定化オペロンによる新しい方法論

固定化オペロンの転写における用途は 3 つある。第一は、精製された再構成系で、転写の機構を酵素学的レベルで研究することである。後述するように、新しい速度論的方法を用いることにより、動的機構の研究に寄与することができる。第二は、粗抽出液からなる転写系に用いることにより、転写複合体の精製や複合体の構成要素の同定、低分子の取り込み離脱の様子等を調べることができる。第三は、空間に DNA を固定することにより RNA ポリメラーゼのような DNA 関連酵素の運動を 1 分子で観察するという、1 分子ダイナミクスへの応用である。

希釈による反応の停止と転写複合体への調節因子の結合・解離

固定化オペロンで便利になった速度論的方法の第一は、希釈によって反応を停止することである。すべて、酵素反応が継続するためには、基質がある程度の濃度存在していなければならない。つまり、反応中に反応液を希釈して、基質濃度を低下させれば、実質的に反応は停止するはずである。希釈液は、なんでもよいが反応に用いた緩衝液そのものでもよい。これを高速希釈法 (rapid dilution) という (図 2 の一部に示す)。この方法の最大の長所は、反応液の成分を変えずに、

基質を用いて5秒おこなった。つまり、第一の反応でラベルが取り込まれたRNAがどのくらいあって、第二の反応でそれが伸びるかどうか見ているのである。

この図で明らかのように、RNAの伸長には少ししかアナログの効果は無いが(左a, c, e), 転写の開始と伸長の初期にたいしては大きな阻害効果を及ぼす(左b, d, f)。阻害は、合成速度の低下という形ではなく、長鎖RNAの本数が減少するという形で現われる。ここで用いた λP_R プロモーターからはAから転写が開始するので(AUG...の順)ATPのアナログの効果は転写開始とRNA伸長の初期との2つの段階に効果を及ぼし得る。そこで、転写の開始は、ATPより高い親和性を持つジヌクレオチドCpAで代用し、RNA伸長の初期のみATPアナログでATPの代用をした実験をおこなった。図には示していないが、転写開始をCpAでおこなっても、アナログでは長鎖RNAになる本数が減少した。RNA伸長の速度は、ATPの場合と比べてそれほど影響を受けなかった。一方、第一の反応のみを連続して転写をおこなったとき、アナログの存在下で、短鎖RNAの蓄積が観測されたことから(右f), 減少したRNAは、短いままで転写複合体から解離していると推定された。

RNAポリメラーゼは、RNA合成にヌクレオシド三リン酸の α , β 結合を要求するが、 β , γ 結合の役割は

自明ではなかった。一方、ほとんどのATPを基質とする反応は、 β , γ 結合を要求する。ATPaseやキナーゼなどすべてこの範疇にはいる。果して、RNAポリメラーゼがこのような酵素と同じ形でATPを要求するかどうかは20年来の問題であった。我々が得た結果は、図4のモデルで矛盾なく説明できた。ATPが加水分解されているのか、キナーゼの基質になっているのか、それとも分解されずにただアロステリックエフェクターとなっているのか、は不明であるが、ATPがRNA伸長の初期に長鎖RNAを作れるように酵素のコンフォメーションを維持していると考えることができる。

以上の結果は、大腸菌のRNAポリメラーゼで得られたものであるが、大腸菌特有の現象であるのか、もっと一般的な現象なのかを確かめるために、最も構造が簡単なRNAポリメラーゼと考えることができる、バクテリオファージのRNAポリメラーゼを用いて、同様な実験をおこなった。都合の良いことに、T7とT3ファージの典型的なプロモーターでは、RNAはGGGからスタートして、Aを最初は含まない。従って、固定化オペロンとRNAポリメラーゼを混ぜて、プロモーター・ポリメラーゼ複合体を作るときに、GTPを入れておいてGGGを合成させれば、転写の開始は予め完了させておくことができる。実験結果は、基本的には大腸菌の場合と同様であった。転写の伸長のスピードに多少アナログの効果は出たが、その効果を差し引いても、長鎖RNAの本数の減少が観測された。SP6 RNAポリメラーゼにおいても、T7, T3と似た結果を得た。つまり、原核生物のRNAポリメラーゼは、検討した酵素はすべて図4のモデルで説明できるものであった。

固定化オペロンを粗抽出液に用いた転写の各段階の同定

真核細胞の転写にもATPは必須である⁶⁾。このことを調べるために、Hela細胞の核抽出液を用いた例がある。アデノウィルスのMajor lateプロモーターを含むDNAを固定化したものを抽出液と混合し、転写複合体を形成する。核抽出液、複合体形成期、最初の基質を加えたとき、2番目の基質を加えたとき、と段階を追ってATPを加えた。この結果、2番目の基質と同時にATPが要求されることが分かった⁷⁾。つまり、転写開始か、伸長期の初期にATPが要求される。このことは、原核生物のRNAポリメラーゼが、RNA伸長の初期にATPを要求することと比較すると興味深い。

図4. 原核RNAポリメラーゼのRNA伸長反応におけるATPの役割

ATPの β , γ -結合が無いとRNAは短いままで脱落する量が増加する。

固定化オベロンによる DNA の立体構造の保持を利用した技術

両端を固定化した DNA を用いると、固定化されたままでは超らせん構造をとらせることが可能である。また、DNA を一定の方向に固定化することもできる。さらには、レーザーを用いた光ピンセット法で、1本の DNA の両端を捕捉することも可能になりつつある。このような技術は、単に DNA のコンフォメーションが転写に及ぼす影響を精密に測定するだけでなく、分子1つの動きを記録しようという1分子ダイナミクスに応用が可能である。この技術を用いて、RNA ポリメラーゼや DNA ポリメラーゼの動きを直接観察することができる。現在の技術の壁は、DNA を一定の空間配置に固定化することであり、我々は固定化 DNA の技術をこの方面に広げるべく努力している。

固定化の効果

固定化 DNA を、転写の鋳型として用いる固定化オベロン法は、すでに述べたように、新しいキネティクスやダイナミクスを可能にする汎用技術である。固定化された DNA を用いることによって、いろいろなアーテファクトを持ち込むことが有り得ることは、他の技術と同様である。しかし、細胞内で DNA は決して完全に遊離状態で存在しているのではない。もちろん、染色体 DNA は核マトリクスに固定化されているであろうし、この事情は、原核生物の遺伝子でも同様

である。比較的遊離状態に近いと思われるエピソームの DNA も、部分的に固定化されている可能性は否定できないのである。従って、固定化オベロンによるアーテファクトは、固定化自身によるのではなく、その時に用いた固定化の手段が原因になっている場合が多いであろう。いろいろな工夫が試みられるべき、楽しい分野にしたいものである。

最後に

著者の一人であります寺田博之がこの執筆中7月8日に逝去致しました。故寺田君の冥福を祈り、同君の研究成果に感謝しつつ本報をまとめました。

文 献

- 1) Alberts, B., Herrick, G. : *Methods in Enzymology* Vol. 21 (1971) pp198-201, Academic Press
- 2) Langer, P. R., Waldrop, A. A., Ward, D.C. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **77**, 6633-6637
- 3) 例えば、DIG ラベリングキット Boeringer Mannheim Reagent Catalogue
- 4) Shimamoto, N., Terada, H., Fujioka, M. (1991) *J. Cel. Biochem. Supplement* **15G** 245
- 5) Fujioka, M., Hirata, T., Shimamoto, N. (1991) *Biochemistry* **30** 1801-1807
- 6) Conaway, R. C., Conaway, J. W. (1988) *J. Biol. Chem.* **263** 2962-2968
- 7) Arias J. A., Dynan, W. S. (1989) *J. Biol. Chem.* **264** 3323-3329