

一分子可視化技術によるDNA－タンパク質相互作用の
動的メカニズムの解明

加畑 博幸

総合研究大学院大学
生命科学研究科
遺伝学専攻

平成6年度
(1994)

もくじ	頁
略語一覧	… 1
要 旨	… 2
第1章 緒 論	… 8
第2章 大腸菌RNAポリメラーゼホロ酵素のDNA上における 1分子ダイナミクス	
第1節 緒 言	… 15
第2節 実 験	… 16
第3節 結果と考察	… 29
第3章 <i>Pseudomonas putida</i> CamRリプレッサーのDNA上の スライディングとインデューサーの効果	
第1節 緒 言	… 46
第2節 実 験	… 49
第3節 結果と考察	… 60
第4章 総 括	… 79
結 語	… 84
引用文献	… 86
謝 辞	… 91

本博士論文では以下に示す略語を用いた。なお、試薬名など一般的な化合物の記載の仕方については I U P A C 則に準じた慣用名、化学式いずれかにしたかった。

A	--- adenosine
Abs	--- absorbance
Amp	--- ampicillin
bp	--- base pair (s)
Bicine	--- N,N-Bis (2-hydroxyethyl) glycine
BSA	--- bovine serum albumin
C	--- cytidine
d	--- deoxy
DMF	--- dimethylformamide
DNA	--- deoxyribonucleic acid
DNase	--- deoxyribonuclease
DPase	--- DNA polymerase
DTT	--- 1,4-dithiothreitol (threo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol)
EDTA	--- ethylenediamine tetraacetic acid
ELISA	--- enzyme-linked immunosorbent assay
EtdBr	--- ethidium bromide (3,8-diamino-5-ethyl-6-phenylphenanthridinium bromide)
G	--- guanosine
GC	--- gas chromatography
HPLC	--- high-performance liquid chromatography
IPTG	--- isopropyl-1-thio- β -d-galactopyranoside
MS	--- mass spectrometry
NTP	--- nucleoside 5'-triphosphate
OD	--- optical density
PAGE	--- polyacrylamide gel electrophoresis
PCR	--- polymerase chain reaction
pH	--- hydrogen ion concentration index
PMSF	--- phenylmethanesulfonyl fluoride
RNA	--- ribonucleic acid
SDS	--- sodium dodecyl sulfate
T	--- thymidine
Tris	--- tris (hydroxymethyl) aminomethane
U	--- uridine
UV	--- ultraviolet
VCR	--- video cassette recorder

§ 要 旨 §

1. はじめに

DNA結合タンパク質個々の機能は、長大なDNA上の特異的部位に結合し複合体を形成することで果たされる。転写反応ではRNAポリメラーゼホロ酵素がプロモーターと特異的に結合することで開始され、その調節にはリプレッサータンパク質とオペレーターとの特異的結合が関与している。このような結合がなされるまでの道程には、タンパク質がDNAと非特異的に結合した場所からDNAにそって1次元的に滑り拡散するという移動機構（スライディング）が介在していると考えられている。これまでに種々のDNA結合タンパク質のスライディングに関して速度論的研究が行なわれてきたが、未だ移動中間体そのものを同定した例はない。

そこでDNAとタンパク質の動的相互作用を可視化する技術を開発し、*Escherichia coli* RNAポリメラーゼと*Pseudomonas putida* CamRリプレッサーに適用した。まず、可視化したタンパク質1分子のDNA上における動態を直視観測することにより、スライディングの同定、ならびにDNA-タンパク質複合体の動的・静的性質の解明を試みた。さらにCamRタンパク質についてはリプレッサーとDNAとの相互作用に与えるインデューサーの分子的功能について検討した。

2. 方 法

DNAを伸張させ、かつ平行にスライドグラス上に固定したプレパレート「DNAベルト」を誘電泳動法により調製した。つぎに抗原-抗体反応とアビジン-ビオチン結合を利用して、DNA結合活性を破壊することなくタンパク質1分子に蛍光標識を付加した。そのタンパク質のDNAベルトにおける動態を光学顕微鏡を用いて可視化した。

3. 結果と考察

蛍光標識したRNAポリメラーゼおよびCamRリプレッサーの試料溶液をDNAベルトへ注入したところ、溶液のバルクフローが生じそれがタンパク質分子の運動に一定の方向性を与えた。DNAベルト上の分子運動をリアルタイムで追跡したところ、両方のタンパク質に共通した事象として、溶液のブラウン運動による「シンプルドリフト」、DNA上の特定部位で静止する「トラッピング」、視野に対して上下運動を行なう「ジャンピング」が観測され、さらにDNAにそって平行に移

動する「スライディング」を検出した。

後者3つはDNA結合に対する阻害剤（ヘパリンや、プロモーターあるいはオペレーターを含む遊離のDNAフラグメント）によって大きく抑制され、またいわゆるDNA結合部位をもたない抗体タンパク質やオリゴヌクレオチド、あるいはオリゴヌクレオチドと結合したタンパク質複合体では認められなかった。このことから、観測された3つの現象はRNAポリメラーゼやCamRリプレッサーのDNA結合活性に依ることが明らかとなった。さらに観測結果を統計処理したところ、トラッピングはDNAとの特異的結合を、スライディングは非特異的DNA相互作用を反映していることがそれぞれ示され、ジャンピングはループ状に固定されたDNA上のスライディングであると示唆された。スライディングは上記の動態の中でもっとも高い頻度で観察されたことから、タンパク質とDNAの間の主要で普遍的相互作用様式ではないかと予想された。スライディング中にプロモーターあるいはオペレーター部位でトラップされる現象も可視化され、タンパク質が特異的部位との結合までの道程としてDNA上をスライディングすることが可能であることを見出した。

本研究で可視化されたRNAポリメラーゼとCamRリプレッサーのスライディングは、見かけ上300 nm以上にわたる距離に及び、これまでの速度論的研究から求められてきたスライディングの平均長100 nmよりも長じていた。これは、（1）観測されたスライディングの平均時間（1から2 sec）と速度論的研究から報告された非特異的複合体の寿命（3 sec）が一致したこと、（2）DNAとの結合を許すだけの時間をタンパク質に与える範囲内であればバルクフローの速度と観測されるスライディングの平均距離がほぼ比例したこと、スライディングはタンパク質とDNAとの非特異的複合体の寿命の時間で規定されており、バルクフロー（溶媒分子とのより多くの熱衝突）の付与がより長いスライディングの距離を与えたためと結論した。

CamRリプレッサーとそのインデューサーである*d*-camphorを結合させてから、DNA上の分子動態を統計的に観察したところ、*d*-camphorはCamRリプレッサーのスライディングは阻害せず、トラッピングの頻度のみを大きく低下させた。このことからインデューサーの分子的役割は、スライディングを含む非特異的相互作用には影響を与えることなく特異的相互作用のみを破壊することであると考察した。

さらにCamRリプレッサーとDNAとの相互作用の静的側面に関して本研究で用いた直視観察技術を適用したところ、リプレッサーはいわゆるオペレーター配列

以外にも複数の特定部位と結合できることを示し、ゲルシフトアッセイ、免疫沈殿法などの生化学的な裏付け実験を行なった結果、親和性は弱いながらもそれらは確かに部位特異的な複合体であった。つまりDNAとタンパク質とのいわゆる非特異的複合体とは、（１）静的アッセイ法では捕捉できないスライディングのような動的複合体と（２）静的ではあるが用いた研究手段によっては検出できない弱い（寿命の短い）部位特異的複合体との総称であると言える。

Single-Molecule Dynamics of DNA-Protein Interaction

§Summary§

1. INTRODUCTION

Sliding, one-dimensional diffusion of DNA binding protein along DNA, is a mechanism proposed for translocation of protein from a site on DNA to another. Gene expression and regulation require binding of proteins to their specific sites on DNA buried in numerous nonspecific ones, and such binding may be facilitated if the proteins utilize the mechanism. So far, sliding has been suggested for several DNA binding proteins from kinetic studies. However, some studies provided negative evidence, and the intermediate of protein sliding along DNA has not been identified yet.

2. METHOD

To demonstrate the sliding, I have developed a microscopic method for observing single-molecule movements of DNA binding proteins on "DNA belt", in which DNA molecules are stretched in parallel and immobilized onto glass slide. I applied the method to *E. coli* RNA polymerase holoenzyme and *P. putida* CamR repressor, and directly observed their dynamic aspects of DNA binding and migration along DNA. To visualize the proteins, I used rhodamine-avidin as a fluorescent tag, and introduced it to single molecules of the proteins using biotinylated antibodies. The modified proteins retained their respective DNA binding activities.

3. RESULT AND DISCUSSION

When the solutions of the labeled proteins were injected between the cover slip and the slide, bulk flow of the solutions took place and the proteins were driven to the DNA belt. Observed traces of protein molecules

passing through the belt, in both cases of RNA polymerase and CamR repressor, were grouped into four modes; (1) "Simple drift" due to Brownian motion; (2) "Trapping" at specific sites on the immobilized DNA. The location of the sites agreed with the positions of promoters or operator, suggesting specific binding of the proteins to DNA; (3) Repetitive movements in and out of focus as if the protein molecules were "jumping" against a bulk flow; and (4) "Sliding" along DNA with the direction parallel to the immobilized DNA. Modes (2) to (4) disappeared when the DNA binding sites of the proteins were blocked with heparin or free DNA fragments containing promoter or operator, and were not found in the traces of IgG protein and oligonucleotide, both possessing no DNA binding sites. Therefore the binding to the fixed DNA caused modes (2) to (4), and mode (4) represented sliding along DNA. Jumping may be explained as sliding along DNA casually looped or vertically oriented.

Sliding was the most frequent among the modes, confirming that it was a true activity of the proteins. Since both RNA polymerase and CamR repressor showed sliding, it may be a ubiquitous mode of DNA-protein interaction. The same molecule sometimes exhibited both sliding and trapping, suggesting that sliding participates in promoter or operator search.

In the assay, sliding frequently occurred within a matter of seconds, consistent with the association rate constant as previously reported. However, RNA polymerase and CamR repressor apparently translocate along the immobilized DNA over several microns, which are longer than the mean sliding distance of about 100 nm estimated previously. The value of the distance is far below the resolution of the light microscope. The observed long-distance sliding is expected if an enzyme molecule can slide during a certain period within the lifetime of non-specific complex, giving longer sliding distance with faster bulk flow. In my observation, the period

seemed to be 1-2 sec, correlating well with the lifetime of 3 sec previously evaluated.

The microscopic method was applied to address not only dynamic but static interactions of visualized CamR repressor with DNA in the belt, in the presence or absence of its inducer, *d*-camphor. The inducer inhibits only trapping of CamR (specific DNA binding), but not sliding (non-specific interactions). The microscopic assay showed that CamR repressor weakly but specifically bound to several sites on DNA other than its original operator, indicating that so-called "non-specific complex" is a generic expression of a dynamic complex such as sliding state and a static one that is site-specific but too short-lived to be detected by an assay used.

第 1 章

緒 論

§ 第 1 章 §

緒 論

遺伝情報の発現、複製、およびそれらの制御は、主に DNA と DNA 結合タンパク質によって担われており、両者の間の相互作用が必須である。近年その作用様式について、タンパク質が DNA と結合したあとその上を移動したり¹⁾、構造を湾曲させたりする²⁾といったダイナミックな分子動態が想定されている。遺伝のメカニズムに関する種々の問題がそのような「動きを伴った相互作用」に及ぶようになると、現状では生化学的実験³⁾や顕微鏡観察⁴⁾などの間接的・静的情報から一連の動的機序を仮定し議論されているに過ぎない。

実際の分子機構をより深く追求するにはもはや DNA とタンパク質のダイナミックな相互作用機構を理解することが必要であり、そのためには DNA 上におけるタンパク質 1 分子の「動的実態を直接目で見える」こと以上に説得力をもつ方法は残されていないと考えた。そこにはおそらく、従来の平均化された静的なキャラクターを越えた、機能分子の本質が潜んでいると思われる。

このように「1 分子を可視化する技術」を開発、応用して、DNA とタンパク質の動的相互作用機構の解明に努めることが本研究における筆者の基本姿勢である。以下に本論文での研究対象と方策について述べる。

1. DNA-タンパク質間相互作用の概要

DNA 結合タンパク質の機能は、DNA 上の個々の特異的部位に結合し、複合体を形成することではじめて果たされる。たとえば、転写反応は RNA ポリメラーゼホロ酵素が DNA 上のプロモーター部位と特異的複合体を形成することによって開始され⁵⁾、その調節にはリプレッサータンパク質のオペレーター部位への特異的結合などが関与している⁶⁾。

ところがその一方で、RNA ポリメラーゼやリプレッサーなどの DNA 結合タンパク質一般は、特異的部位以外の DNA 部分にも結合していることが明らかとなってきた。タンパク質は特異的な標的部位までの道程として非特異的な DNA 部位を経由して移動しており、それに対して von Hippel らにより 3 種類のメカニズムが提案された (Fig. 1-1)^{1, 7)}。

1 つは 3 次元的に解離と結合を繰り返す最も簡単な機構である。しかしながら、DNA 結合タンパク質は巨大な高分子であるにもかかわらず、分子量から予測される 3 次元自己拡散よりも 10^2 倍以上も高速に長大な DNA 塩基配列の中から特異な部位を探知していることがわかってきた^{1, 8)}。このことから、タンパク質はもっぱら解離-結合運動だけを DNA 上の移動手段としているのではないと考えられている。

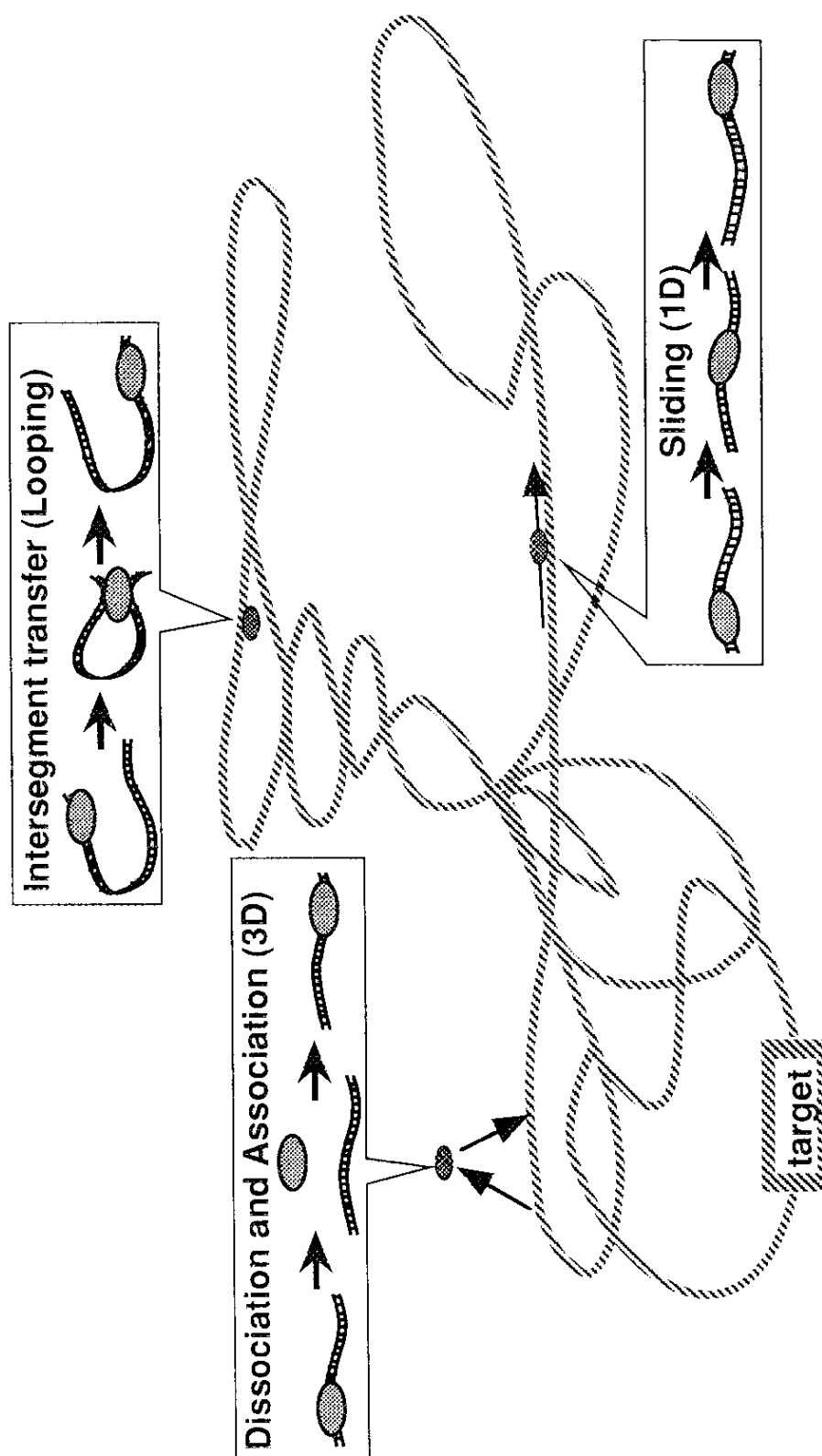


Fig. 1-1.
Dynamic aspects of DNA-protein interactions.
Three different mechanisms have been proposed for the translocation of DNA binding proteins from one site on DNA to another (after von Hippel *et al.*, 1989).

2つめは、DNAとの結合部位を複数有するオリゴマータンパク質が、DNAをループ状に橋渡ししてその間を移動するセグメント間転移である。AraCタンパク質⁹⁾や λ リプレッサー¹⁰⁾に関してDNaseIを用いたフットプリント法による移動中間体の同定がなされており、あるいはLacリプレッサーに関しては、ポリスチレンビーズで片端が標識されもう一端がスライドガラスに固定された特殊なDNA試料を用いた顕微鏡観測¹¹⁾が行なわれていることから、このモデルは広く受け入れられている。

そして最後がスライディングと呼ばれるもので、タンパク質が結合した場所からDNAにそって1次元的に滑り拡散するという移動機構である。これに則れば、DNAとタンパク質の巨大分子同士が拡散律速を越えて高速に結合可能で^{1, 7)}、そこから、生理的要求に対して調節タンパク質が迅速に特異的DNA結合をして対応しているのではないかという可能性も考えられる。

これまでにEcoRI、BamHI、PstIなどの制限酵素／修飾酵素¹²⁻¹⁵⁾や、バクテリア由来のリプレッサータンパク質^{7, 8, 16-18)}、DNAおよびRNAポリメラーゼ¹⁹⁻²⁵⁾など種々のDNA結合タンパク質に関してスライディングが報告されてきた。しかしながら、最初の報告から15年以上たった現在に至るまで、その存在を巡っては議論百出の状態である。その理由は、研究に用いられてきた測定法がもっぱら速度論的手段などによる間接的なものだけである点、結果の中には互いに反駁するデータがある点²⁶⁻²⁸⁾、などにあると思われる。唯一、Singer・Wuが迅速光クロスリンク法によりスライディングと考えられる移動中間体を捕捉したが²⁵⁾、それでも結局それは実験の性質上「静止像」として得られてしまう。

このようにスライディングに関しては、これまでの実験結果を統一的に理解しさらにメカニズムに関して検討を行なうまでにはほど遠いのが現状である。分子の動態を直に見た研究例がない。筆者はDNA-タンパク質間の「動きのある」相互作用機構を解明する一助として、まずこの問題に取り組むものである。

2. DNA結合タンパク質の1分子ダイナミクス

DNA結合タンパク質は、全般的に10から50 nmの大きさである。そのような検体1分子を直接可視化できる道具立ては、もっか電子顕微鏡や走査型プローブ顕微鏡などに限られているが、それらも未だ速い運動をリアルタイムで追跡できるまでには至っていない。

筆者はそうした点を回避するため、通常の光学顕微鏡を用いてタンパク質1分子の運動を可視化することを試みた。一般に光学系顕微鏡は、光の波長に起因する分解能の限界（Abbeの壁）のため μm 程度の解像力しか得られないとされているが、ビデオ増強顕微法の実

用化により位置の精度をnm分解能まで高めることが可能となっている^{29, 30)}。その原理は、視野内の各場所におけるフォトンの個数の違いを電氣的に増幅することにより、光の極大点が精密に位置決めできるというものである^{29, 30)}。したがって巧妙な光プローブをDNA結合タンパク質に付加すれば、分子の形はわからないまでも動態の直視観測を可能にし、運動量を高精度に計測することができる³⁰⁾。

1分子ダイナミクスはこのことを利用したアッセイ法で、分子の活性や相互作用を「目で見て」明らかにしようという技術である²⁹⁾。すでにアクチン-ミオシンの運動³¹⁾や細胞表面における膜タンパク質の拡散³²⁾などの研究分野に応用され始め、動きのあるメカニズムが直接観察されている。

3. スライディングの検出

そこで初の試みとして、1分子ダイナミクスアッセイをDNA結合タンパク質に適用しDNAにそったスライディングが検出できないかと実験を企画した。最も説得力のある証明法は、セグメント間転移のように中間体をきちんと同定することである。スライディングのように移動している中間体を捕捉するには、1分子の動態を直接観測する以外に手ではないと考えられる。

von HippelとBergは、1項で紹介したようなタンパク質のDNA上におけるスライディングはDNAと非特異的結合状態にあるタンパク質の受動的な酔歩運動であり、そのdriving forceはDNA近傍に静電収縮されたカウンターイオンの出入りに伴うエントロピー変化であると仮定している^{1, 7)}。よって、スライディングは、モータータンパク質のtight coupling式滑り運動³¹⁾やI型制限酵素のDNAにそった移動^{33, 34)}のようにATPのエネルギー消費で駆動されているのではないと考えられる。このことを踏まえ、つぎのようなスライディングのアッセイ法を計画した。方策をFig. 1-2に図示する。

DNAを伸張させかつ平行に固定したプレパラートを用意する。可視化したタンパク質の試料溶液をそこへ注入すると溶液のバルクフローが生じ、それが分子運動に一定の方向性を与えられる。DNA上のタンパク質分子を顕微鏡観測すると、DNAと結合しない分子はバルクフローに乗ってシンプルドリフトするだけだが、DNAと相互作用する分子は結合を反映した何らかの特徴的な動態が可視化されると予想される。さらにスライディングが存在するのなら、DNAの伸展方向に追隨するタンパク質分子の運動がフローに加して顕れると単純には期待される。

本研究ではこのようにスライディングの中間体を捕捉し、またタンパク質1分子のDNA上における動的実像を直視観測することによって、DNA-タンパク質相互作用の新し

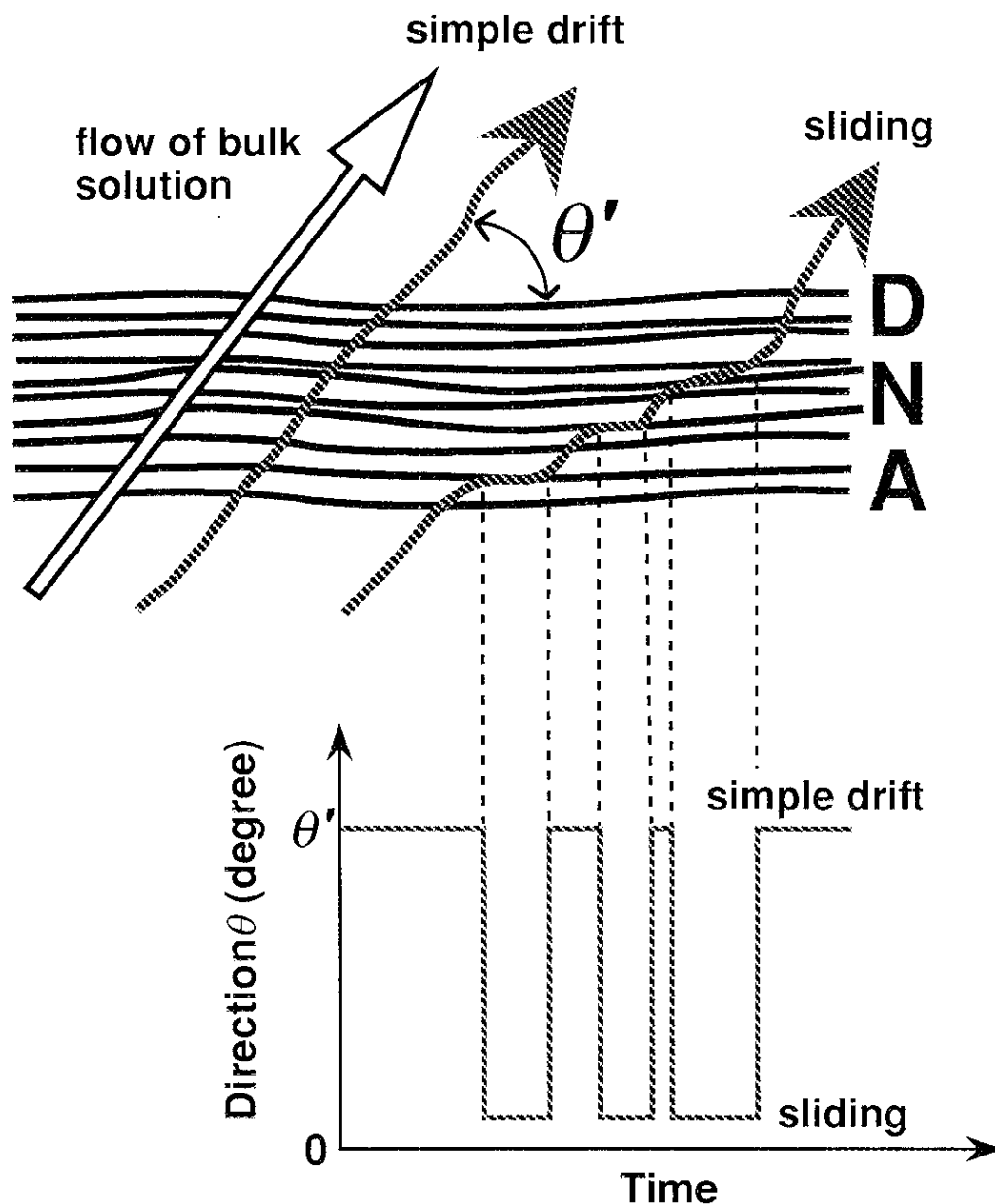


Fig. 1-2.
 Concept of the direct assay for sliding.
 Single molecules of DNA binding protein are visualized by fluorescent labeling (*vide* Fig. 2-3), and their movements are traced. Absolute value of the direction θ is monitored with respect to stretched DNA fixed at 0° (lower panel). DNA molecules are immobilized and extended in a common orientation by the method as described in Fig. 2-1. If the protein slides along DNA, it can be traced as a straight movement in parallel to the extended DNA (right trace), irrespectively of bulk flow.

い知見を得ようとするものである。また、Fig. 1-2で模式化したような新規な実験試料と研究手段の確立も合わせて行なう。

4. 本研究の対象

筆者は転写反応の中でも最も初期段階にある、特異的結合以前のDNA-タンパク質間相互作用に興味を抱き、1分子ダイナミクスの研究材料として大腸菌RNAポリメラーゼホロ酵素と*Pseudomonas putida* CamRリプレッサーを用いることとした。それらのタンパク質は転写においてそれぞれ異なる反応に携わっており機能上、さらに構造上大きな差があるので互いに良い比較対象となること、そしてともにDNA結合ドメインを1つしかもたないためLacリプレッサーの研究で結論に混乱を招いたセグメント間転移の影響^{18, 28)}を排除できること、などの理由で本研究に適していると思われる (Table 1)。また、大腸菌RNAポリメラーゼホロ酵素は非常によく研究がなされており知見も多く、さらにスライディングの存在が報告されている²¹⁻²⁵⁾。*Pseudomonas putida* CamRリプレッサーに関しては、生理活性や機能-構造相関などの研究が比較的最近始められたもので、それらへのひとつの寄与ともなることを期待した。

以下、それらタンパク質の性質、研究の背景などについて各章第1節で触れ、第2章ではFig. 1-2のようなDNA試料の調製法とタンパク質の光ラベル法について記載し、それらを適用した大腸菌RNAポリメラーゼホロ酵素とDNAとの動的相互作用について詳述する。第3章では*Pseudomonas putida* CamRリプレッサーのそのような1分子ダイナミクスについて、インデューサーの効果と合わせて検討した結果を述べる。第4章では上記2つのDNA結合タンパク質について観測した実像について論述し、スライディングとDNA-タンパク質相互作用の2点について考察する。

Table 1.
Properties of two DNA binding proteins used in this study.

Protein	RNA polymerase holoenzyme §	CamR repressor ¶	references
Microorganism	<i>Escherichia coli</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	§ 5), 32)
Subunit	multimer, $\alpha 2 \beta \beta' \sigma$	homodimer	¶ 36), 37)
Molecular weight	449,000	47,800	
DNA binding domain per protein	1	1	
Intersegment transfer *	(supposed to be) impossible	(supposed to be) impossible	* 1), 7)
Specificity	Promoter (T7A1, λ PL, λ PR, - - -)	Operator of <i>camDCAB</i> operon	
Effector on DNA binding	heparin (competetive with DNA)	<i>d</i> -camphor (inducer)	

第2章

大腸菌RNAポリメラーゼホロ酵素のDNA上における 1分子ダイナミクス

§ 第 2 章 §

大腸菌 RNA ポリメラーゼホロ酵素の DNA 上における

1 分子ダイナミクス

第 1 節 緒 言

転写反応の初期過程では、大腸菌 RNA ポリメラーゼホロ酵素が DNA 上の膨大な数の非特異的部位の中からプロモーターを探索して特異的結合を行なう。スライディングがそのようなプロモーター探索に関与していることが速度論的研究から指摘されており^{1, 2)}、本研究での 1 分子ダイナミクスアッセイでも、このような特異的結合やスライディング、あるいは両方が加した現象が可視化されることが期待される。

そこでホロ酵素と DNA の相互作用を可視化する上で問題となるのは、いかに DNA 結合活性を損なうことなくタンパク質に光ラベルを付加するかである。また、ホロ酵素 ($\alpha_2\beta\beta'\sigma$ サブユニット構造、前章 Table 1) のプロモーター認識は σ サブユニットが担っているため³⁾、上で述べたような特異的結合を反映したイメージを捕捉するためには、とくに σ サブユニットにダメージを与えないよう留意する必要があると考えられる。

さて、DNA 上におけるタンパク質の 1 分子ダイナミクスを観測するとき、DNA も遊離してランダムなコンフォメーションしてはタンパク質分子の運動が十分に計測できない。とりわけ本研究では前章で述べたような特殊な配置をした DNA 試料が求められ (Fig. 1-2)、また、1 分子のタンパク質の DNA への結合を観測するためには多量の DNA が存在しなければならない。したがって DNA の位置と配向性を精密に制御することが不可欠となるが (Fig. 1-2)、DNA 分子を大量にかつ機械的に操作することは極めて困難である。そこで、Washizu・Kurosawa により開発された「薄膜電極を用いた DNA の誘電泳動」⁴⁾ という DNA 分子の新規なマニピュレーション技術の導入を試みる。

以上の知見に基づいて組み立てた実験の具体的操作を次節で述べ、第 3 節では可視化したホロ酵素 1 分子の伸張固定化 DNA 上における動態を直視観測し、ホロ酵素がスライディングするのかどうかを検討した結果について報告する。

§ 第 2 章 §

第 2 節 実 験

《一般的手法・各項共通の操作》

1. 機器分析

- ・ UV スペクトルは日本分光(株)製のUbest-30型分光光度計を用いて測定した。
- ・ H P L C は東洋曹達(株)製のCCPE型ポンプで行ない、検出器には日本分光(株)製875-UV型を、出力計にはアトー(株)製SJ-3462型を使用した。
- ・ 放射能はBECKMAN社のLS-5801型液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。
- ・ 超遠心による分離分析はBECKMAN社のTL-100型をスイングローターTLS-55型と併用して行なった。
- ・ クロマトグラフィーは、特に断わりのない限りPharmacia-LKB社製の充てんカラムまたは分離担体を使用し、同社Smart™システムで運転して行なった。

2. 培養・精製⁵⁾

- ・ インキュベーターは、微量体積のサンプルには主にM&S INSTRUMENTS社のDB-3L型を、培養など量の大きなものには主としてADVANTEC社のCI-310型を用いた。
- ・ 菌の大量培養には、東京理科機械(株)のMINI JARFERMENTOR M-100型（1.5 l規模）か(株)丸菱バイオエンジのMDL-4CR型（8 l規模）を用いた。
- ・ 菌の破碎はKriens-Luzern社製のKINEMATICA CH6010型ブレンダーとTOMY精工社のUD-201型ソニケーターを用いて行なった。
- ・ 集菌など低速遠心を行なうときには、トミー社のRL-101型をスイングローターTS-7と併せて使用した。冷却するときは日立製のSCR18-B型とアングルローターRPR10-2または20-2を併用した。
- ・ 超遠心はBECKMAN社のL5-50型とアングルローターtype-35を用いて行なった。

3. 電気泳動に関する操作

核酸やタンパク質の電気泳動、染色、可視化、および写真撮影など一般的な分離分析法は文献^{5, 7)}に従った。ただしタンパク質の銀染色はMorrisseyの方法⁸⁾によった。

- ・ サブマリン式アガロースゲル電気泳動は(株)アドバンス製のMupid-2型（ミニゲル）かアトー(株)製のAE-6110型（大型ゲル）を用いて、S D S - P A G E または未変成アクリルアミドゲルでの電気泳動はアトー(株)製のAE-6050型を用いてそれぞれ行なった。電圧

供給装置はKikusui社製PAB-320型を使用した。

- ・RNA転写産物の分離あるいはDNA塩基配列のシーケンシングには、アトー(株)製のAE-6140型を、BIORAD社製PAB-320型を電源として使用した。
- ・オートラジオグラフィーは、富士フイルム社のFUJIX BAS-2000を用いて行なった。

4. E L I S A

主に文献⁹⁾に従った。Falcon社のNo. 3915プレートおよび東洋曹達(株)製のMPR-A4型マイクロプレートリーダー（干渉フィルター；サンプル側405 nm、リファレンス側600 nm）を用い、発色反応には二次抗体としてgoat anti-rabbit IgG Peroxidase conjugate（EY LABS社）とPeroxidase Substrate ABTS kit（VECTOR LABORATORIES社）を選択した。

5. 顕微操作

顕微鏡は(株)オリンパス製のBH2型を使用した。蛍光像の観測には同社の落射蛍光型装置RFL BHS型を併用した。検体のイメージングは浜松ホトニクス(株)製のsilicon intensifying tubeカメラC2400-08を、G励起蛍光強度測定、距離測定その他種々の計測は同社製画像解析装置DVS-3000を用いて行なった。記録はPanasonic社のVCR、AG-7300型とAG-7500A型で行なった。

6. その他

- ・濾過にはすべてMILIPORE社のウルトラフリーフィルターを使用した。
- ・高速微量遠心はTOMY精工社のMCX150型あるいはMRX150型で行なった。
- ・透析膜は、微量試料についてはSPECTRUM MEDICAL INDUSTRY社のSpectra/Porシリーズから適宜分画ポアサイズを選択してそのまま使用した。数mlを越える体積の試料を透析するときは、三光純薬(株)のセルロースチューブ20-32-100を文献¹⁾に従って前処理してから用いた。

以上、記載のないものは市販品、家電製品を使用した。

《各項共通の試料一覧》

1. 試 薬

- ・ caseinタンパク質はアルカリ部分分解処理によりribonuclease様活性が除かれたものを総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻の嶋本伸雄先生より供与いただいた。
- ・ avidinタンパク質は太陽化学(株)から鶏卵白由来のものを購入して使用した。
- ・ biotin (vitamin H) はSIGMA社製を使用した。
- ・ 各NTP、dNTPはヤマサ醤油(株)から購入した。
- ・ ラジオアイソトープはICN社から購入して用いた。
- ・ Ampは明治製菓(株)製の注射用アンピシリンナトリウムを100 mg · ml⁻¹の濃度になるようにDMFに溶かして使用した。
- ・ タンパク質の変性剤には、関東化学(株)製のguanidium chlorideを緩衝液に溶かした6 Mまたは8 M濃度の溶液を使用した。また、除タンパクのためのphenol-chloroform溶液は、文献⁵⁾に従い調製した。

その他特に注のない限り、化学薬品は特級品を関東化学(株)から購入して使用した。B S Aなどのタンパク質、分子生物学用試薬は東洋紡(株)製を使用した。また、一般的な試薬の調製と使用は主に文献^{5, 6)}に従った。

2. 溶 液

反応・精製などに頻繁に用いた緩衝液の略称と組成・終濃度は次のとおり。

PBS	… 6 mM Na ₂ HPO ₄ / 1.5 mM KH ₂ PO ₄ [pH7.9], 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 0.02%(w/v) NaN ₃ .
S-Buffer	… 10 mM Tris · Cl ⁻ [pH8.0], 50%(v/v) glycerol, 200 mM KCl, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA.
TE	… 10 mM Tris · Cl ⁻ [pH7.8], 1 mM EDTA.
TGE	… 10 mM Tris · Cl ⁻ [pH7.6], 5%(v/v) glycerol, 0.1 mM EDTA.
TGED	… 10 mM Tris · Cl ⁻ [pH7.6], 5%(v/v) glycerol, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT.
T-Buffer	… 44 mM Tris · Cl ⁻ [pH7.9], 10 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl, 1 mM DTT, 400 μg · ml ⁻¹ BSA.
T4DPase Buffer	… 67 mM Tris · Cl ⁻ [pH8.8], 6.7 mM MgCl ₂ , 16.6 mM (NH ₄) ₂ SO ₄ , 6.7 μM EDTA, 1 mM DTT.

上記にないものはそれぞれの実験でのみ使用され、その都度記載される。

《スライドガラス表面上におけるアルミ薄膜電極の作製》

Washizuらの方法^{4, 10)}に従い、physical vapour deposit (PVD) 法あるいは光リソグラフィ法にて作製した。ただし、スライドガラスの前洗浄には、ガラス表面にあるシラノール基の脱プロトン化を防ぐためpotassium hydroxideではなく、クロム酸混液 (12.7 g/100 mlのpotassium dichromate 水溶液に50 mlの濃硫酸を加えたもの) を用いた。

機器

- ・PVDには、(株)Nilaco社製タングステンボートを装着したJEOL社のJEE-5B型真空蒸着装置を使用した。
- ・光リソグラフィに際して、スピンコートはMIKASA社の1H-D3型で行なった。
- ・同じく光露光 (高圧水銀灯) には、同社MA10型を用いた。

試料

- ・アルミ電極作製のタングステン製マスク (76 mm×26 mm、ギャップ幅100 μm) は、成蹊大学の鷺津正夫先生から供与された。
- ・アルミニウム線 (1.0 mm径×10 m、99.99%純度) は(株)Nilaco社から購入した。
- ・スライドガラス(76 mm×26 mm)とカバースリップ (18 mm×18mm) はMATUNAMI社製のものを使用した。
- ・ポジレジスト液と現像液には、それぞれSHIPLEY社のS1400-25とMF-319を用いた。
- ・エッチング液は、40% NH_4F 水溶液 600 mlと49% HF 水溶液 100 mlを混合して調製した。

PVD法

清浄なスライドガラスとタングステンマスクをクリップ止めして真空蒸着装置のベルジャー内に設置した。ベルジャー内の圧力が 10^{-4} Pa以下の真空に達したところで、あらかじめタングステンボート上に置かれたアルミ線 (約30 mm長) を蒸発させ、マスクに覆われていないガラス部分にアルミの薄膜を積層させた。ギャップの幅が一樣で電極端がきれいにそろっているものを顕微鏡にて検査し、それに適ったものをデシケーター中で保存した。

光リソグラフィ法

PVD法によりアルミを一面に蒸着させたスライドガラス基板にポジレジスト液を数滴落とし、スピンコーターにより500 rpmで5 sec、さらに4000 rpmで40 sec回転させて均一に塗布した。ホットプレート上でスライドガラス基板を110℃で50 sec間乾燥させた後、タングステンマスクを介して約15 secの間高圧水銀灯下で露光させ、60 sec現像液原液中に浸漬させた。蒸留水で余分な現像液を洗い流し、140℃、5 minのポストバーク後、エッチング液に20 min間浸漬させた。エッチング処理後蒸留水とアセトンでアルミを剥離させ、電極のギャップ部分を作製した。品質検査を行ないデシケーター中で保存した。

機器

- ・高周波高電圧発生装置にはNF ELECTRONIC INSTRUMENTS社のFG-161型を使用し、IWATA社製SS7605型シンクロスコープによって印加をコントロールした。
- ・ベルト内のDNA分子の分布状態、3次元の配向性はMeridian Insight社のレーザー共焦点顕微鏡Okemis MI型を用いて測定した。

試料

- ・T7 Δ D111 DNAおよび λ cl^{ts857}Sam7 DNAは総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻の嶋本伸雄先生から供与されたものを使用した。
- ・アルミ薄膜スライドガラス電極は前項で調製したものを使った。
- ・biotin-dUTP (biotin-16-2'-deoxyuridine-5'-triphosphate) 4Li塩はBoehringer Mannheim(株)から購入した。

方法

(1) キュベットにT4DPase Bufferと2.7 unitsのT4 DPase、2.5 nmolのbiotin-dUTP、そして10 μ gのT7 Δ D111 DNAまたは λ cl^{ts857}Sam7 DNAをとり、37 $^{\circ}$ C、20 min間インキュベートした(全体積30 μ l)。ただし、 λ DNAを用いたときは酵素添加前に60 $^{\circ}$ Cで10 min間、続いて氷上で10 min間静置することにより、cos site間でのアニーリングを解消した。

(2) 3'→5'exonuclease反応後、終濃度1 mM分のdATP、dCTP、dGTP混合物を添加してさらに0.5 hrインキュベートした。その後0.5% SDS含有phenol-chloroform溶液で除タンパク(60 $^{\circ}$ C、10min)を行なってから^{5, 6)}、塩と未反応のdNTPを透析(外液に滅菌水、4 $^{\circ}$ C、6 hr)して除いた。UV測定からDNA濃度を決定し(収率80%)、0.7%アガロースゲル電気泳動から試料の移動度と均一性を確認した。

(3) biotin基がDNAに導入されたことを確認するため、このDNA試料1 nMとavidinタンパク質600 nMを300 mM sodium chloride 含有TE溶液中で反応させて0.7%アガロースゲル電気泳動で分析した¹²⁾。DNAのみの場合と異なり、avidin存在下では試料はゲルのウェルからほとんど泳動されなかった。このようなゲルシフト効果はDNA試料への大過剰のbiotinの添加により解消された。またbiotin導入前のDNAにはこのようなavidinの影響は見られなかった。

(4) 以上のように調製したDNA 1 μ g分の水溶液とavidin 0.4 μ g分の水溶液を滅菌水20 μ lに加えて常温で30 min反応させ、avidinとDNAの両末端にあるbiotin基とを結合させた。これを20倍に希釈して5から15 μ lをアルミ薄膜スライドガラス電極のギャップのすぐ横に滴下し、すぐさま高周波高電圧の印加(1 MHz、10から20 KVpp \cdot cm⁻¹)を開始した。迅速

にカバースリップを滴の上にかぶせ10から30 min間、1 secの周期断続を繰り返すことによりDNA分子の誘電泳動を行なった（DNAベルト；Fig. 2-1）。avidinのガラス表面への吸着によりDNAベルトはスライドガラスに固定される。

（5） 通電を止め、カバースリップをはずし滅菌水で洗浄してから、casein（10 mg・ml⁻¹）水溶液でガラス部分の上を一様に被い1 hrほど室温で放置してさらなるタンパク質の吸着を防止した。新しい清浄なカバースリップにも同様なコーティングを施し、DNAベルトの上に置いた。

（6） ベルトの蛍光像を得るときは0.5 μg・ml⁻¹のEtdBrで染色してから通常の顕微鏡または共焦点顕微鏡を用いて可視化した（Fig. 2-1、Fig. 2-2）。その後1 mM MgSO₄水溶液で3 hr脱色した。

《大腸菌RNAポリメラーゼ（野生型）の精製》

Burgess・Jendrisak^{1 3)}、Gonzalez^{1 4)}らの方法を参考にした。精製に関するすべての操作は4℃下で行なった。

機器

- ・クロマトグラフィーはATTO社製のPERISTA ポンプで行ない、グラディエント溶出には同社製AC-5900型グラディエントコントローラーを併用した。検出器（UV280 nmでモニター）と出力計は同じくAC5200L型およびSJ-3462型を使用し、分画はPharmacia LKB社製のフラクションコレクターRediFrac型を用いた。カラムは適宜下に挙げたものを選択して使用した。
- ・DNAセルロースカラムは以下のように調製した。150 mlのTE溶液に0.3 gのsalmon sperm DNA（WORTHINGTON BIOCHEMICAL社）と100 gのfibrous cellulose powder CF11（Whatman社）を加え、均質になるまで約2 hr練った。これをエタノールに懸濁・攪拌しながら、トランスイルミネーターでUV光（254 nm）による照射を2 hr行なった。Buchner漏斗を使って洗浄し3日間そのまま風乾させた後、TGEDに再懸濁してカラム（BIORAD社製2.5 cm I.D×50 cm）に充てんした。一部この懸濁物を取り、煮沸処理（30 min間沸騰水中で放置）して遊離してくるDNAをUV測定により定量したところ、cellulose担体1 ml当量へのDNAの固定化量は0.1 mgであった。
- ・ゲル浸透カラムクロマトグラフィーはBIORAD社のBio-gel A5mを担体とし、Pharmacia LKB社の2.6 cm I.D×70cmオープンカラムに充てんして用いた。
- ・カチオン交換カラムクロマトグラフィーはBIORAD社のBio-Rex 70をPharmacia LKB社の

2.6 cm I.D×70 cmオープンカラムに充填して行なった。

- ・塩濃度の確認は、HORIBA社製の導電率計C-173型を用い電気伝導度を測定して行なった。

試料

- ・大腸菌K12株（野生型）は、国立遺伝学研究所遺伝情報研究センターの永井宏樹先生から供与された。これをファーマンターを使用して8 lのLB培地中で4回大量培養した。前培養以降のファーマンターでの大量培養ではAmpなどの抗生物質は使用しなかった。集菌は菌液がOD₅₅₀ = 6.0に達した時点で行ない、計300 gの菌体を得た。これを-80℃で凍結保存した。
- ・POLYMIN P（BRL社）は10%(V/V)の水溶液とし、hydrochloric acidでpHを8.0に調整した。
- ・精製に用いた溶液のうち初出のものは下記のとおり。

G-Buffer … 50 mM Tris · Cl⁻ [pH8.0], 5%(v/v) glycerol, 2 mM EDTA,
233 mM NaCl, 1.1 mM DTT, 132 μM PMSF,
130 μg · ml⁻¹ lysozyme（和光純薬(株)）。

PiG50 … 40 mM KH₂PO₄ · OH⁻ [pH8.0], 50%(v/v) glycerol,
5 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM EDTA.

方法

（1） 150 gの菌体を氷冷したG-buffer 450 mlの中で破碎後、0.2 M NaCl/TGED溶液を600 ml加えて7500 rpmで4℃、1 hr遠心した。上清をとり、終濃度0.57%になるようPOLYMIN Pをよく混合して氷中に静置した。

（2） 6000 rpm、4℃で30 min間の遠心で沈殿を回収後、そこへ0.5 M NaCl/TGED溶液を600 ml加えてテフロンホモジナイザーにより沈殿を十分に洗浄した。再度遠心で沈殿を得、今度は1.0 M NaCl/TGED溶液を600 ml加えてテフロンホモジナイザーで懸濁することで、沈殿相から上清相にポリメラーゼを分配回収した。不要な沈殿物は同様な遠心操作により除いた。

（3） その上清（400 ml）に140 gの(NH₄)₂SO₄を添加し4℃で30 min放置してから、8000 rpm、45 minの遠心を行ないタンパク質の沈殿を得た。これを385 mlのTGEDに溶かし、その4℃での電気伝導度を6.5 mS · cm⁻¹（NaCl濃度換算値およそ0.15 M）に調整した。

（4） その試料を0.15 M NaCl/TGED溶液で平衡化したDNAセルロースのオープンカラムにロードし、溶離液TGED、流速60 ml · hr⁻¹、グラディエントモード0.15 Mから1.0 MのNaCl濃度勾配、20 hrのアフィニティークロマトグラフィーを行なった。各画分についてRNAポリメラーゼの比活性を測定し（次項）、活性画分240 mlを得た。タンパク質は84

gの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を添加・遠心することによって沈殿回収した。

(5) この沈殿を30 mlのTGEDに溶解して溶離液0.5 M NaCl/TGED溶液、流速100 ml · hr⁻¹、6 hrのゲル浸透カラムクロマトグラフィーを行なった。同様にして活性画分100 mlを回収し、200 mlの飽和 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 水溶液を注いで一晩放置後タンパク質を遠沈した。

(6) 沈殿を電気伝導度が0.6 mS · cm⁻¹になるまでS-Bufferで溶解・希釈してから、Bio-Rex 70カラムにロード後、溶離液0.3 M NaCl/PiG50溶液、流速12 ml · hr⁻¹、11 hrの溶出によりホロ酵素を、さらに連続して溶離液0.8 M NaCl/PiG50溶液、流速12 ml · hr⁻¹、8 hrのステップワイズ溶出を行なうことによりコア酵素を、それぞれ精製した。

(7) 以上の操作を残りの菌体150 gでもう一度繰り返す、最終的にホロ酵素40 mg、コア酵素66 mgを高純度で得た (UV測定ならびにSDS-PAGEと銀染色による)。これをdiethyl pyrocarbonate処理したS-Bufferを外液にして透析し-80℃で保存した。

《RNAポリメラーゼの活性測定》

1. 酸不溶性画分への放射能の取り込み

(たとえば前項(4)において)

1.0 ml容キュベットにT-bufferをとり、粗抽出液を10 µl、salmon sperm DNA 250 ng、各NTPを5 nmolずつ、そして $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 1 µCiを加え37℃で20 min反応させた (全体積50 µl)。これに10 µgのbaker's yeast tRNA (Boehringer Mannheim(株))、100 mMのEDTA 50 µl、氷冷した100%trichloroacetic acid 11.1 µlを加え10 min氷上で静置した。あらかじめエタノールと純水で湿らせておいたグラスフィルターディスク (Whatman社製GF/C)の上にサンプルをのせ、5%trichloroacetic acid水溶液で3回リンスした。純水を満たしたバイアルにグラスフィルターを詰めてから放射能を計測し、ポリメラーゼの比活性を求めた。

2. シングルラウンドの転写反応

(たとえば次項(7))

鋳型には、DNAベルト用にavidinタンパク質を両端に導入したT7 ΔD111 DNAを用いた。gel loading bufferには80%(v/v) formamide (ナカライテスク(株))、89 mM boric acid、微量のbromophenolblueとxylene cyanol FFを含むTE溶液を、それぞれ使用した。

(1) 30 fmolの鋳型DNAと130 fmolのRNAポリメラーゼホロ酵素 (野生型および再構成型)をT-Buffer中 (全体積8 µl)で37℃、10 min間インキュベートしてopen complexを形成させた。そこに15 µCiの $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を含むATPを50 pmol、GTP、ATP、CTPを各1 nmolずつ

つ、そして200 ngのheparin（ナカライテスク(株)）を加え、37℃で2 min反応させた（全体積10 μ l）。場合によってアイソトープには $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{UTP}$ を代用した。

（2） EDTAを終濃度30 mMになるように加えて反応を停止させた。反応液にphenol-chloroform溶液による除タンパク処理とethanol（0.3 M sodium acetate、20 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ glycogen含有）による核酸の沈殿を施してから^{5, 6)}、5 μ lのgel loading bufferに溶解し60℃で10 min静置した。

（3） 7 M Urea含有6%ポリアクリルアミドゲルにロードし、1500 Vで2.5 hr電気泳動した。ゲルを80℃、2 hr乾燥後、イメージングプレートへ露光しオートラジオグラフィーを行なった。

《RNAポリメラーゼの再構成》

Zalenskayaら¹⁵⁾、Igarashiら¹⁶⁾の方法を参考にした。精製に関するすべての操作は4℃下で行なった。

試料

- ・ ホロ酵素のサブユニット α ならびに σ タンパク質は総合研究大学院大学生命科学研究科遺伝学専攻の嶋本伸雄先生から供与されたものを使用した。
- ・ 大腸菌BL21(DE3)株（*hsdS gal* (λ cl_{ts}857 *ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1*))、およびホロ酵素のサブユニット $\beta\beta'$ の遺伝子をクローンしたプラスミドpGEMBCは国立遺伝学研究所分子遺伝研究部門の藤田信之先生から提供いただいた。
- ・ 用いた溶液のうち初出のものは下記のとおり。

Lysis-Buffer … 50 mM Tris \cdot Cl⁻ [pH8.0], 300 μ M PMSF, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ lysozyme, 0.8%(w/v) deoxycholate（和光純薬(株)）。

Triton-Buffer … 50 mM Tris \cdot Cl⁻ [pH8.0], 10 mM EDTA, 300 mM NaCl, 5%(v/v) Triton X-100（ナカライテスク(株)）。

Reconst 1 … 10 mM Tris \cdot Cl⁻ [pH7.8], 15%(v/v) glycerol, 0.1 mM EDTA, 500 mM KCl, 1 mM PMSF, 10 mM MgCl₂, 5 mM 2-mercaptoethanol, 6 M deionized urea（BIORAD社）。

Reconst 2 … 50 mM Tris \cdot Cl⁻ [pH7.8], 20%(v/v) glycerol, 0.1 mM EDTA, 300 mM KCl, 1 mM PMSF, 10 mM MgCl₂, 1 mM DTT。

方法

- （1） electroporationによりpGEMBCを菌に導入し形質転換株を得、前培養を経て（対数

増殖期手前で植菌)、1.6 lのLB培地 ($0.2 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ Amp含有) 中ジャーファーマンターを用いて大量培養した。 $\text{OD}_{550} = 1.0$ に達したところで迅速に終濃度 0.5 mM になるようIPTG (和光純薬(株)) を添加しインダクションを行なった。

(2) IPTGを加えてから1.5 hr後に集菌したあと、これに75 mlのLysis-Bufferを注いで懸濁し氷上で40 min静置した。さらにソニケーターで菌を破碎してから遠心で沈殿を回収した。

(3) 沈殿 (インクルージョンボディ) をテフロンホモジナイザーを使ってTriton-Buffer 50 ml中に懸濁し、5 min室温に静置、遠心で再度インクルージョンボディを回収する操作を2回繰り返した。

(4) 同様に2 μl の2-mercaptoethanolと20 mlの6 M guanidium chloride/TGED溶液を加えてテフロンホモジナイザーで十分に懸濁することにより、 $\beta\beta'$ タンパク質をインクルージョンボディから液相へ抽出した。3回繰り返して40 mlの上清を得、 $85,000 \text{ g}$ 、 4°C 、2 hrの超遠心を行ない核酸などの夾雑物を遠沈させて取り除いた。上清を回収しそのままの状態では -80°C にて保存した。UV測定とSDS-PAGEにより $\beta\beta'$ タンパク質の収量は160 mg、純度は24%と見積もった。

(5) 100 mlのReconst 1に α サブユニット0.8 mgと(4)で得た $\beta\beta'$ サブユニット約4 mg相当分を取り、よく攪拌してタンパク質を変性させた。この溶液をセルロースチューブ (三光純薬(株) 20-32-100) に詰め、外液1 lのReconst 2に対し24 hr間透析を行なった。その際、膜をモーターにつなぎ試料自体を回転させることで十分に攪拌させ、ゆっくりとタンパク質を復元させた。外液は6 hrおきに4回換えた。

(6) あらかじめ 37°C に加温した500 mlのTGEDの中にその試料をセルロースチューブごと浸漬し、30 minインキュベートすることで、試料のコア酵素への再構成化を行なった。反応後、試料溶液を $0.2 \mu\text{m}$ のフィルターに通し、即座にクロマトグラフィーによる2段階精製を行なった (HiTrap heparinとMonoSカラムによる)。溶出条件はいずれも溶離液TGED、流速 $0.3 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 、グラディエントモード 0.1 M から 1.0 M のNaCl濃度勾配で、各段階で90 min費やした。HiTrap heparinカラムでは主に遊離の α サブユニットを、MonoSカラムでは $\alpha_2\beta$ タンパク質を除くことができ、最後に高純度のコア酵素だけを単離した。それをS-Bufferで透析した後、使用まで -80°C で保存した。収量は0.3 mg。

(7) さらにホロ酵素への再構成は、必要量のコア酵素に σ サブユニットをモル比で1.3倍過剰加え、Reconst 2緩衝液中で 37°C 、1 hrインキュベーションして行なった。ホロ酵素はTSKgel DEAE-5PWカラム (東洋曹達(株)) を用いたアニオン交換クロマトグラフィーにより精製した。比活性を前項の測定方法により求めたところ、野生型の精製標品 (前々項)

と同程度であった。

《RNAポリメラーゼ1分子の可視化》^{11, 19)}

Fig. 2-3のスキームにそって、抗原抗体結合とavidin-biotin結合を利用し蛍光発色基を間接的に1分子のホロ酵素へ導入した。

試料

- ・ TRITC (tetramethylrhodamine -5 (and -6)- isothiocyanate) はMOLECULAR PROBES社製のものをdimethylsulfoxideに溶解して使用した。
- ・ NHS-biotin (biotin N-hydroxysuccinimide ester) はPIERCE社から購入し、dimethylsulfoxideに溶解して使用した。
- ・ β' サブユニットのカルボキシル末端 (アミノ酸残基で1386番から1407番目まで) に結合するanti- β' IgGタンパク質は、Nottingham大学のRobert E. Glass先生とStefanie A. Margaron氏から提供された。これは β' のC7ペプチドと β -galactosidaseとの融合タンパク質をrabbitに免疫し調製されたポリクローナル抗体である。
- ・ 用いた緩衝液で、初出のものは次のとおり。

B-Buffer ... 20 mM Bicine · Cl⁻ [pH8.0] (同仁化学), 1%(v/v) glycerol,
150 mM NaCl.

“蛍光タグ”の調製

タンパク質のリジン残基等の1級アミンとTRITCのイソチオシアネート基の化学反応を利用することでavidinをRhodamine修飾した。

Hen-egg avidin 2.6 mgとTRITC 0.1 mgをB-Buffer 1.8 mlに溶解し室温で静置させ、2 hr経過後に過飽和のammonium chloride 水溶液 20 μ l加えて反応を止めた。UV吸収スペクトルからの見積もりにより、この条件では1分子のavidinテトラマーに対して10から40分子の蛍光基が結合していた。分画分子量100,000のフィルターを通し、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ を終濃度2 Mになるように添加してからPhenyl Superoseカラムによる逆相クロマトグラフィー (溶離液B-Buffer、グラディエントモード2 Mから0 Mの $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 濃度勾配) を行ない、蛍光修飾されたavidinタンパク質“蛍光タグ”を精製した。あるいは硫酸分画により未反応のTRITCを除くことで蛍光タグを精製した。

“タグリンカー”の調製

(1) 供与されたタンパク質中のanti- β' IgGの濃度、純度、力価をポリアクリルアミドゲル電気泳動とELISAにより求めた (ホロ酵素1に対するstoichiometryは0.17)。

(2) 文献⁹⁾に従い、12.5 μ gのanti- β' IgGと630 ngのpapain thiol protease (SIGMA社) を50 μ lのPBS (20 mM cysteine、20 mM EDTA含有) 中で反応させFabフラグメントを得た。精製は、papainをiodoacetoamide (SIGMA社) で失活させてからSuperdex 75カラムによるゲル浸透クロマトグラフィーで行なった。つぎの有機反応のために溶離液はTrisを含まないB-Bufferを用いた。

(3) Fabフラグメントの精製画分 (8.3 μ g / 200 μ l) に2 μ g分のNHS-biotin を加え氷上で2 hr静置し、最大2分子のbiotin残基をFabへ導入した¹⁷⁾。未反応のNHS-biotinをFast Desaltingカラムによるゲル浸透クロマトグラフィー (溶離液0.5 M NaCl/TGE) で取り除き、遠心濃縮してから4 $^{\circ}$ Cで保存した。

抗原抗体結合

160 pmolのbiotin化Fab (うち“タグリンカー” 27 pmol) と、透析 (外液100 mM KCl / 0.15 mM PMSF/TGE溶液) によってDTTを除いたホロ酵素27 pmolを混合して4 $^{\circ}$ C、5 hr反応させた。通常のカラムクロマトグラフィーでは遊離のbiotin化Fabや未修飾のホロ酵素を除いてbiotin化ホロ酵素だけを単離することができなかったため、つぎの操作を行ってから最後に併せて精製した。

ホロ酵素1分子の蛍光ラベル

(1) 上のサンプル溶液に60 pmolの蛍光タグを添加し4 $^{\circ}$ Cで2 hr反応させた。そこに大過剰のbiotinを加えてさらに1 hr静置し、蛍光タグの残りのbiotin結合部位を塞ぎホロ酵素のavidinを介したオリゴマー化を防いだ。

(2) 内壁をBSAでコートした遠沈管を用意し底部に60% glycerol/TGE溶液 (100 μ l) を満たしてから、その上に30%から10%のglycerolグラディエント (総体積1.8 mlの50 mM KCl/TGE溶液) をHPLCのシステムで精巧に積層した。そこへ反応溶液を載せて4 $^{\circ}$ C、4 hr、150,000 gの遠心分離を行なった。

(3) 遠沈管の底に注射針を突き刺して試料を分画し、SDS-PAGE後の銀染色によりホロ酵素を、ELISAによりFabフラグメントを、顕微鏡システムを用いたG励起蛍光強度の計測により蛍光タグを、それぞれ検出した。23% glycerol濃度の位置に遊離のホロ酵素、14%に蛍光タグ、10%にFabフラグメントが分画された。30% glycerolの位置にそれら3つのシグナルがすべて重なる画分があり、蛍光標識化ホロ酵素のみを単離した。

(4) 得られた画分を蛍光顕微鏡で観測したところ、1分子が明るい光点として検出された。これに等体積のglycerolを混ぜて-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

anti- β' IgGタンパク質1分子の蛍光ラベル

タグリンカーの調整法に倣いNHS-biotinで修飾し、ホロ酵素のラベル法と同様にして蛍

光タグを結合させた。ただし蛍光標識化IgGの精製はSuperose12カラムを用いたゲル浸透クロマトグラフィーにより行なった。

《1分子ダイナミクスアッセイ》

機器

- ・顕微鏡のステージにKITAZATO社製MICROWORM PLATE10型を取り付けて、DNAベルトを37℃の恒温に保ちながら観察を行なった。

試料

- ・ここではDTTを含有しないT-bufferを使った。
- ・下のCompetitionアッセイに用いたDNAフラグメントは国立遺伝学研究所遺伝情報研究センターの久堀智子氏より供与いただいた。これは134番目の位置に λ_{PR} プロモーターを含む239 bp長のPCR産物である。

方法

DNAベルト上にT-Buffer 20 μ lとカバースリップを被せ、蛍光顕微鏡による直視観測を行なった。蛍光標識タンパク質の溶液1 μ lを10 μ lのT-Bufferで希釈してから、スライドとカバーの隙間からピペットでインジェクトしたところ、その際生ずる溶液のバルクフローによって1 ビジョン 1 インジェクション毎に2から10分子のタンパク質が観察視野 (90 μ mスパン) に運ばれてきた。それら分子のDNAベルト上における動態をVCRですべて記録し、あとで再生して画像処理装置により分子運動の軌跡をひとつひとつトレースした。運動は3 μ mスカラー量をもつベクトル単位に分割しビデオレート (33 msec) の時間分解能で解析した。方向性はDNAの伸長方向 (0°) に対する角度 θ の経時変化で、速度は3 μ mの移動に費やした時間で定義した。バルクフローの速度はDNAベルト以外の場所を通過している任意の分子の運動ベクトルを加算して、平均値から求めた。統計はバルクフローの角度が30°以上で、速度が1から20 μ m \cdot sec⁻¹のときにDNAベルトを通過したすべての分子について行ない、運動様式ごとに数を集計した (本章第3節・4項)。

Competitionアッセイ

caseinで内壁をコートしたキュベットにT-Bufferをとり、蛍光標識化ホロ酵素 (3 nM) と heparinまたは遊離のDNAフラグメント (濃度はともに3 μ M分) を37℃、1 hrプレインキュベートした。これをサンプルとして上記と同様にスライディングアッセイした。

§ 第2章 §

第3節 結果と考察

1. DNAの配向固定と「DNAベルト」

RNAポリメラーゼのDNA上における分子運動を観測するために、まずDNAの位置と配向性を制御する試みを行なった。

前節で述べた実験手順に従い、アルミ製の薄膜電極をスライドガラスの上に製作した。その電極の間でT7 DNA (40 Kbp) または λ DNA (48.5 Kbp) に対して高周波高電圧を印加したところ、一端を電極のエッジにそろえるように平行にしてDNAを集積することができた (Fig. 2-1のA)⁴⁾。それらDNAサンプルの両端にはあらかじめavidinタンパク質を導入しているため、それとスライドガラス表面との吸着を通してDNAが固定される。よって拱橋型に伸展したコンフィグレーションは電圧消去後も堅固に保持された (Fig. 2-1のB)。以下、本論文ではこのようなDNA分子群を「DNAベルト」と称する。なお、ベルト内のDNA分子の5'端から3'端への向きはまったく無作為である⁴⁾。

このような電場による分子伸長と誘電泳動の作用機構については不明な点も多く、詳細はWashizu・Kurosawaらのグループにより現在研究中である。

2. DNAベルトの性質

このDNA試料に求められるもう一つの重要な点は、位置制御なされたDNAにタンパク質が結合し得ることである。これについてはWashizu・Kurosawaらの実験証拠、

(1) DNAベルトの中央部を紫外光レーザーを走査して切断するとDNAの両末端部分のみガラス基板に残り、切断フラグメントのみ遊離する。よってベルト内では、DNA分子の全体がガラスに結合しているのではなくむしろ基板には吸着していない¹⁰⁾。

(2) ベルト内のDNAはDNaseIや種々の制限酵素により切断を受け、その後でT4DPaseのexonuclease活性を作用させるとDNAは完全に消化される¹⁸⁾。

などから、本研究にも応用可能であると判断した。

DNAベルトの内部を共焦点顕微鏡を用いて観察すると (Fig. 2-2のA)、DNAは厚さ約3 μm の層を成しており、ごく一部には長さが2倍あるダイマーやスライドガラスとカバースリップとの間で固定されているものが存在していた (Fig. 2-2のBとC)。また電極のエッジ付近には、アルミに両端が固定されループを形成しているものが観測された。

観測像と蛍光強度測定をもとにDNAの濃度を求めたところ10から300 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ (15から

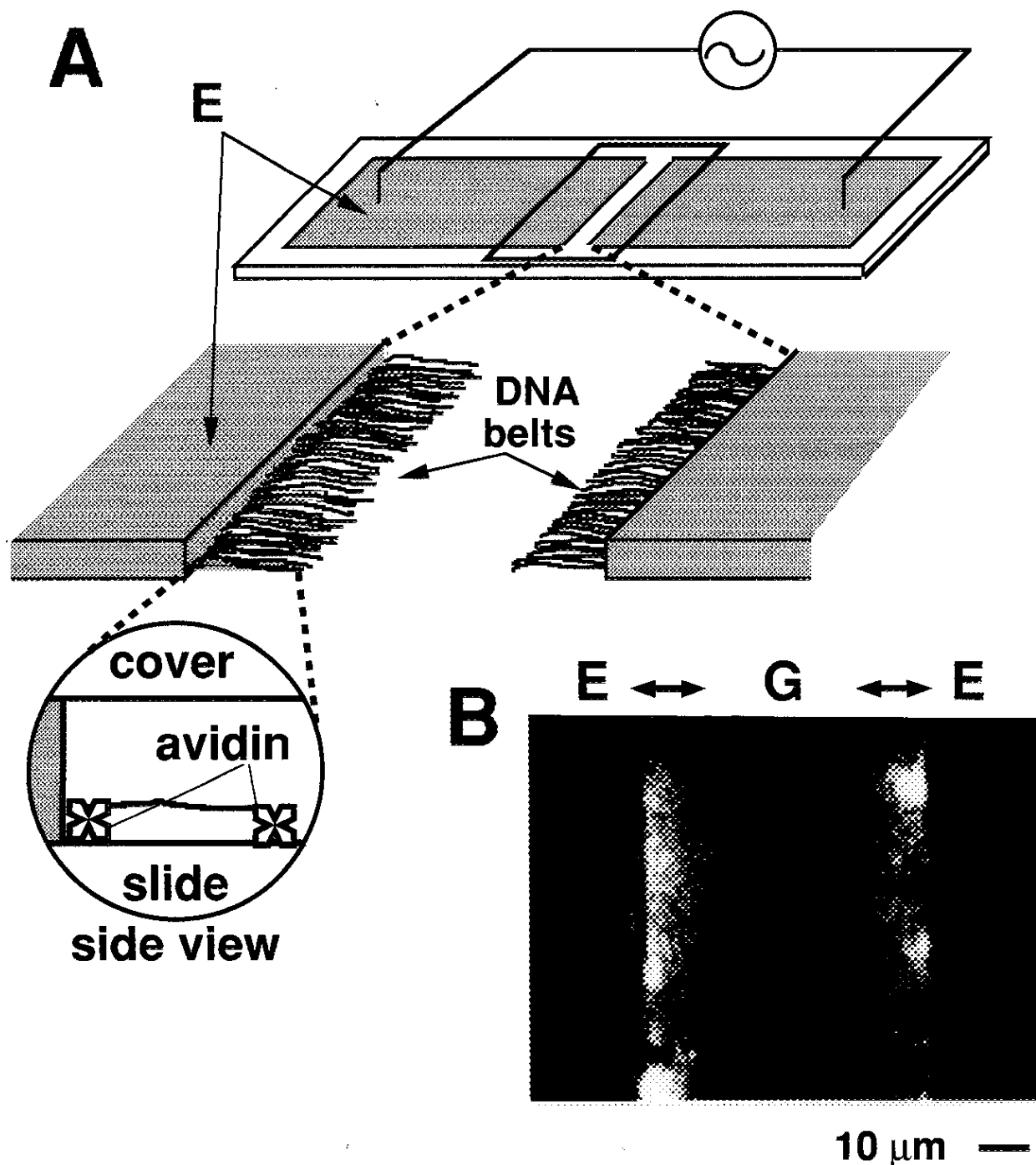
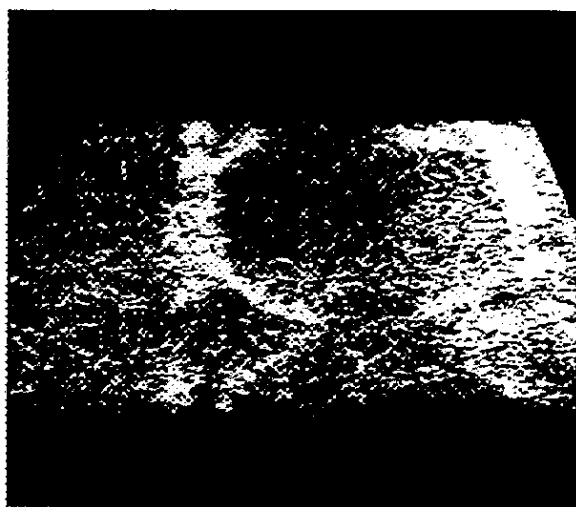
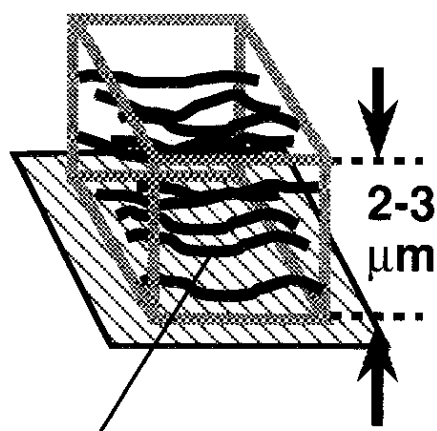
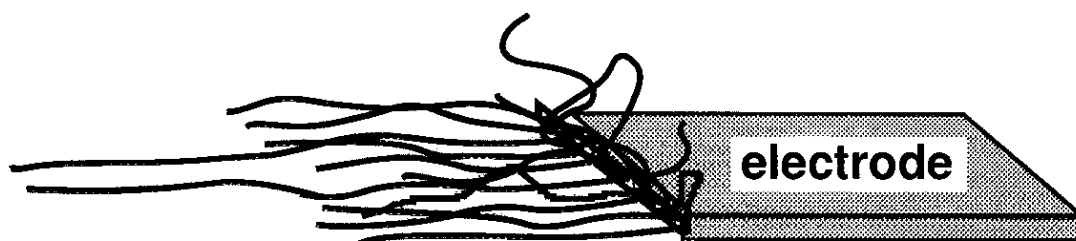


Fig. 2-1.

Formation of DNA belt.

(A) DNA was stretched in parallel by dielectrophoresis (a 1-sec pulse of 1 MHz at 20 KVpp/cm), and (inset) anchored to the glass slide at the both ends through the avidin moieties adsorbed onto the surface.

(B) Fluorescence image of the λ *c^{ts857}* Sam7 DNA belts visualized with EtdBr (0.5 μ g/ml) after a few rounds of the assay. Electrodes (E), and glass surface (G) are denoted, and the DNA belts are indicated with dihedral arrows.

A**B****DNA molecules****C****DNA molecules****Fig. 2-2.**

Vertical distribution of the DNA molecules in the belt.

(A) Confocal image. As shown schematically in (B), the belt was 2 to 3 μm thick with a concentration of 10 to 300 $\mu\text{g/ml}$. Assuming a DNA diameter of 2 nm, the total cross-section of the DNA was calculated to be less than 0.1% of that of the layer of the belt.

(C) Actual configurations of DNA molecules are illustrated.

460 μM 、bp換算)であった。DNAのらせんの直径2 nmからベルトの層の断面に対するDNAの密度を計算したところ面積比0.1%とかなり疎であることがわかった。よって、ベルトの内部ではDNAの立体障害から溶液の流れに乱れが生じたり、1方向に整流されたりしないと思われる。事実、4項以降で後述するとおりDNAと結合しない分子は溶液に流れを付与した際にそのバルクフローとともにまっすぐベルトを通過した。

3. 大腸菌RNAポリメラーゼホロ酵素1分子の可視化法

第1章で述べたとおり、検体が十分な強度の光を発してさえいれば、通常の光学顕微鏡の使用でも分子1つ1つの運動形態を高精度にかつリアルタイムで計測することができる。筆者は、RNAポリメラーゼを緑色蛍光(572 nm)を発するローダミン誘導体(TRITC; Fig. 2-3)でラベルすることにより蛍光顕微鏡(G励起、546 nm)を用いて可視化することにした。ローダミンは量子収率はそれほど高くないものの退色しにくい性質を持つ。ただし、蛍光体1分子を通常の蛍光顕微鏡で可視化することは不可能なため、十分な光強度が得られるよう10分子以上のローダミン残基を含む「蛍光タグ」を準備し、これを実際上の蛍光プローブとして使用した(Fig. 2-3)。

RNAポリメラーゼホロ酵素と固定化DNAとの結合速度定数が、Singer・Wuが報告²⁾した遊離DNAとの定数、 $10^5 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ と同程度あるとすると、2項で求めたDNAベルト内のDNA分子の濃度から、ホロ酵素は観察視野内において0.2から6.0 secの間に1回の割合でDNA結合を行なうと期待される。この時間のオーダーではローダミン残基の退色はほとんど無視し得る。ビーズ表面に固定されたDNAとホロ酵素との転写反応について速度論的な研究がなされているが^{1,2)}、プロモーターに依存した転写産物が確認され、その生成速度は遊離DNAを使用した場合と同程度であった。

ShimamotoらはRNAポリメラーゼを化学反応により直接蛍光タグでラベルすることを試みたが、その修飾酵素はDNA結合能は保持していたもののRNA合成能が失活していた¹¹⁾。そこでつぎに筆者が行なったホロ酵素の蛍光修飾法を示す(Fig. 2-3)。この方法は抗原-抗体反応を利用して蛍光タグをホロ酵素へ導入するもので(タグリンカー)、タンパク質を過剰に修飾することなく分子のある特定部位にのみ蛍光発色体を導入することができる。使用した抗体は、RNAポリメラーゼ β' サブユニットのC7領域(カルボキシル末端から22アミノ酸残基)をエピトープとするもので、この抗体の結合はホロ酵素の転写活性を阻害しないことが実験的に確かめられている¹⁹⁾。またこれは、一般にモノクローナル抗体よりも抗原との結合能が強いとされているポリクローナル抗体である。抗体の

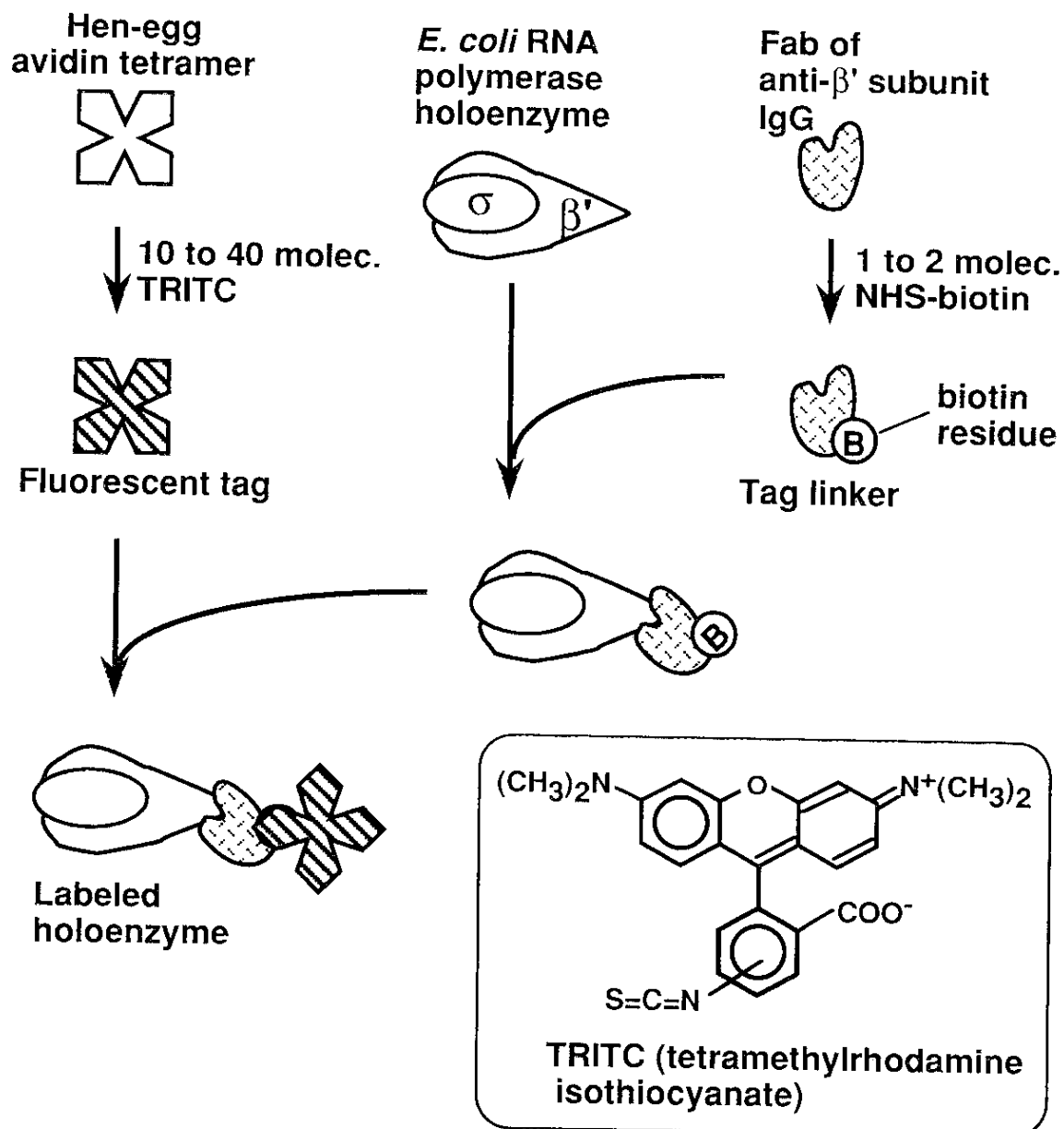


Fig.2-3.

Visualization of single molecules of *E. coli* RNA polymerase.

Rabbit antibody was raised against a C-terminus peptide from 1386 to 1407 amino acids of β' subunit. Its Fab fragment was biotinylated ("tag linker") and coupled to holoenzyme. The immunoconjugated enzyme was labeled with avidin-TRITC ("fluorescent tag") and isolated through glycerol-gradient centrifugation.

In the following chapter, *P. putida* CamR repressor was visualized by the same procedure.

2価性により多分子のホロ酵素が架橋されることを防ぐため、タグリンカーにはFabフラグメント化したものを用いた。

4. 蛍光標識されたRNAポリメラーゼホロ酵素の分子動態

DNAベルトを顕微鏡の視野（約90 μm のスパン；Fig. 2-1のB）に入れ、Fig. 1-2の模式図で示した方策に従って、蛍光標識したホロ酵素の溶液をスライドガラスとカバースリップとの間からインジェクトした。そのとき予想されたとおりバルクの溶液のフローが生じ、ホロ酵素分子に一定の方向性を与えながら視野まで運んだ。その数は1回のインジェクションあたり2から10分子であった。その内DNAベルト上を通過したすべての分子の軌跡をトレースした。なお、視野内のDNAの量はbp換算で約11 fmolと計算される。

もしスライディングが存在するなら、DNAにそった1次元的な滑り拡散が可視化されると予測される。そこで分子の運動方向をDNAに対する角度の絶対値 θ の経時変化として定量し、DNAにそった平行な運動成分の検出を試みた。その際実測されたブラウン運動の揺らぎによる偏差を考慮し、絶対値 θ が 10° 以内のトレースをDNAにそった平行運動、スライディングであると定義した。

バルクフローの速度が $0.5 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ 以下のときのホロ酵素の運動を観測すると、トレース角 θ の変動があまりにも大きかったためランダムなブラウン運動との区別が困難であった。フローが $1 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ 以上の速度で、かつDNAとのなす角度の絶対値が 30° 以上のときは、観測した分子のトレースはつぎの5つの様式、

- (1) 10 sec以上の間2 μm よりも長い距離を移動しないもの。
- (2) 固定化DNAの伸展方向（ $\theta=0^\circ$ とする）と平行に3 μm 以上移動するもの。
- (3) 焦点がオフフォーカスになり、垂直方向に移動するもの。
- (4) バルクフローと並進して3 μm 以上移動し、(1)から(3)までの様式に合致しないもの。
- (5) その他。(2)なのか(4)なのか判別できないものを含む。

に分類された。

ほとんどすべてのホロ酵素分子は、DNAベルトの外側に位置するとき、もしくはバルクフローの速度が $100 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ 以上のときに様式(4)の動態を示した。このような条件下では、ホロ酵素はDNAと結合できない状態にあることから、これはブラウン運動によるシンプルドリフトであると考えられる。

様式(1)から(3)は、ホロ酵素が必ずDNAベルトの内側にあり、かつそこにホロ酵素を

0.5 sec以上滞在させておける程度のバルクフローの速度 ($30 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ 以下) のときにのみ観測された。この時間のスケールは、3項で述べたRNAポリメラーゼホロ酵素と遊離DNAとの結合に要する時間のオーダーと一致した。

以下の項では、それぞれの様式の特徴を詳述する。

5. 様式(1)、「トラッピング」

前項で分類されたホロ酵素分子のトレース、様式(1)の一例をFig. 2-4に示す。パネルAでは λ *cl*^{ts857} *Sam7* DNAのベルト、BではT7 Δ D111 DNAのベルトの内側にトラップされている明るい光点を見ることができる。以下、このような静的様式を「トラッピング」と称する。

λ DNAの場合にはRNAポリメラーゼ単独で結合可能な P_R 、 P_R' 、 P_L といった複数のプロモーターが²⁰⁾、T7 Δ D111 DNAの場合には末端近傍1箇所だけにA1プロモーターが存在しているが、ベルト内のDNAの向きは無作為のため⁴⁾、見かけ上プロモーターの位置はFig. 2-4各パネル下の2本の黒棒で示すように対称な配置をとっている。トラップされているホロ酵素の位置は、それらに該当する場所とよく一致していた。そこでT7 DNAについてさらに統計を取り調べたところ、ホロ酵素分子は矢印で記されたA1プロモーターの存在する場所によくトラップされていた (Fig. 2-5)。一方、同様にして λ DNAに対しても統計を調べたところ、T7 DNAのときとは異なり、ホロ酵素はDNAの末端にではなく P_R 、 P_R' 、 P_L プロモーターが集中する端から約4分の1のところにより多く結合していた (データ省略)。これら観測された分子群はホロ酵素とプロモーターとの複合体を反映していると思われる。

6. 様式(2)、「スライディング」

Fig. 2-6のAは、ホロ酵素の分子運動をトレースしたスーパーインポーズ像である。左のトレースは単にバルクフローに流されているだけのシンプルドリフトである (先述の様式(4)に属する)。一方、右は最初はバルクフローと同じ方向をしているが、DNAベルトの内側においてのみ平行に移動している。パネルC上段のグラフは2つの運動の経時変化を表わしたものだが、パネルAの右の分子のトレース (実線) にはDNAとの平行関係を表わす運動成分の領域がはっきり現われている。また、この間はブラウン運動に起因する角度のぶれが生じず、パネルAの左の分子のシンプルドリフト (波線) とは好対照である。

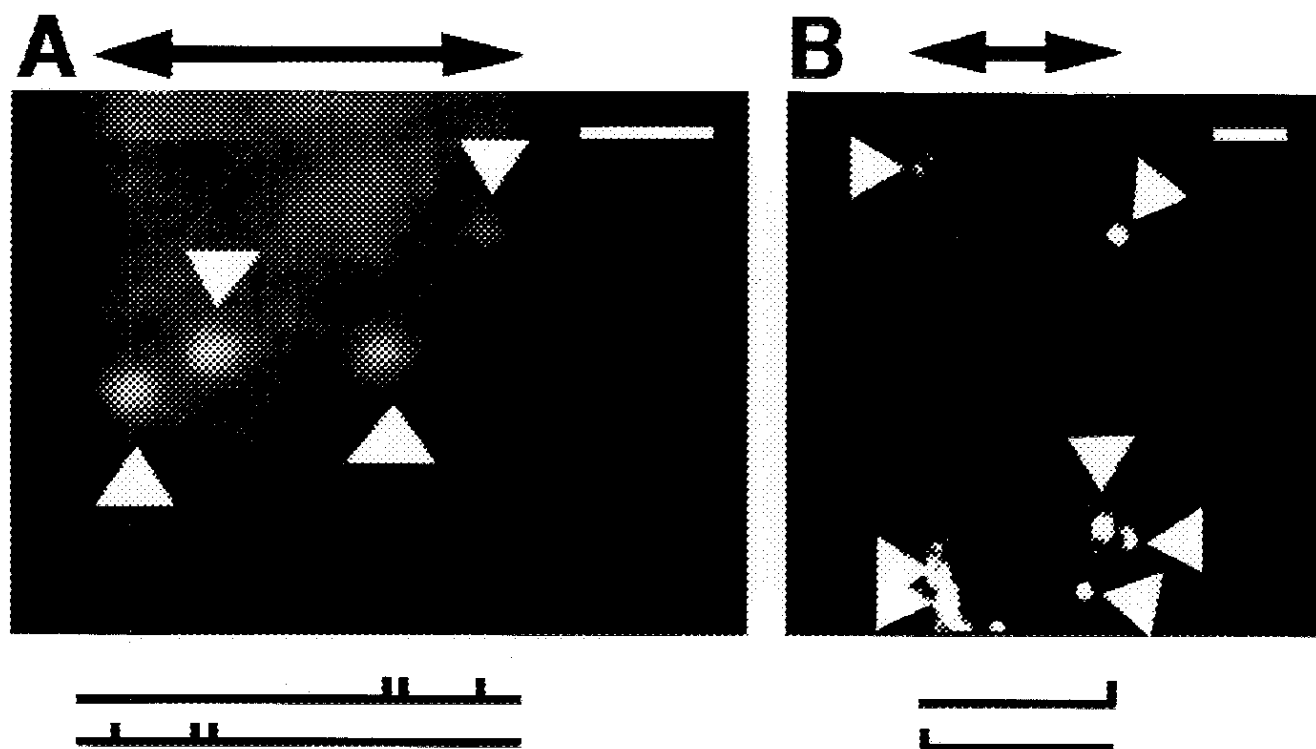


Fig. 2-4.

E. coli RNA polymerase holoenzyme trapped on immobilized

(A) λ *cI*^{ts857} Sam7 DNA (partially stained with a trace amount of EtdBr), and
(B) T7 Δ D111 DNA (unstained).

The enzyme was fluorescently visualized by the method shown in Fig. 2-3. Fluorescence images were obtained using a silicon-intensifying tube camera (Hamamatsu C2400-08). Trapped molecules are marked with white arrowheads, and the DNA belts with dihedral arrows. White bars indicate 5 μ m. The positions of (major) promoters are represented by short bars.

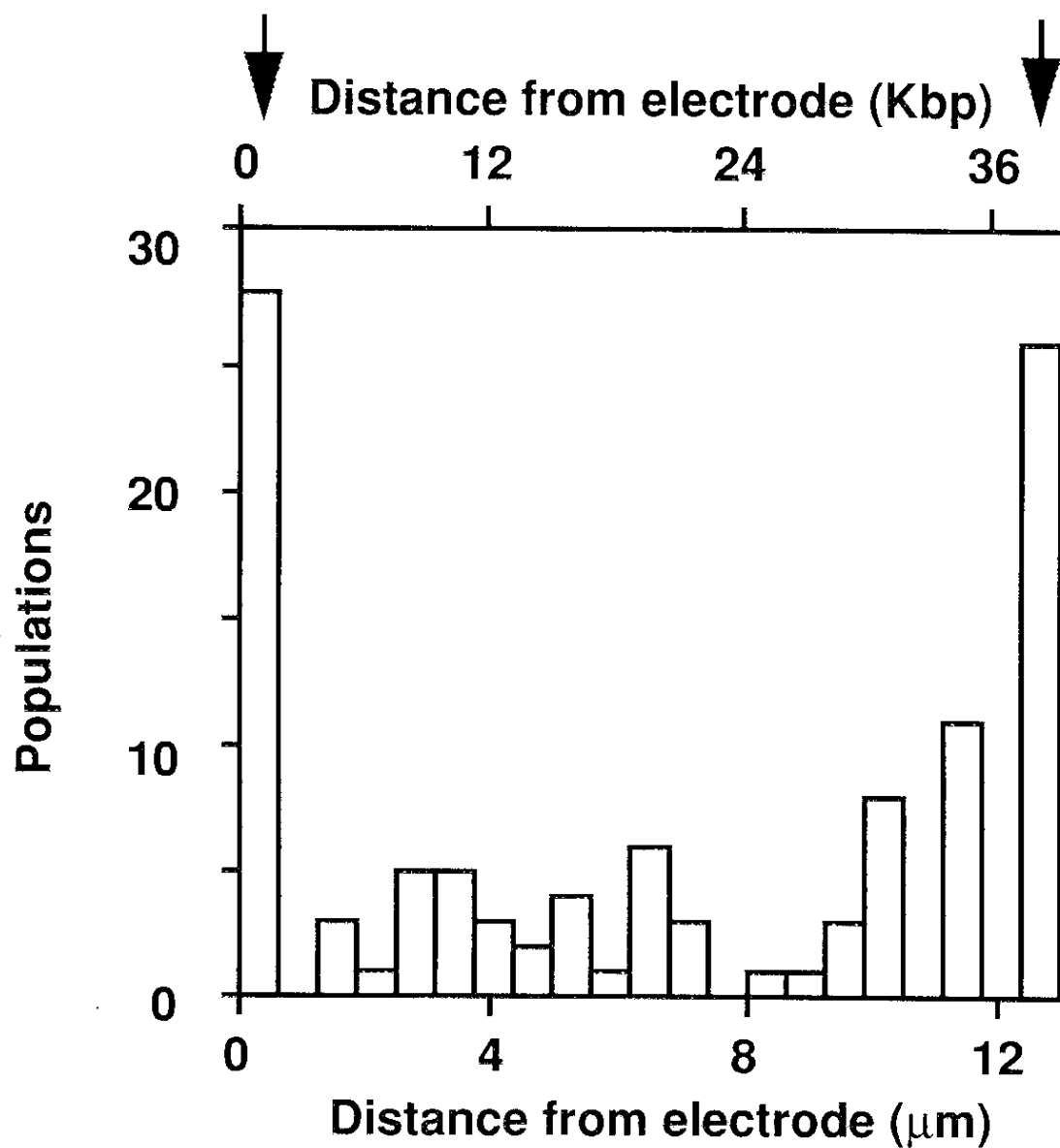


Fig. 2-5.
Locations of 111 of holoenzyme molecules trapped on
T7 Δ D111 DNA.
Arrows indicate the positions of T7A1 promoter.

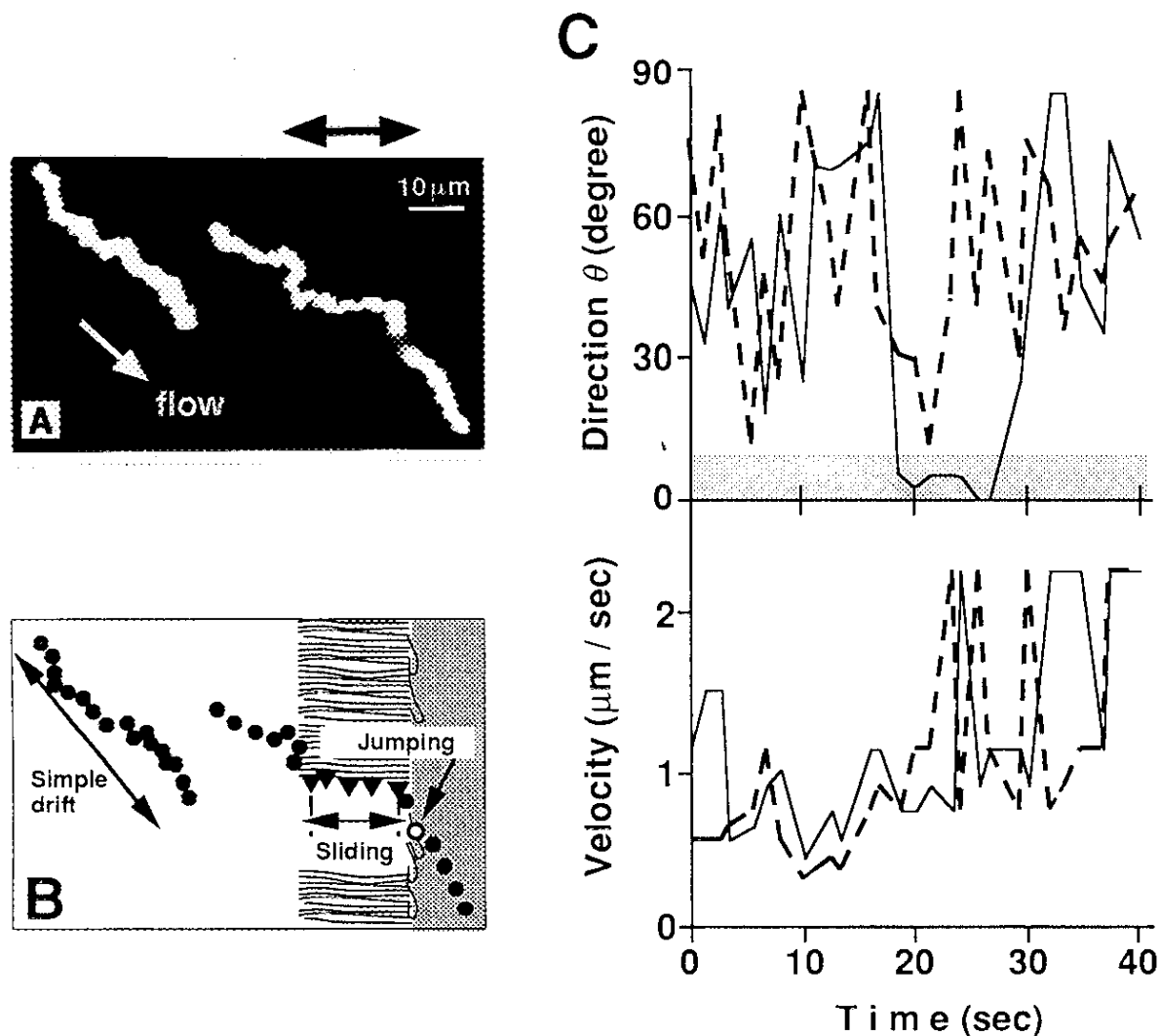


Fig. 2-6.

Movements of fluorescently visualized *E. coli* RNA polymerase holoenzyme. (A) Superimposed image (every 99 msec for 40 sec). T7 Δ D111 DNA molecules were horizontally oriented as indicated with a dihedral arrow. White arrow shows the direction of bulk flow. A blurring out of a spot due to "jumping movement" is also shown.

(B) Assignment of the movements.

(C) Absolute values of averaged direction θ and velocity were calculated for each 3- μm translocation. Zero degree denotes the direction of stretched DNA.

Shaded region indicates parallel direction with DNA ($\theta \leq 10^\circ$). The right molecule (solid line) but not the left (broken line) showed sliding in the belt.

右の分子のトレースをDNAにそったホロ酵素の平行運動であると判定し、以降このような様式をスライディングと称するものとする。

7. 様式(3)、「ジャンピング」

様式(2)のようなリニアな運動以外にもホロ酵素分子が垂直方向に移動する動態が観測された。ピントがぼやけてトレースされた部分 (Fig. 2-6のパネルAとB、右の分子のトレースの一部) が、視野に対して分子が上下運動したところで、さらにFig. 2-7では、分子がバルクフローに逆らうように浮き沈みを繰り返す現象が示されている。このような特徴から以降様式(3)のことを「ジャンピング」と記載する。

ジャンピング運動はアルミ電極のエッジ付近でときどき可視化される。そこにはループ状に垂直方向に固定されたDNA (本節2項、Fig. 2-2のパネルC) がしばしば観察されるが、ジャンピングはそうしたDNAの配向にそった運動ではないかと思われる。

8. ポリメラーゼの統計的1分子ダイナミクス

スライディングの存在をより明白にするため、DNAベルトを通過したすべてのホロ酵素分子をトレースしその動態を分類して集計した (Fig. 2-8、白抜き)。

約150個のトレースの内、50%がスライディング、ジャンピング、トラッピングのいずれかに属し20%がシンプルドリフトであった (白抜きの縦軸の数値は左から順番に、39%、7%、6%、20%、28%)。スライディングに属するトレースが最も多く、つぎに頻度が高いシンプルドリフトの2倍で、これがDNAベルト上におけるホロ酵素の分子動態の主流であった。

それらの運動がホロ酵素のDNA結合活性によるものかどうかを調べるために、コントロール実験を行ない同様に統計的な観測を行なった。ホロ酵素をDNA結合に対する競争阻害剤 (プロモーターを含む239 bp長の遊離DNAフラグメント) とあらかじめプレインキュベートしてからアッセイしたところ (Fig. 2-8、斜線)、スライディング、ジャンピング、トラッピングすべての頻度が減少し、その分シンプルドリフトの割合が大きく増加した (斜線の縦軸の数値は左から順番に、13%、0%、1%、66%、22%)。また、heparinによってDNA結合部位をブロックされたホロ酵素ではさらに顕著に様式の割合の変化が見られた (黒塗りの縦軸の数値は左から順番に、2%、1%、2%、79%、16%)。これらのことから、

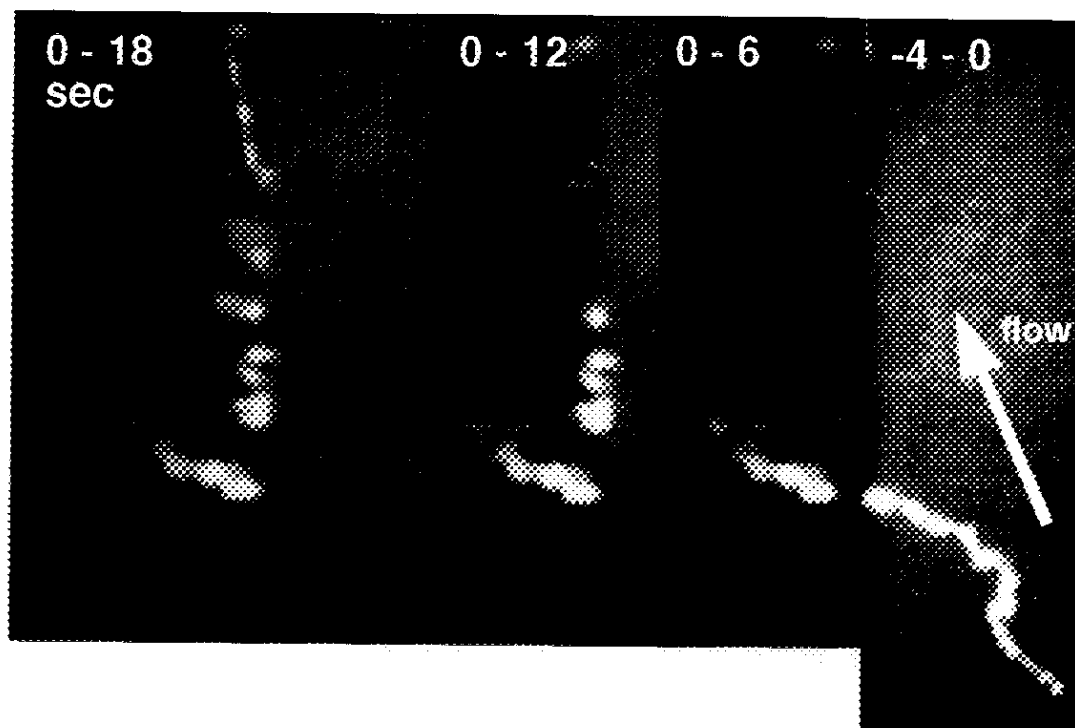


Fig. 2-7.
Jumping movement of RNA polymerase holoenzyme.
 The enzyme reached the edge of T7 Δ D111 DNA belt at 0 sec,
 and performed repetitive movements in and out of focus as if
 the enzyme molecule was "jumping" against a bulk flow.

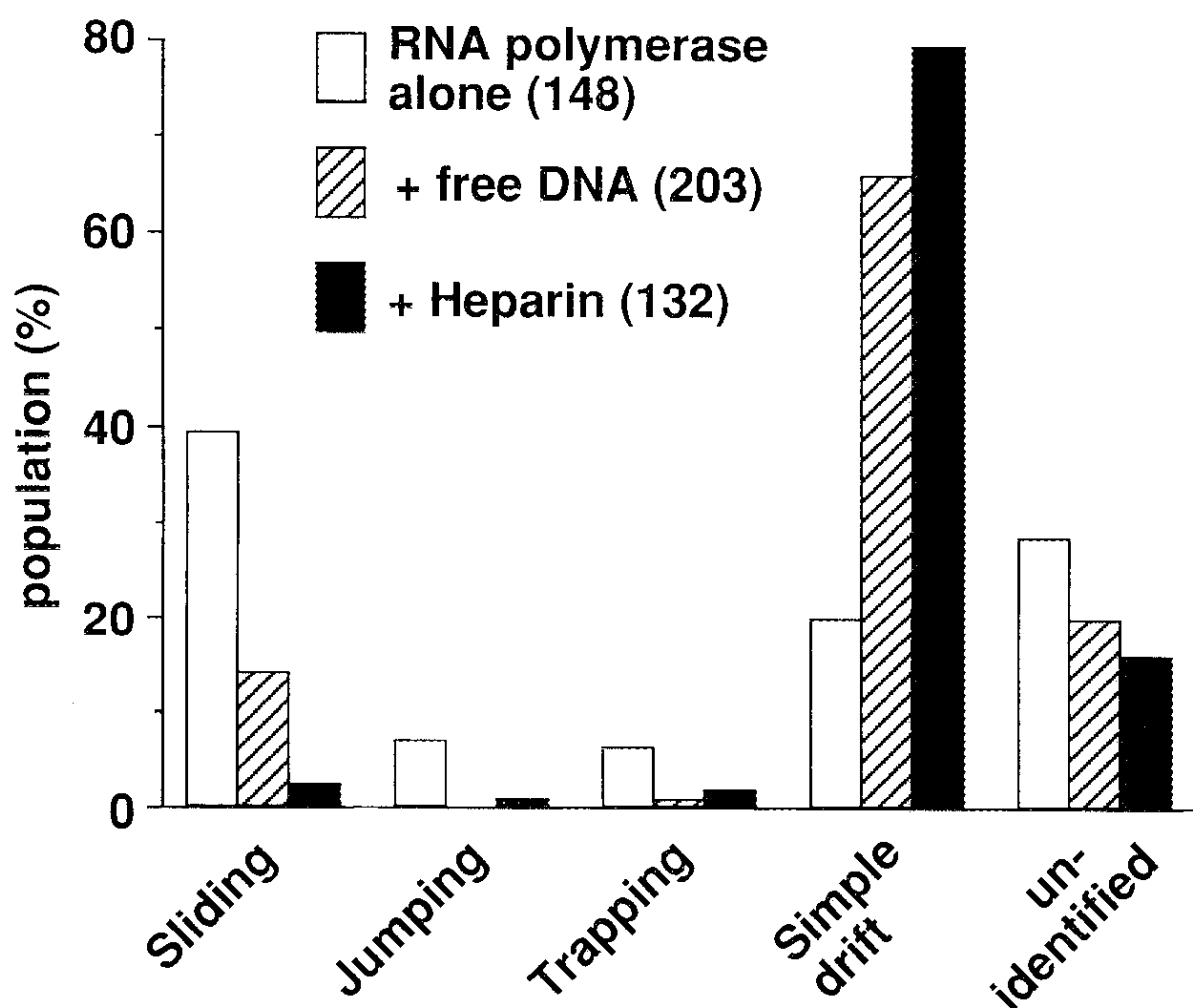


Fig. 2-8.

The effects of a free DNA fragment and heparin on the movements of *E. coli* RNA polymerase holoenzyme.

λ *cIts857* Sam7 DNA belt was used for the sliding assay. Statistics were collected for all the observed molecules which had passed through the DNA belt with bulk flow rate of 1.0 to 20 $\mu\text{m}/\text{sec}$. In parentheses, the total number of samples are indicated.

A trace containing modes "sliding", "jumping", and "trapping" was counted as each of the three even when it contains other modes. A trace containing only mode "simple drift" was counted as "simple drift", and that containing "simple drift" and "unidentified" or just "unidentified" was counted as "unidentified (any ambiguous mode of motion)".

Holoenzyme labeled with fluorescent tag (30 pM) was preincubated at 37 °C for 1 hr with heparin (30 nM) or a 239-bp synthetic DNA fragment containing the λ *pR* promoter at position 134 (30 nM).

- 1) 観測されたスライディング、ジャンピング、トラッピングの分子動態は局所的・偶発的なバルクフローの屈曲・乱れ等に起因するものではない。
- 2) またスライディングについて強調すると、これは蛍光標識されたホロ酵素自身によるDNA結合が要求される現象である。
- 3) 同様にジャンピングもスライディングと同様な挙動を示しDNAとの結合が必須であることから、これは垂直方向に固定されたDNAにそったスライディングであると考えられる。

9. 抗体タンパク質の統計的1分子ダイナミクス

Fig. 2-8の結果からスライディングにはDNAとの結合が必須であることが示唆された。そこで、いわゆるDNA結合ドメインをもたないタンパク質について、その分子動態をホロ酵素のときと同様にトレースした。試料には蛍光タグを導入したanti- β' IgGタンパク質を選択した。一般にIgG抗体は分子量約160,000 $\text{g} \cdot \text{mol}^{-1}$ の比較的巨大な塩基性タンパク質で、ポリアニオンであるDNAと静電的な親和性を有するとされている。また、これはタグリンカーの材料としてホロ酵素を可視化するときに用いたため、ホロ酵素のときのアッセイのさらなるコントロールとして有効である。

結果をFig. 2-9に示す。90%近くの抗体分子はシンプルドリフトを示し、スライディング、ジャンピング、トラッピングはほとんど観測されなかった（縦軸の数値は左から順番に、2%、1%、2%、79%、16%）。このことは特にスライディング運動に関して、

- 1) 蛍光タグやタグリンカーに起因したものではなく、ホロ酵素自体の性質によるものであることを明らかにした。
- 2) スライディングには、いわゆるDNA結合部位が必須であることが示された。
- 3) スライディングはタンパク質の正電荷とDNAの負電荷との間の静電相互作用の産物だけではないことを示唆した。

10. スライディングの特徴

ホロ酵素のDNAベルト上における分子運動を観測していると、スライディングしていたものがプロモーターと予測される場所でトラップされるものが時々トレースされる。その一例がFig. 2-10のパネルAで、T7A1プロモーターの位置に該当する場所でトラップされていた2つのホロ酵素分子が3.66 secおよび3.93 secにスライディングを開始し、DNA

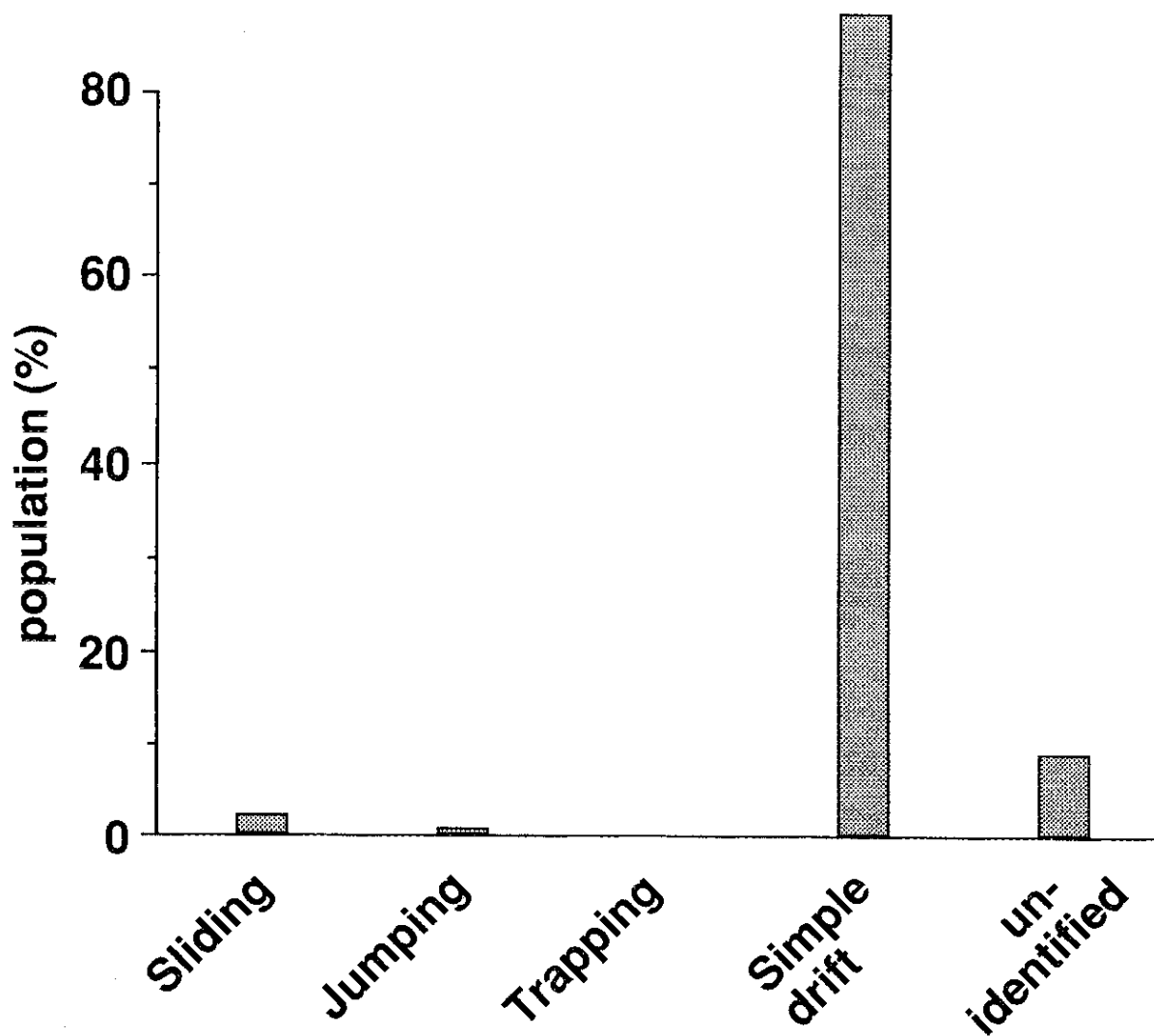


Fig. 2-9

Modes of movements of single molecules of anti- β' IgG protein in λ *c^{ts857}* Sam7 DNA belt.

Statistics were collected for 247 traces, and the same as in Fig. 2-8.

ベルトから解離後、各々がもう片側のDNAベルト上を再度スライディングしてトラップされる一連の様子を表わしている。この2つのホロ酵素の運動は互いにまったく独立で、先に解離した下の方の分子が、結局は後からスライディング運動を始めた上の方の分子に追い抜かれている。このことから、重ねて、スライディングはバルクフローの整流効果によるものではない。

スライディングの距離は、DNA結合に要する十分な滞在時間（0.5 sec以上）をベルト内のホロ酵素に許す範囲内であれば、全般的にバルクフローの速度に比例して長くなる傾向にあった。スライディングに費やす時間については観測データを平均すると1から2 secであったが（たとえばFig. 2-6パネルCやFig. 2-10パネルB、C）、これはSinger・Wuの報告²⁾するホロ酵素とDNAとの非特異的結合の寿命（3 sec）とよい一致を示した。このことから、1分子ダイナミクスアッセイで観測されたスライディングはそれと同様な非特異的結合の1形態であると考えられる。

ホロ酵素は、はじめはバルクフローと同じ速度で移動するがいったんスライディングを開始するとその速度は必ず低下する（なお、このような現象はバルクフローの速度が遅いときにはブラウン運動の揺らぎがトレースに重なるために顕著に認められなかった。たとえば、Fig. 2-6パネルC下段）。Fig. 2-10のパネルCを例にすると、シンプルドリフト中のホロ酵素のDNA伸展方向に対するベクトル速度は約 $20 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ 、スライディング中では約 $10 \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ と両者に大きな差が観測され、スライディングしているホロ酵素とDNAとの間には摩擦力が働いているものと考えられる。

摩擦現象に関しては物理学の分野においても未解決な問題であり、またDNA近傍にあるホロ酵素分子の流動理論もまったく不明であるので推論の域を出ないが、速度の低下の原因としてスライディング中のホロ酵素がDNA塩基配列から部分的・一過性的な何らかの親和力を受けていることが推察される。Fig. 2-10はホロ酵素がプロモーター結合に伴うスライディングからトラッピングへの機序を示唆していると思われるが、親和力には部位特異的な強弱が存在し、それがスライディングとトラッピングを切り替えている可能性がある。この点については第4章にてモデルを詳述したい。

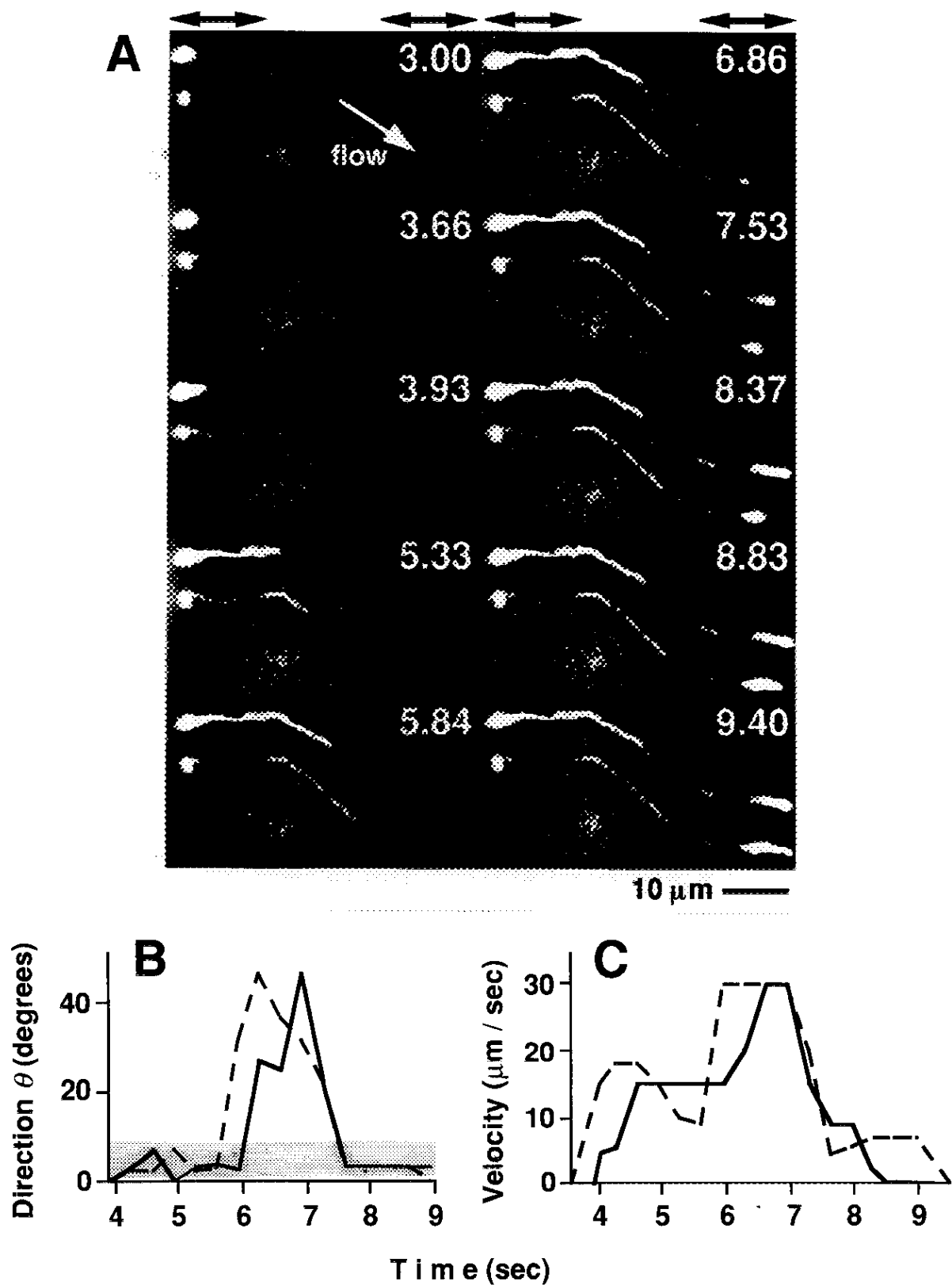


Fig. 2-10.

Sliding movements of *E.coli* RNA polymerase in T7 ΔD111 DNA belts.

(A) The images are superimposed until the time (sec) indicated in each panel. Two holoenzyme molecules can be seen to independently start sliding from putative promoter-holoenzyme complexes, drawing traces ending in new complexes.

(B and C) Analysis of upper (solid line) and lower (broken line) traces similar to Fig. 2-6.

第3章

Pseudomonas putida CamRリプレッサーの
DNA上のスライディングとインデューサーの効果

§ 第3章 §

Pseudomonas putida CamRリプレッサーのDNA上の スライディングとインデューサーの効果

第1節 緒言

細菌*Pseudomonas putida*由来のCamRリプレッサーは、モノマー当たりのアミノ酸残基数186個、分子量約23,900 g · mol⁻¹のダイマータンパク質である(第1章、Table 1)。3次構造は未決定であるが、アミノ末端付近にヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフの存在とそれがDNA結合ドメインである可能性が1次構造から予測されている¹⁾。さらに遺伝子のホモロジー検索から、CamRはトランスポゾンTn 10由来のリプレッサーTetR²⁾のスーパーファミリーの一員であることが最近指摘された¹⁾。

CamRのリプレッサーとしての生理的機能は、*Pseudomonas putida*が唯一の炭素源として*d*-camphorを資化する際に誘導される代謝酵素群オペロン*camDCAB*を調節することで(Fig. 3-1)、自らをコードする遺伝子*camR*も同時に抑制している^{1, 2)}。そのような負の調節は、CamRがDNA上のオペレーター部位*camO*へ特異的に結合し、*Pseudomonas putida* RNAポリメラーゼの転写反応を阻害することに起因している³⁾。この抑制は*cam*遺伝子のインデューサーでもある*d*-camphorがCamRに結合すると解除されるため^{1, 2)}、この低分子化合物はCamRタンパク質のDNA結合能そのものを失活させる機能があると考えられる。

しかしながら別の考え方として、*d*-camphorはリプレッサー-オペレーター間の特異的結合さえ阻害すれば、インデューサーとしての最小限の役割を果たすことができるであろう。一般にこのようなリプレッサー-オペレーター-インデューサーの一連の関係は、すでに「オペロン」という確立された概念となっている。ところが一方で、リプレッサーと非特異的DNAとの相互作用までを含めて追求した研究例は極めて少なく、インデューサーの分子的役割は不明瞭であった。

そこで、第2章で確立した1分子ダイナミクスアッセイ法をCamRタンパク質に適用することにより、「リプレッサーとオペレーター」、「リプレッサーとその他の非特異的DNA部分」、「それらとインデューサー」との相互作用の根本に関わるいくつかの問題の解答を求めた。

- (1) リプレッサーはいわゆるオペレーター配列以外の部位は認識しないのだろうか。
- (2) 大腸菌RNAポリメラーゼホロ酵素のスライディング(第2章)のようなDNAと

の動的相互作用を行なうのか否か。

- (3) インデューサーは、リプレッサーとDNAとの相互作用一般を阻害するのかそれとも特異的結合のみを阻害するのか。さらに、スライディングのような動的作用に対してどのような影響を与えるのか。

Pseudomonas putida CamR リプレッサーのスライディングに関する研究は本研究が初の試みであるが、これまでに Lac⁵⁻⁸⁾ と Cro のリプレッサー⁹⁾ にスライディングが報告されていることから、このリプレッサーについてもスライディングが可視化されると期待される。本章では第2節で実験方法に触れ、第3節ではDNAに対する競争阻害剤またはインデューサーの存在がCamRの分子動態にどのような効果を与えるのかについて検討し、上記3つの解を明らかにする。

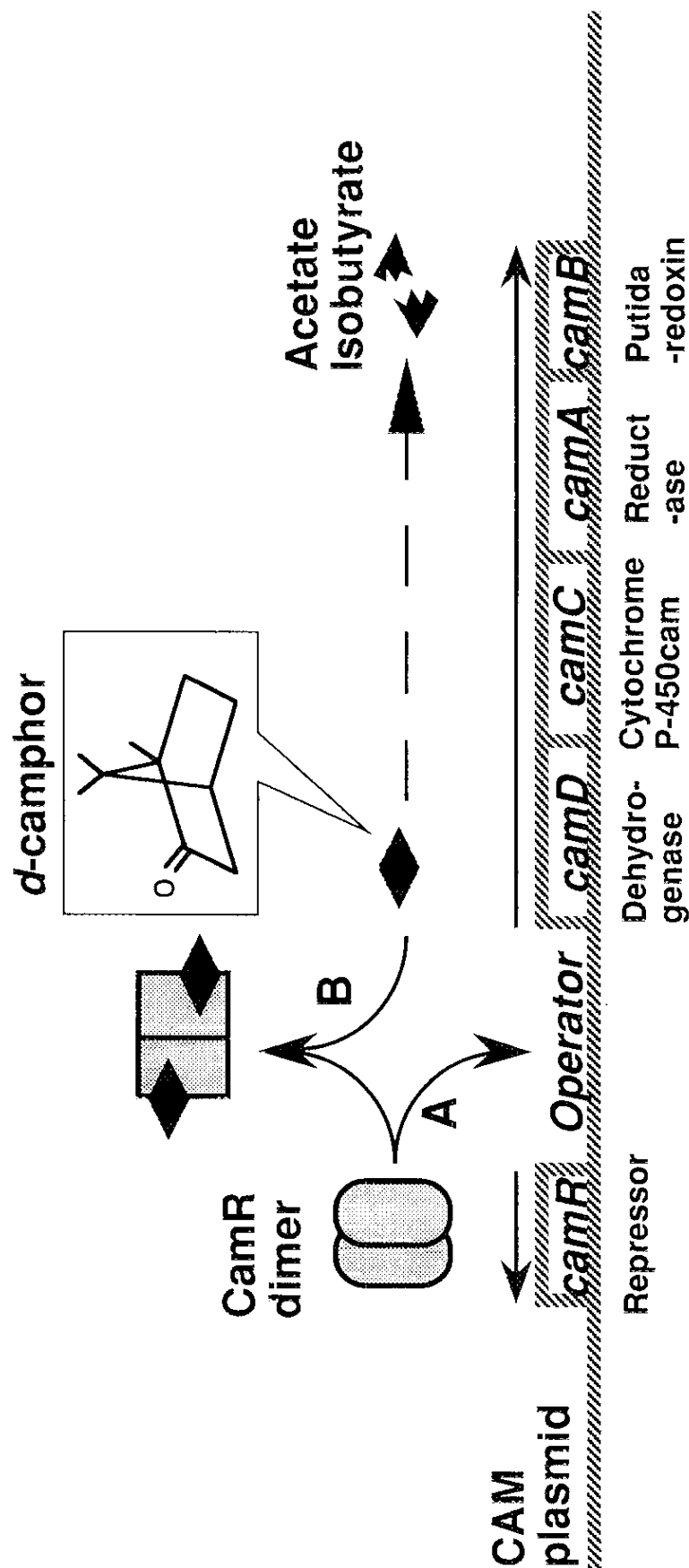


Fig. 3-1.
P. putida CamR repressor and cam operon regulation (adapted from Aramaki et al., 1993).
 (A) Specific binding of CamR to the operator, *camO*. Transcriptions (arrows) are repressed.
 (B) Binding of *d*-camphor to the CamR suppresses the repression.

§ 第 3 章 §

第 2 節 実 験

《一般的手法・各項共通の操作》

《各項共通の試料一覧》

ともに第 2 章・第 2 節に準じた。おもな追加事項は合わせて下記のとおり。

1. 機器分析等

- ・ガスクロマトグラフィー (G C) は、ULBON社のHR-52キャピラリーカラムを装着した Shimazu GC14-B型 (検出モード、flame ionization detector ; FID) で行なった。
- ・ガスクロマトグラフィー質量分析法 (G C - M S) には、JEOL 社のElectron ImpactモードのJMS-AX505型 (DBカラム30 m長) を使用し、解析はJMA-DA5000型で行なった。
- ・デンストメトリーはLKB社製のレーザーデンストメーター2222-010型で行なった。
- ・超遠心は日立製Himac CS100型とローターRP80 AT型を使用して行なった。
- ・DNA のホモロジーサーチは、DNA Data Bank of Japan所有の検索用プログラム F A S T Aを用いた。

2. 試薬等

- ・*d*-camphor (和光純薬(株)) は2 Mの濃度になるようにDMFに溶かして使用した。
緩衝液へ添加するときにはソニケーションを行なった。U V測定により緩衝液中でも *d*-camphorの終濃度が保証されていることを確認した。
- ・protein G-SepharoseはPhrmacia LKB社から購入して使用した。
- ・電気泳動後のゲル断片からのDNAの回収はBIO 101社のGene Clean IIを用いて行なった。
- ・70merのデオキシオリゴヌクレオチド 5'-GCAGGCTCTATATCTGCGATATACTGAGCATATCCCCCATATGCTCAGTATATCGCAGATATAGAGCCTG-3' (以下 *camO32* hairpin stem と称する) は、東亜合成(株)へ調製を委託した。
これはC₅の部分を中心にステムループ構造を形成するもので¹⁰⁾、その結果濃度に依らず安定に2重鎖 (5'端が1塩基突出した32bp長) を取り得る。本章ではこれをオペレーターフラグメントとして使用した。C a m R の結合部位を下線で示す。

“*camO32* hairpin stem”

5'-GCAGGCTCTATATCTGCGATATACTGAGCATAT-CC
3'-GTCCGAGATATAGACGCTATATGACTCGTATA-CC^C

つぎの3点は第一薬科大学の荒牧弘範先生から提供して戴いた。

・CamRタンパク質。

この標品は文献^{3, 4)}の方法に基づいて5 mMの*d*-camphor存在下で大量調製されたもので、カラムクロマトグラフィーにより精製された標品であった。

SDS-PAGE後のクーマシー染色からは挟雑タンパク質は検出されず、UVスペクトルから測定された濃度は $1.3 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ であった。

・CamRタンパク質そのものを免疫したrabbitの抗血清。

・camオペロンのオペレーター領域を含むpUC19由来のプラスミド (pJP511およびpHA37-1)^{3, 4)}。

3. 酵素反応一般

文献¹¹⁾に従った。ただし、DNAフラグメントのライゲーションは宝酒造(株)のキット、Ligation system ver.1を用いて行なった。制限酵素、核酸修飾酵素は東洋紡(株)から購入して使用した。

反応に用いた緩衝液 (10×濃度) は酵素購入時に添付されるものか、自分で調製したものを適宜希釈して使用した。組成・終濃度は以下のとおり (前章実験の節で既出のものは除く)。

A-Buffer	… 33 mM Tris · CH ₃ OO ⁻ [pH7.9], 66 mM CH ₃ COOK, 10 mM (CH ₃ COO) ₂ Mg, 0.5 mM DTT.
Bind-Buffer	… 10 mM Tris · Cl ⁻ [pH7.5], 10%(v/v) glycerol, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, 50 mM NaCl, 0.1 mg · ml ⁻¹ BSA.
Bsr-Buffer	… 10 mM Tris · Cl ⁻ [pH7.8], 10 mM MgCl ₂ , 150 mM KCl, 1 mM DTT 0.1 mg · ml ⁻¹ acetylated BSA (New England Biolabs社) .
H-Buffer	… 50 mM Tris · Cl ⁻ [pH7.5], 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 1 mM DTT 0.1 mg · ml ⁻¹ BSA.
L-Buffer	… 10 mM Tris · Cl ⁻ [pH7.5], 10 mM MgCl ₂ , 1 mM DTT, 0.1 mg · ml ⁻¹ BSA.
M-Buffer	… 10 mM Tris · Cl ⁻ [pH7.5], 10 mM MgCl ₂ , 50 mM NaCl, 1 mM DTT 0.1 mg · ml ⁻¹ BSA.

《C a m R アッセイ用DNA “λ::camO DNA” のコンストラクション》

“λ::camO DNA” (44 Kbp、15 μm) は、λgt11 DNAのEcoRIクローニング部位にcamO領域をもつDNA断片(250 bp)挿入して作成し、大量調製した。

試料

- ・大腸菌MC4100株 (F⁻ *araD* Δ(*argF-lac*) *U169 rpsL relA flhD deoC ptsF rbsR*) は国立遺伝学研究所遺伝情報研究センターの永井宏樹先生から提供された。JM109株 (*recA1 supE44 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1 thi* Δ(*lac-proAB*)) は東洋紡(株)のCompetent cell Kitを用いた。
- ・クローニングベクターλgt11および大腸菌Y1090株 (*supF hsdR araD139 Δlon ΔlacU169 rpsL trpC22::Tn10(tet^r) pMC9*) は国立遺伝学研究所哺乳動物保存研究室から供与された。
- ・ファージ粒子への再構成はλDNAパッケージングキット (Amersham社) を使用して行なった。
- ・λ-brothはBacto-Tryptone (DIFCO社) 10 gとNaCl 2.5 gをイオン交換水1 lに溶かして調製した。
- ・ethanol沈殿は、サンプルの3倍量の氷冷ethanol、終濃度0.3 M sodium acetateそして0.2 mg · ml⁻¹のglycogen (Boehringer Mannheim(株)) を添加し、-20 °Cにて30 min放置後、微量高速遠心機にて15 min遠沈して行なった¹¹⁾。
- ・LB (Luria-Bertani medium) は、dextrose (和光純薬(株)) 1 g、NaCl 5 g、Polypepton (日本製薬(株)) 10 gそしてYeast Extract S (日本製薬(株)) 5 gを熱水1 lに溶かし、4 M NaOH水溶液でpHを7.6に調整してから使用した。
- ・dideoxy termination法によるDNAのシーケンシングはUnited States Biochemical社のSEQUENASE ver. 2.0を用いて行なった。アイソトープは[α-³⁵S]dCTPを1 μCi使用した。
- ・pBluescript SK M13(+)はSTRATAGENE社から購入し、文献¹²⁾ に従い大量調製したものを使った。

方法

(1) λgt11 DNAからファージを*in vitro*再構成し、大腸菌MC4100株に感染させて30 °Cで生育する溶原菌を得た。そこからLac⁺ (5 μmol IPTG含有λ-broth上、30 °C) かつts (LB上、42.5 °C) のフェノタイプを示すシングルコロニーをスクリーニングした。

(2) それを50 mlのLB中で対数増殖期まで前培養してから1.1 lのLBへ植菌し、ジャーファーマンターを使用して大量に培養した (30 °C)。菌液がOD₅₅₀ = 3.5に達したところで81 °C、400 mlのLBを注いでヒートインダクションし、さらに38 °Cで3 hr培養を続けた。

(3) 50 mlのchloroformを加えてファーマンター内で強制的に溶菌させ、遠心で上清を回収後、文献^{10, 13)} の方法に従いλgt11 DNAを大量に精製した (収量0.6 mg)。

(4) H-Buffer (50 μ l) 中で λ gt11 DNA (5 μ g) を *Eco* RI (16 units) で一箇所切断し (37 $^{\circ}$ C、3 hr)、得られた2つのフラグメント (19.5 Kbp 長のright armと24.2 Kbp長のleft arm) を *Calf intestine* alkali phosphomonoesterase (2.5 units) で脱リン酸処理した。

(5) 一方、プラスミド pJP511 (5 μ g) を25 μ lのM-Buffer中 *Hin* dIII (36 units) でリニアライズし (37 $^{\circ}$ C、3 hr)、除タンパク¹¹⁾とethanol沈殿¹¹⁾したあと、その両末端をKlenow fragment (10 units) とdATP、dGTP、dCTP、dTTP (各1 nmol) を加えることにより平滑化した (A-Buffer 20 μ l中、30 $^{\circ}$ C、15 minの反応)。そこへ250 ngの *Eco* RIポリリンカー doxy(pGGAATTC)を反応させてから再度 *Eco* RIで切断し、8%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって *camO*を含む250 bp長のインサートフラグメントを単離した。

(6) そのフラグメント (100 fmol) をright armとleft arm (40 fmol) の間にライゲートし、(1)から(3)の手順と同様にして *in vitro*パッケージングした。Y1090株を用いて溶原菌を得て、スクリーニング (Lac⁻かつts) 後、大量培養 (8 lのジャーファーマンター) によって λ ::*camO* DNAを調製した (収量1.1 mg)。

《 λ ::*camO* DNAの同定

(1) λ ::*camO* DNAを *Eco* RI/H-Buffer、*Sac* I/L-Buffer、*Kpn* I/L-Bufferの各酵素で切断し、0.7%アガロースゲルと8%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行なって制限酵素切断地図を作製した。

(2) λ ::*camO* DNAの *Kpn* I—*Sac* I断片をpBluescript SK M13(+)のマルチクローニングサイトへ導入し、大腸菌JM109株を用いてアンプリファイ後、*Kpn* I—*Sac* Iクローニング領域のシーケンスを行なった (7 M Urea/6%ポリアクリルアミドゲル、30 W、全7.2 hrの電気泳動)。

(3) 以上の実験から *camO*断片が確かに導入されていること、それはシングルコピーであること、挿入の向きは λ ::*camO* DNAの5'側から *Sac* I→*Kpn* Iの順番であることを確認した。

《スライドガラスの表面改質

avidinタンパク質を介したDNAの伸張固定に関して (第2章・第2節DNAベルトの調製)、

1. スライドガラスとタンパク質との固定効率をさらに高める。

2. 反対にDNA分子の吸着をより一層防止する。

を目的に、スライドガラス上のシラノール基から2つの水酸基と5つのエチレンユニットをもった“リンカー鎖”を、Southern・Maskosらの方法^{14, 15)}を参考に合成した(Scheme 1)。

これは、ガラス表面の水酸基の数とその官能基間の距離がタンパク質の吸着に重要であること¹⁶⁾、エチル鎖の疎水性もまたこれに寄与するとともにDNAの親水性とは極性が正反対であること^{15, 16)}、エチレンの酸素原子部分がリンカー鎖自らをガラス表面に強く固定すること¹⁷⁾、などの知見をもとにした。

試料

・有機合成用試薬は、特級品かクロマトグラフィー用高純度品を関東化学(株)、またはAldrich社から購入して使用した。

方法

(1) シリコンパッキング付きの100 ml容サンプル瓶にxyleneを35ml、1-propylamineを3.4 ml、そして3-glycidoxypolytrimethoxysilaneを9 ml注ぎよく混合後、そこへアルミ電極スライドガラスを適当数入れ、80℃恒温下で1晩放置しエポキシ基を導入した¹⁷⁾。反応後、methanolとdiethyl etherで洗浄後風乾させた。

(2) 同様にして、サンプル瓶に1,4-dioxaneを42 mlとり、9 gのhexaethyleneglycolと1 mlのtrifluoroboronエーテル錯体をそれぞれ溶解させた後、その中に上で反応させたガラス電極を90℃、1 hr浸漬させた(エポキシ環の解裂とリンカーの合成)¹⁹⁾。反応後、acetoneまたはdiethyl etherで洗浄し、-20℃で保存した。

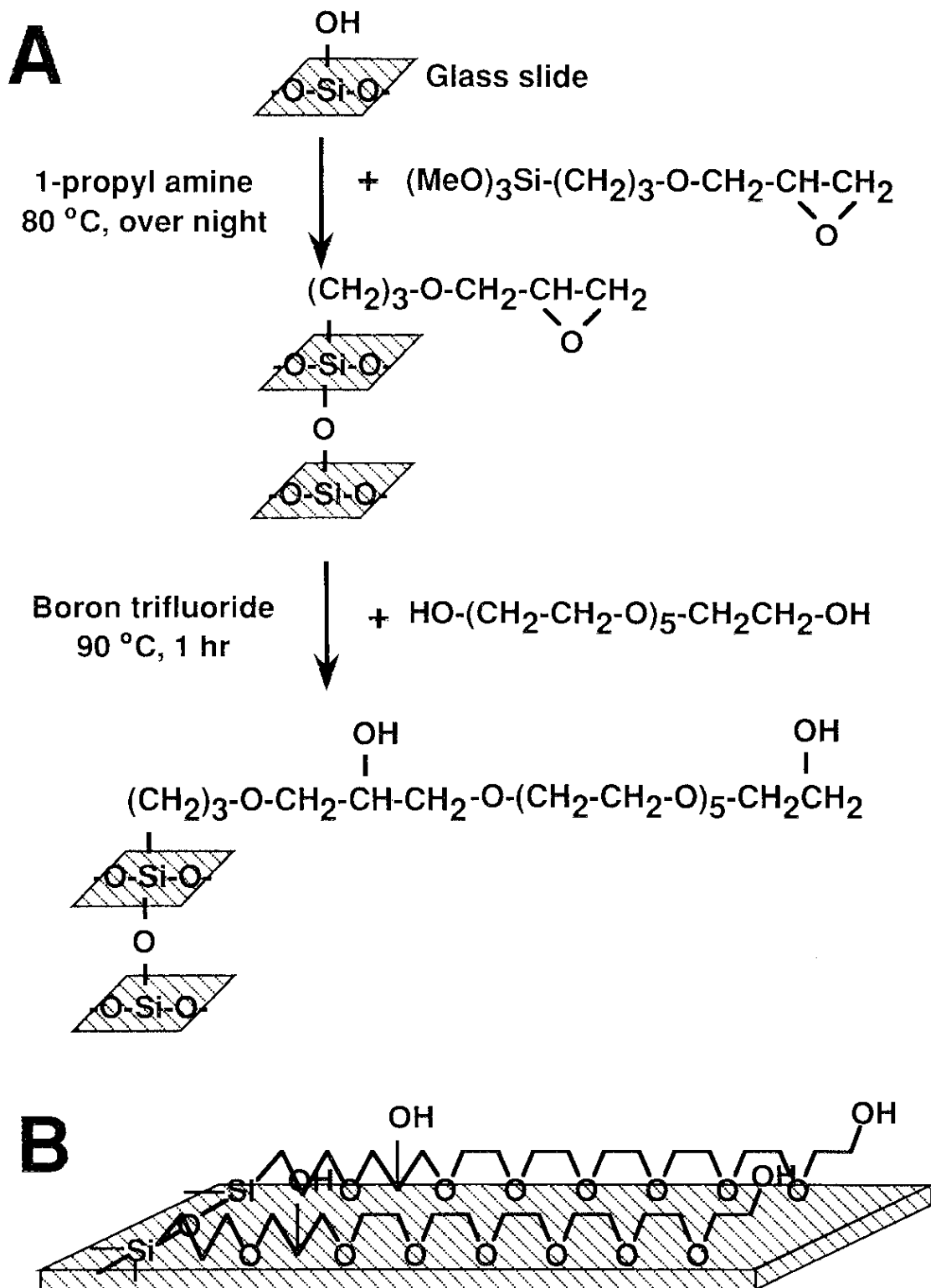
本節では以上のように表面処理したアルミ薄膜スライドガラス電極を用いた。このスライドガラスの使用によりDNAベルトが形成される効率が、未改質のものを用いた場合と比較して3倍程度改善した。

《DNAベルトの調製法》

第2章・第2節に倣った。試料は上記2項のものを使用した。

《CamRタンパク質中に残存する微量d-camphorの定量》

CamR標品の内、d-camphorと強固に結合しているものがあるかどうかを調べるため、GCによる検出・定量とGC-MSによる同定を行なった。なお、有機溶媒を扱ったすべ



Scheme 1.

(A) Reagents and conditions.

(B) Product.

In DNA belt, linkers leave the avidin moieties adsorbed to glass, and repulse the phosphate backbone. The linker are covalently bound to the glass through the aliphatic ether oxygen clusters (after Southern *et al.*, 1992).

での操作はガラス製器具を用いて行なった。

方法

(1) C a m R 標品のストック溶液 240 μ l (0.3 mgのC a m R 含有) と、同体積の 8 Mのguanidium chloride/Bind- buffer溶液をよく混合し二つに等分した。4 $^{\circ}$ Cで一晩の間、一方は100 mlの4 Mguanidium chloride/Bind-buffer溶液に対して透析し (ネガティブコントロール)、残りは透析せずにそのまま静置した。

(2) 変性後、両サンプルに1 mlのdichloromethaneを加えてd-camphorの溶媒抽出を行ない、dichloromethane相をピペットを用いて回収した。サンプルをそれぞれsodium sulfate無水物を1 cm高まで詰めたパスツールピペット (岩城硝子(株)製IK-PAS-5P、5 3/4サイズ) に通して完全に脱水し、1 mlのdichloromethaneをあとから通して洗いを行なった。また、検量線用に濃度を変えて調製した標準検体 (d-camphor/B buffer溶液) についても同様の操作を行なった。

(3) d-camphorの昇華を防ぐためすべてのサンプルに10 μ lの1-hexaneを添加してから、室温大気中で一晩dichloromethaneを飛ばして濃縮した。その内から2 μ l分 (0.02 mg-C a m R 当量) をF I D-G Cにそれぞれインジェクトし、キャリアーガスN₂ (エア-45 KPa、H₂ 50 KPa)、メイクアップガスN₂ 100 KPa、昇温100 $^{\circ}$ Cから280 $^{\circ}$ Cの温度勾配、18 minの条件で分析を行なった。検量線用の各標準検体も同様に分析し、ピーク面積とd-camphorの仕込量から検量線を作製した。

(4) 検出されたピークがd-camphorであるかどうかをG C-M S にサンプルの残りをインジェクトして調べた。分離条件は、キャリアーガスHe、流速1 m \cdot min⁻¹、昇温60 $^{\circ}$ Cから100 $^{\circ}$ Cまで2.5 min、100 $^{\circ}$ Cから150 $^{\circ}$ C まで12.5 minの温度勾配。

《C a m R リプレッサー 1 分子の可視化》

前章・第2節R N A ポリメラーゼの方法に倣った。主な変更点は次のとおり。

試料

・anti-C a m R IgGポリクローナル抗体は、rabbitの抗血清からprotein G-Sepharoseのオープンカラムを用いたアフィニティークロマトグラフィー (溶離液20 mM Phosphate buffer solution [pH7.9]、0.1 M glycine \cdot Cl⁻ [pH2.7]により8 hr溶出) により精製し、溶液をPBSに置換してから4 $^{\circ}$ Cで保存した。抗体とC a m R タンパク質とのstoichiometryをE L I S A により求めたところ、精製された画分中のC a m R 抗体の量は13% (IgG時) および29% (Fabフラグメント時) であった。

・ C a m R は Superdex 75 カラムを用いて単量体などを除いたものを使った。

方法

すべての精製は Superose 12 のゲル浸透カラムクロマトグラフィーにて行なった。目的生成物の最後の単離のためにクロマトグラフィーを行なった際、溶出ピークの位置を検量線用標準クロマトグラムと照らし合わせることで蛍光標識化 C a m R の分子量を計算したところ、1 分子の C a m R に 1.9 分子の蛍光タグが結合していることがわかった。

《オリゴヌクレオチド “camO 32 hairpin stem” 1 分子の蛍光ラベル》

前章・第 2 節 R N A ポリメラーゼの方法に倣った。主な変更点は次のとおり。

(1) D N A ベルトの調製法に倣い、T4DPase と biotin-dUTP を用いて camO 32 hairpin stem の末端に biotin 基を 1 つ導入した。

(2) これに等モル量の “蛍光タグ” を結合させ、最後に蛍光標識 D N A を Mono Q カラムによるアニオン交換クロマトグラフィー（溶離液 TGE、流速 $0.1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ 、グラディエントモード 0 M から 1 M の NaCl 濃度勾配、50 min）で単離した。

(3) U V スペクトログラム、蛍光強度測定、電気泳動から蛍光標識 D N A の画分を確認してから Bind-Buffer（DTT なし）を外液に緩衝液の透析置換を行ない、4 °C で保存した。

《蛍光修飾前と後での C a m R の D N A 結合活性》²¹⁾

(1) camO を含むプラスミド pHA37-1 (60 pmol) を H-Buffer (240 μl) 中、Sca I (180 units) で 1 カ所切断して直鎖化し、トポアイソマーを排除した。その D N A (20 pmol) を 1.3 pmol の未修飾 C a m R または蛍光標識化 C a m R とともに Bind-Buffer (30 μl) 中で 25 °C、40 min インキュベートし、C a m R - D N A 複合体を形成させた。同様に C a m R 不在と D N A 不在のサンプルもコントロールとして調製した。

(2) 15% から 60% 濃度の glycerol グラディエント / Bind-Buffer 溶液（総体積 1.7 ml）を H P L C 用のポンプを利用して遠沈管に調製し、(1) のサンプルそれぞれについて遠心分離（150,000 g、4 °C、4.5 hr）を行ない、遊離の C a m R、D N A、そして C a m R - D N A 複合体を分離した。

(3) サンプルを 12 画分に分画し、各々 100 μl を E L I S A で、12 μl を 0.7% アガロースゲル電気泳動とデンストグラムで、それぞれ分析し画分中の C a m R と D N A を検出・定量した²¹⁾。

《1分子ダイナミクスアッセイ》

前章RNAポリメラーゼのときと同様にして行なった。ただし反応液は $0.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ caseinを含むBind-Buffer (DTTなし) を使用し、DNAベルトを 25°C に保ちながら顕微鏡観測した。

静的複合体の観察

蛍光標識CamRのサンプル溶液と 0 mM から 10 mM (終濃度) の MgCl_2 /Bind-Buffer溶液をよく混合してDNAベルト上へ滴下した。これを滅菌水を微量溜めた非帯電性スチロールボックスに密閉して 37°C のインキュベーターに静置し、 30 min 経過後スライドグラスを取り出し顕微鏡観察を行なった。

必要に応じて、 5 mM の*d*-camphorを含むBind-Bufferをそのスライドとカバーの間にインジェクトして分子の様子を観測した。

統計的アッセイ

DNAベルト上にBind-Buffer $20 \mu\text{l}$ とカバースリップを被せ、そこへ蛍光標識CamR (220 nM) または蛍光標識*camO* 32 hairpin stem (380 nM) のサンプル溶液 $10 \mu\text{l}$ をピペットでインジェクトし、それら1分子毎のDNAベルト上における動態を直視観測した。

または、蛍光標識*camO* 32 hairpin stem (330 nM) と未修飾のCamR ($2.7 \mu\text{M}$) とをBind-Buffer中で 25°C 、 40 min 間プレインキュベーションしたサンプルをアッセイに用いた。この条件でDNAとCamRが複合体を形成することはゲルシフトアッセイで確認した。

Competitionアッセイ

あらかじめcaseinで内壁をコートしたキュベットにBind-Bufferをとり、蛍光標識化CamR (44 nM) と*camO* 32 hairpin stem ($44 \mu\text{M}$) を 25°C 、 40 min 間プレインキュベートした。 $44 \mu\text{M}$ の*camO* 32 hairpin stemを含むBind-Buffer $20 \mu\text{l}$ をDNAベルト上に満たしてからカバーをかけ、そこへサンプル溶液をインジェクトして同様のスライディングアッセイを行なった。

インデューサーの効果

あらかじめcaseinで内壁をコートしたキュベットにBind-Bufferと終濃度 5 mM の*d*-camphor/DMF溶液をとり超音波分散処理した。そこへ蛍光標識化CamR (100 nM) を加え、 25°C 、 80 min プレインキュベートした。 5 mM の*d*-camphorを含むBind-Buffer $20 \mu\text{l}$ をDNAベルト上に満たし、同様にスライディングのアッセイを行なった。

d-camphorの濃度 5 mM は、フットプリント^{3, 4, 20)}と次項のゲルシフトの結果から決定した。

試料

- ・プローブには、合成オリゴヌクレオチド “camO 32 hairpin stem” か、または pJP511 を M-Buffer 中で *Hin* cII および *Hin* dIII で消化して得た camO を含む 126 bp のフラグメントを使用した。
- ・ホモロジー検索により λ D N A の塩基配列中に見い出されたオペレーター様配列 f1.6 と f12.5（第3節）は、 λ cI^{ts857} Sam7 D N A の *Afl* II-*Sph* I 断片（0.3 mg）を出発原料に *Ava* I-*Bbi* II / L-Buffer ダイジェストの 115 bp 断片として f1.6 を、*Bsr* I（New England Biolabs 社） / *Bsr*-Buffer ダイジェストの 144 bp 断片として f12.5 を、それぞれ調製した。
- ・f2.0 はオペレーター配列との相同性のないもので、f1.6 を調製する際に得られた 290 bp の副産物である。

方法

- （1） プローブ（7 pmol）を *Calf intestine* alkali phosphomonoesterase（2.5 units）によって脱リン酸処理（37 °C、30 min）してから、75 °C、15 min 加熱して酵素を失活させた。そこへ T4 polynucleotide kinase（10 units）と [γ -³²P]ATP（1 μ Ci）を加えアイソトープを導入した。
- （2） 8% アクリルアミドゲル電気泳動で精製したプローブ（0.25 nM、1 nCi）に 1250 nM の C a m R と 120 ng \cdot μ l⁻¹ の poly(dI-dC) を加え、Bind-buffer 中 25 °C、20 min 反応させた。その際、250 nM から 2500 nM までの濃度の競争阻害剤（f1.6、f12.5、f2.0、あるいは未切断の λ gt11 D N A）を共存させた。
- （3） 各サンプルを 4% アクリルアミドゲルにロードし、6.7 mM Tris \cdot Cl⁻ [pH7.5]、3.3 mM sodium acetate、1 mM EDTA を泳動緩衝液として 4 °C 下で電気泳動を行なった。その際泳動槽にペリスタポンプを備え付け、アノード側とカソード側の緩衝液を絶えず循環させた。
- （4） 泳動後ゲルを乾燥させオートラジオグラフィーまたはデンストメトリーを行ない解析した。

ただし、camO 32 hairpin stem についてはアイソトープラベルをせず、これを 1.2 μ M と C a m R 8.8 μ M を反応させ常温で電気泳動（泳動緩衝液 45 mM Tris \cdot borate [pH8.0]、1 mM EDTA）し、EtdBr でバンドを可視化した。5 mM の d-camphor を添加したサンプルも調製して泳動したところ、この場合にはゲルシフトが観測されないことを確かめた²¹⁾。

《DNAフラグメントに結合したC a m Rの単離》

“ $\lambda::camO$ DNA” 上のC a m Rの結合位置を同定するため免疫沈殿の手法²²⁾を用いた。

試料

- ・ protein G-Sepharoseのスラリーは等体積の50 mM NaCl/TE溶液で懸濁・洗浄したものを使用した。TEの組成は10 mM Tris · Cl⁻ [pH7.8]、1 mM EDTA。
- ・ anti-C a m R IgGは透析によってPBSから50 mM NaCl/TEに緩衝液置換してから使用した。

方法

(1) $\lambda::camO$ DNAをEco RI、Sst I、あるいはBam HIとHpa I両者、により切断し、3種類の制限酵素断片を調製した (Fig. 3-7)。

(2) それぞれの断片 (240 ng) をC a m R (0.42 μ g)、B S A (220 ng) とともに6.0 μ lのBind-Buffer (DTTなし) 中で25 °C、20 minブレインキュベートした。そのあとprotein G-Sepharoseスラリー (32 μ l) とanti-C a m R IgG (80 μ g) を加えてさらに37 °C、90 min反応させ (全体積55 μ l)、C a m Rと結合したprotein Gの固相イムノ複合体を形成させた。

(3) 各試料溶液から上清 (s 液) とSepharose樹脂を遠沈回収し、樹脂の方は200 μ lのTEを加え室温で5 min間激しく攪拌して洗浄した。

(4) 再び遠心分離後、上清はethanol沈殿¹¹⁾して保存し (W1液)、Sepharose樹脂はさらに200 μ lの50 mM NaCl /TEを加え同様に激しく攪拌して洗浄した。

(5) Sepharose樹脂を遠沈してから200 μ lの0.5%SDS、10 mM Tris · Cl⁻ [pH7.5]、50 mM NaCl混合液に懸濁し、65 °C、5 minインキュベートした。上清はethanol沈殿して保存した (W2液)。

(6) Sepharose樹脂の懸濁液 (r 液) から4 μ lとり、S D S - P A G E (12.5%アクリルアミド) でタンパク質の分離を行ない銀染色にて検出した (前章第2項、16ページ)。残りはさらにphenol-chloroform溶液を加えて除タンパク処理し (65 °C、5 min)¹¹⁾、ethanol沈殿でDNAを回収後¹¹⁾、W1液、W2液とともに0.7% アガロースゲル電気泳動で分析した。

§ 第3章 §

第3節 結果と考察

1. C a m R リプレッサー中の*d*-camphorの検出

C a m R リプレッサータンパク質は自らをコードする遺伝子*camR*の負の調節因子でもあり (Fig. 3-1)、インデューサーである*d*-camphorのC a m R への結合により*camR*の転写が開始される^{3, 4)}。また、C a m R タンパク質は*d*-camphorの存在下でinclusion bodyから可溶化される性質をもっている⁴⁾。そこでC a m R を大量に調製する際には菌体の培養時に終濃度5 mMの*d*-camphorを添加するインダクションが行なわれ^{3, 4, 20)}、その後硫酸分画、イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィー、透析操作を経てC a m R 標品が精製されている^{3, 21)}。筆者はこの試料を用いることにしたが、インダクション時に添加された多量の*d*-camphorが標品に残留していないかどうか、もし*d*-camphorがC a m R に結合しているとすればその割合はどれくらいかが重大な問題となる。ゲルシフトアッセイやフットプリントなどの間接的アッセイ法ではこの試料に対する後からの*d*-camphorの添加、無添加の間に有意な差が認められているので^{3, 4)}、*d*-camphorはC a m R の精製段階ですべて取り除かれ標品中には夾雑していないと信じられてきた⁴⁾。しかしながら、本研究で行なう直視観察は分子1つ1つのキャラクターをそのまま検出する非常に感度の高いアッセイ系であり (第2章)、特に本章ではリプレッサーに与えるインデューサーの効果を考察することが大きな課題であるため、最初にこの問題に取り組んだ。

d-camphorを高感度でかつ定量的に分析し、かつ検出された分子を同定する必要があるためにガスクロマトグラフィー—質量分析 (G C—M S) を行なった。精製段階で大量の溶液中に置かれてきたにもかかわらず、もし*d*-camphorがストック標品から検出されたなら、それはC a m R タンパク質に強固に結合していると考えられる。そこでいったんC a m R を4 Mのguanidium chlorideで変性させてから有機化合物を抽出し、G CとG C—M Sにロードした。その結果をFig. 3-2に示す。

パネルAのガスクロマトグラムのとおり、保持時間3.2 minにシグナルが検知された。そこは標準*d*-camphor試料と同じ溶出位置であった (そのほかにストック標品に含まれていたD T Tなどが保持時間5.6 min以降の位置に多数分離された)。この保持時間をもつ検体をさらにM Sで解析したところ、その質量数のイオン強度分布は*d*-camphorに固有のスペクトルを示した (パネルB)。G Cによりその存在量を求めたところ (パネルAのグラフ)、C a m R タンパク質10 µgあたり5 ng、すなわちC a m R ダイマー100分子あたり15分子の*d*-camphorを含んでいた。コントロールとして、C a m R を変性させた後に透析を施したサ

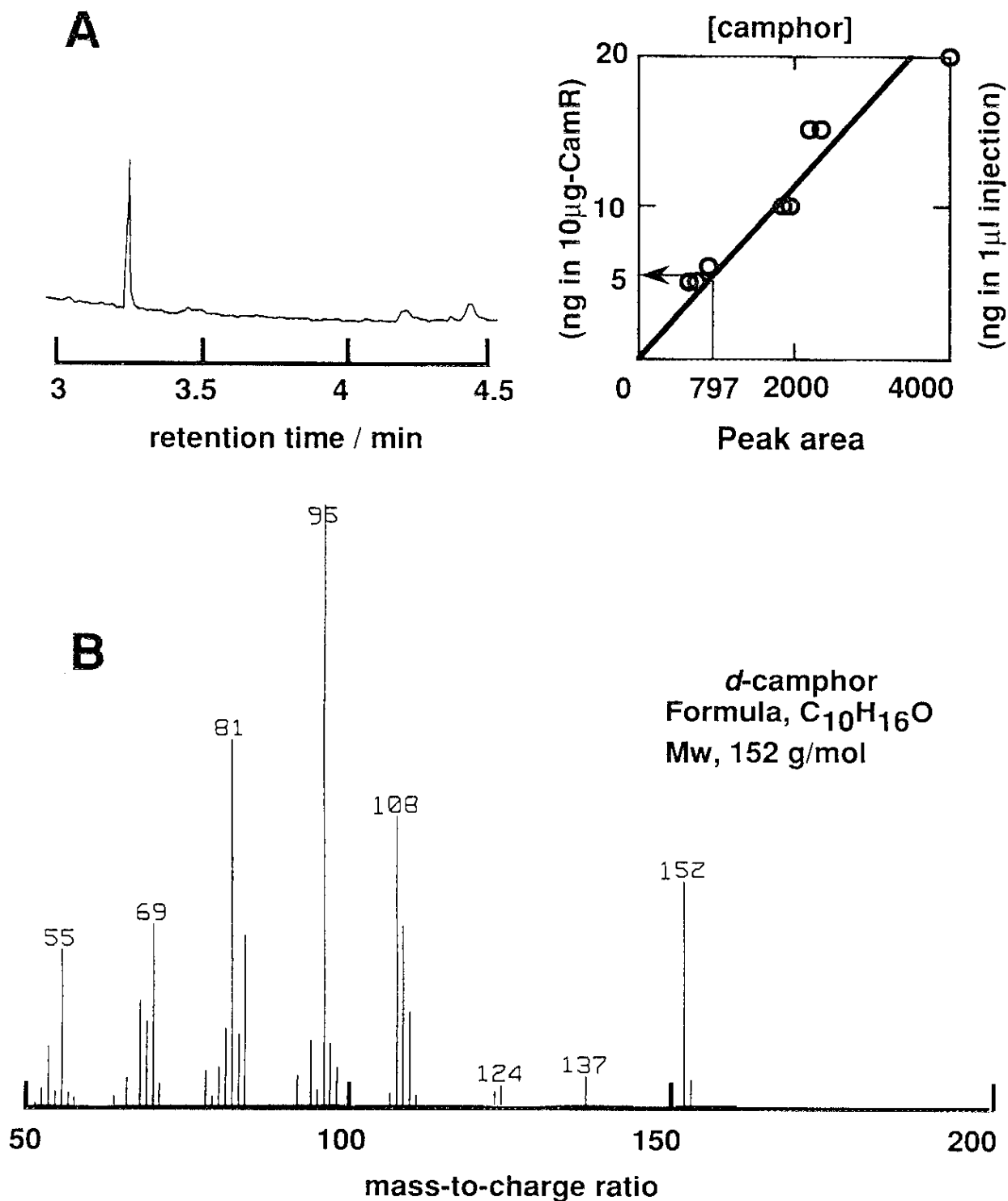


Fig. 3-2.

Detection of CamR-bound camphor.

Purified CamR protein was denatured with guanidium chloride. A half portion of the sample was solvent-extracted, dehydrated, and subjected to (A) FID gas chromatography and (B) EI mass spectrometry. The other portion was dialyzed as a control before the analyses. The amount of detected camphor molecule is shown in the calibration curve (injected sample was 2-µl volume, equivalent to 20 µg of CamR protein). No camphor molecule was detected in the dialysate. Measurements were duplicated.

ンプルを分析したが、そこには*d*-camphorは検出されなかった（データ省略）。

以上の結果、C a m Rタンパク質の中には*d*-camphorが結合したフラクションが15%（ダイマー当量）存在していたことから、最大それだけの割合の分子はDNAとの安定な複合体を形成できないと予測される（蛍光滴定法²¹⁾による予備的実験から、*d*-camphorが1分子だけ結合したC a m Rダイマーにはオペレーター結合能が認められたものの、2分子結合したものにはその活性が失われていた。データ省略）。

2. 未修飾および蛍光修飾C a m RのDNA結合活性

C a m Rリプレッサー1分子の可視化も、RNAポリメラーゼの場合（Fig. 2-3）と同様に抗体（タグリンカー）を介して蛍光タグを導入する手法を用いた。ただし使用したポリクローナル抗体はC a m Rダイマー全体を抗原として得られたものであったため、タグリンカーの結合がC a m RのDNA結合活性に大きな影響を及ぼしている可能性がある（本章第2節）。そこで1分子ダイナミクスアッセイの前に蛍光標識化C a m Rと未修飾C a m Rとの比活性を求めた。また、上のGC-MSの結果から未修飾C a m R自体にもDNA結合能の低い、あるいは失活したフラクションが存在していることが予測されるため、同時に活性画分の定量を試みた²¹⁾。

未修飾、蛍光修飾それぞれのC a m Rタンパク質をモル比で15倍過剰量のDNAフラグメント（オペレーターを含む3 Kbp長）と結合させ、複合体形成能のある画分をグリセロール密度勾配遠心にて単離した。ELISA法によりC a m Rを、電気泳動後のデンストメトリーによりDNAフラグメントをそれぞれ定量した結果がFig. 3-3のグラフである。各コンポーネント単独でのプロファイルを見てみると、未修飾C a m Rは画分12に（パネルA）、蛍光標識化C a m Rは画分11に（パネルB）、そしてDNAフラグメントは画分7に（パネルC）含まれていた。未修飾C a m Rの一部にはアグリゲートと思われる密度の大きいフラクションが検出された²¹⁾。

当初、DNAとタンパク質の複合体はより重い画分に検出されると考えていたが、実際のプロファイル（パネルDとE）では、DNAは画分8（未修飾C a m R共存下）または画分9（蛍光標識化C a m R共存下）と、DNA単独での位置より軽い画分に現われた（破線）。これはDNA分子の体積がそれぞれ3.1%（未修飾C a m R共存下）および9.6%（蛍光標識化C a m R共存下）増加したことを表わしており、C a m Rタンパク質の結合がDNAのコンフォメーション変化をもたらしたためと考えられる²¹⁾。

パネルDとE両方のタンパク質のプロファイル（実線）にはともに2つのピークが認め

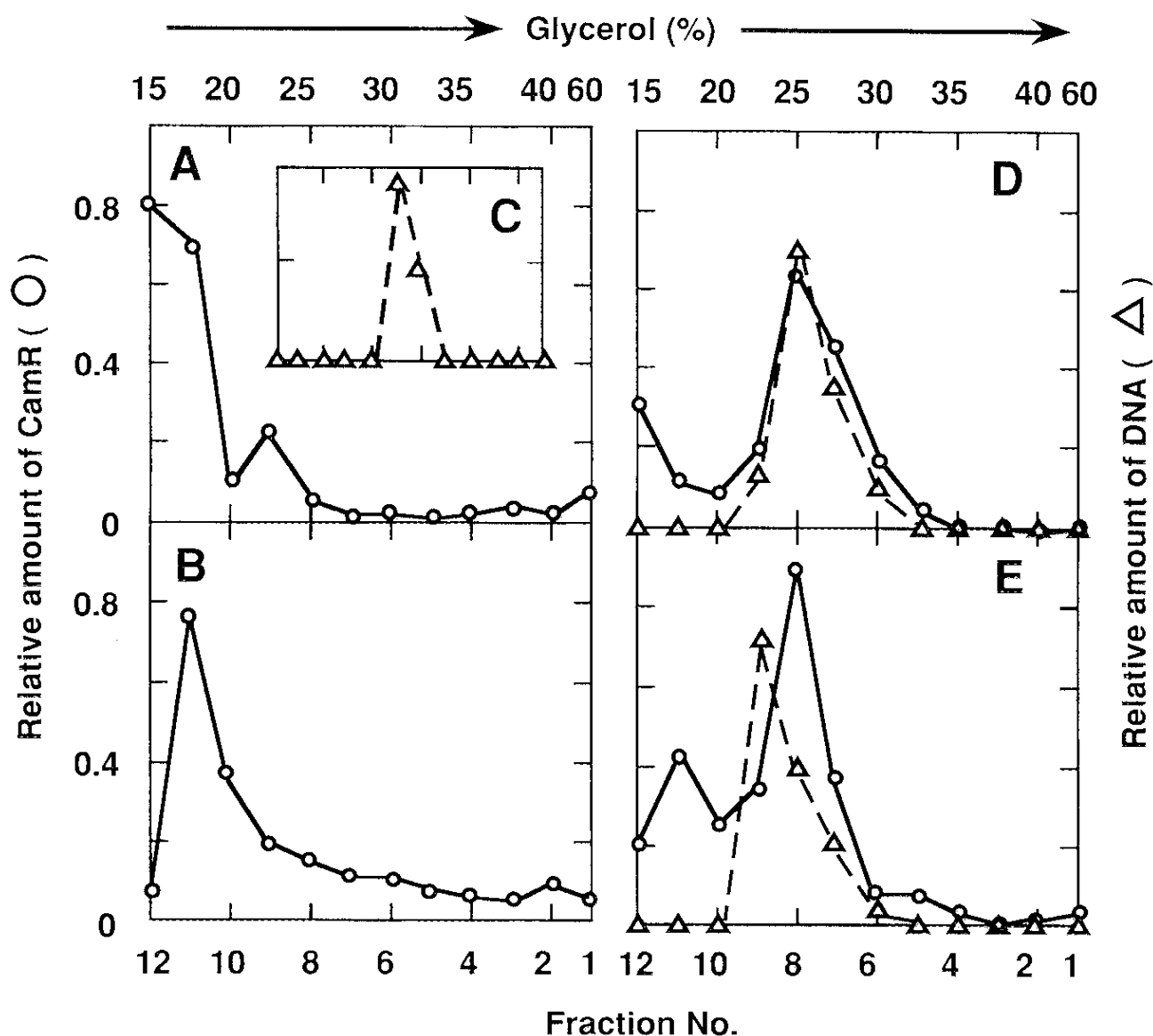


Fig. 3-3.

Sedimentation assay for DNA binding activity of *P. putida* CamR repressor. Operator-carrying 3-kbp DNA fragment (20 pmol) was preincubated with intact or labeled CamR protein (1.3 pmol in dimer). The mixtures were centrifuged through 1.7 ml of 15-60 % glycerol gradients and removed into 12 fractions. The amounts of protein (circle) and DNA (triangle) contained in each fraction were quantified by ELISA and densitometry after agrose-gel electrophoresis (*vide text*, experimental part). The scales of ordinates were normalized to the maximal values. Sedimentation profiles of (A) intact CamR alone, (B) the DNA alone, and (C) labeled CamR alone are shown, and those of the incubated mixtures with (D) intact and (E) labeled CamR are represented. Arrows indicate the direction of sedimentation.

られたが、A、Bとの比較からそれらは遊離タンパク画分とDNA-CamR複合体画分であると考えられる。各ピーク面積の比を求めたところ、未修飾のCamRの86%がDNAと結合しており、残りの14%は複合体を形成していなかった（パネルD）²¹⁾。この値は、GC-MSで定量した*d*-camphorに結合したCamRのフラクションの比率15%とよく一致している（前項）。

蛍光修飾されたCamRの場合は、78%がDNAと複合体を形成していた。蛍光ラベル後のDNA結合活性は修飾前と比較して91%保存されており、このことは本研究遂行中に確立した標識法の優良品性を表わしていると思われる。8割の分子がDNA結合活性を有していたことから蛍光標識化CamRは今後の分子動態の観測に適うと判断しアッセイに使用した。その際、約20%のフラクションがDNAとの安定な複合体形成ができないものであることを考慮する必要がある。よって、今後の1分子ダイナミクスアッセイで得られるであろう結果、たとえばトラッピング（第2章第3節）のようなトレースの割合には不利に計上されると予測される。

3. 1分子ダイナミクスによる静的複合体の検出

「 λ ::*camO* DNA」を用いてスライドガラスにDNAベルトを調製した。このDNAは λ gt11 DNA（全長約44Kbp）のほぼ中央の位置（19.6 Kbp）の1カ所だけにCamRのオペレーター*camO*を含む領域をサブクローンして得たものである。

10 mMのMg²⁺を含む蛍光標識化CamRの溶液をDNAベルトの上に置き25℃の恒温下で顕微鏡観察したところ、RNAポリメラーゼのとき（Fig. 2-4）と同様にベルト内にトラップされた光点が検出された（Fig. 3-4のパネルA）。このような「トラッピング」の場所はオペレーターと予想される位置（パネル上部の黒線）とよく一致していることから、リプレッサーとオペレーターとの複合体が可視化されていると思われる。しかしながら、それ以外にもCamRはDNAの末端付近、あるいは端から4分の1の所にも複合体を形成していた。

パネルBはDNAをセグメントに分けてどの位置にいくつCamRがトラップされているのかをまとめたヒストグラムだが、半数以上の分子がオペレーターと予想される位置に集中しているものの、やはり末端部分や端から12、13 Kbpの位置に分布のピークが認められた。Mg²⁺の濃度を10 mMから0 mMまで変化させても、若干の数の違いが認められた程度でパネルBの分布のパターンに顕著な変化はみられなかった。また、第2章で用いたCamRの結合部位をもたない λ *cl*^{68/57} *Sam7* DNA（以下、 λ DNAと略す）ベルトで同様にアッ

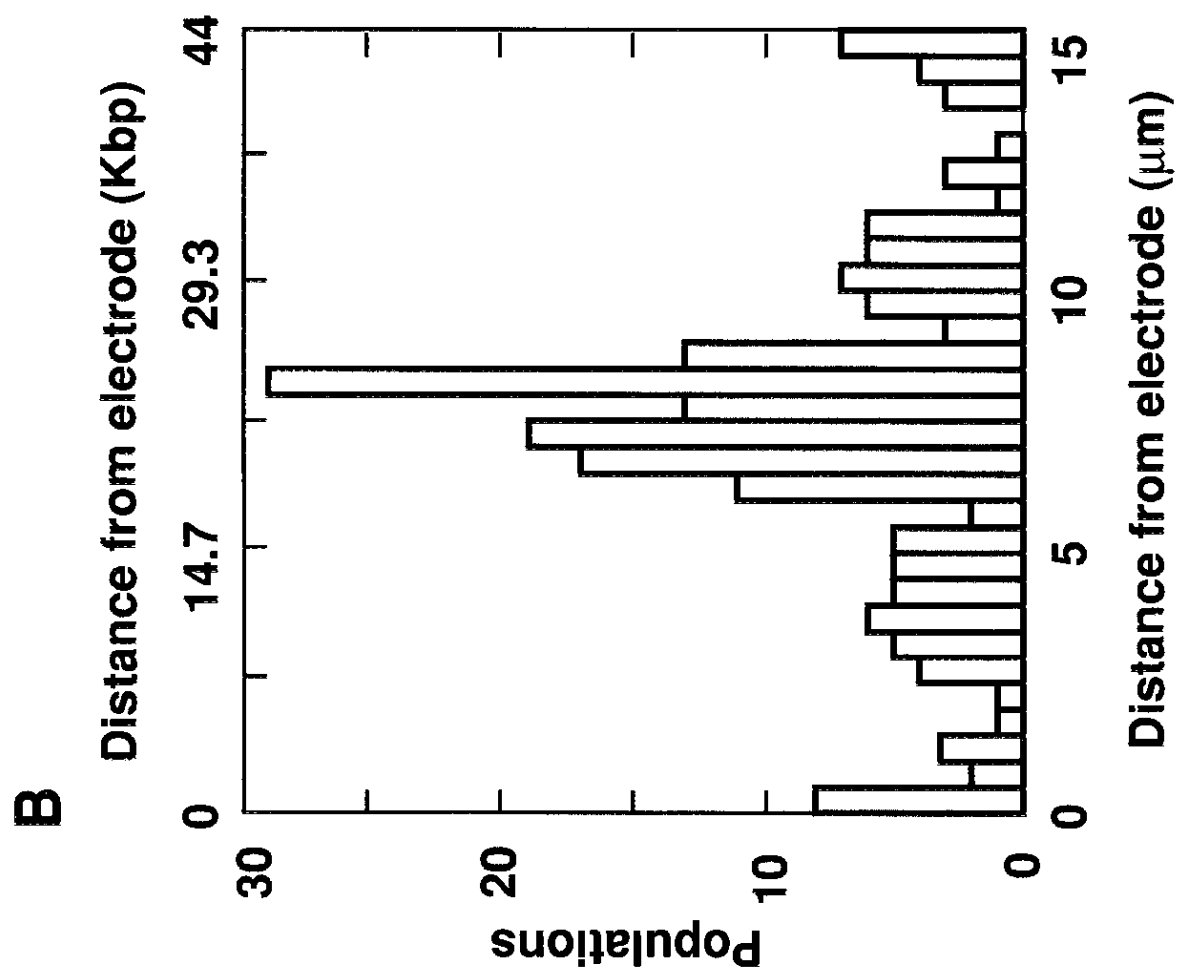
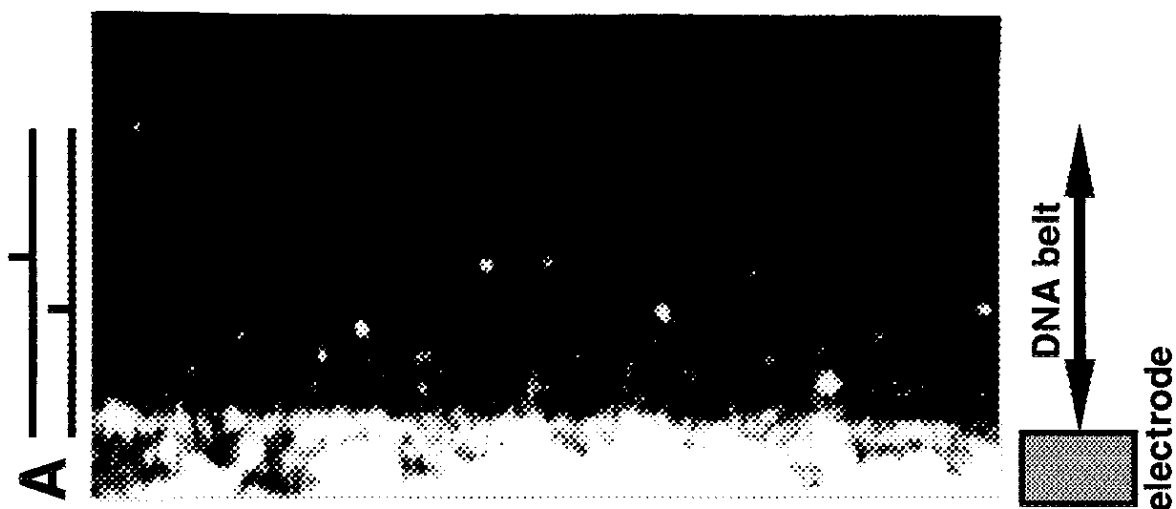


Fig. 3-4.
 (A) *P. putida* CamR repressor trapped on immobilized $\lambda::camO$ DNA carrying a single operator at position 19.6 Kbp (bars).
 (B) Locations of 191 molecules in the belt.

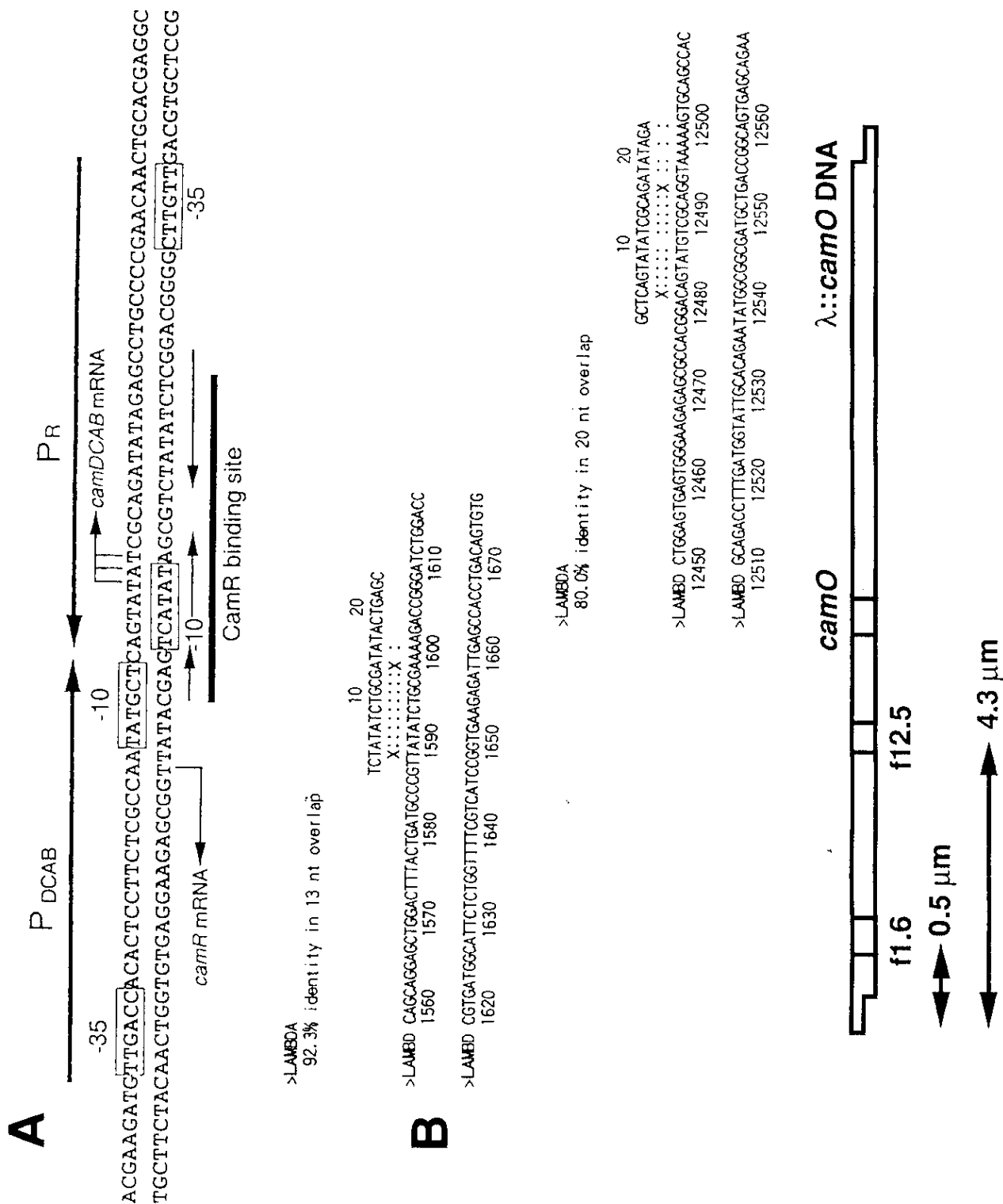
セイしたところ、やはりDNAの末端付近、あるいは端から4分の1の場所にトラッピングが認められた（データ省略）。

4. シュードオペレーターの発見とCamRとの結合

そこで、用いたDNA上にCamRの結合部位とホモロジーのある配列がないかどうか、λファージの全ゲノムシーケンス^{2,3)}の中から検索を試みた（Fig. 3-5）。その結果、本来*Pseudomonas putida*には感染しないλファージのDNA上に1588から1610 bpまでと12477から12499 bpの2カ所にのみ、80%から90%と非常に高いホモロジーをもつ配列が見い出された。実際、λgt11 DNA（ひいてはλ::camO DNA）中にはこれらの領域が保存されており^{1,3)}、それぞれがFig. 3-4のヒストグラムで見られたピークに該当する場所（末端部分や端から12、13 Kbpの位置）に存在していた。以下、2つの部位をf1.6およびf12.5と略す。

f1.6とf12.5にCamRが結合し得るかどうかは、ゲルシフトアッセイで実験的に確認した（Fig. 3-6）。f1.6とf12.5それぞれを含むλDNAの制限酵素断片と、それらの副産物としてCamRの結合部位とはホモロジーのない1922から2212 bpまで（以下、f2.0と略す）を含む断片を精製した。プローブにオペレータを含むDNAフラグメントをアイソトープラベルしたものを用意し（レーンNC）、これとCamRとを結合させてゲルシフトの位置を確かめた（レーンPC）。その反応ヘノンカットのλDNA、あるいはf1.6、f12.5、f2.0を含むDNAフラグメント各々を加えたところ、プローブの量に対してノンカットのλDNAは200倍の過剰量（モル比）で、f1.6は400倍の過剰量で、f12.5では1000倍の過剰量でゲルシフトされないプローブが現われた。ノンカットのλDNAは、f1.6、f12.5断片よりも競争阻害の効果が大きかったが、これは塩基対の圧倒的な数の違いによるためか、あるいはホモロジー検索で見い出せなかったような未知のCamR結合部位が存在するためであると考えられる。一方、f2.0の場合は1000倍過剰量の範囲ではゲルシフトの競争阻害は見られなかった。

当初、f1.6とf12.5をプローブとして直接CamRとの結合反応を同じ実験条件下で調べたが、レーンPCのようなシフトしたバンドは得られなかった（データ省略）。つまり、CamRとの親和性は本来のオペレーターよりもかなり弱いと考えられる。それで本項のような結合の競争反応という形式（competition assay）での間接的なゲルシフトアッセイとなったが、以上の結果をまとめると、f1.6とf12.5の配列はオペレーターのものと極めて高いホモロジーもち、それらは確かに部位特異的な結合をCamRと行なうことが明らかとなった。したがって、f1.6とf12.5はシュードオペレーターともいえるべき部位であり、それらの



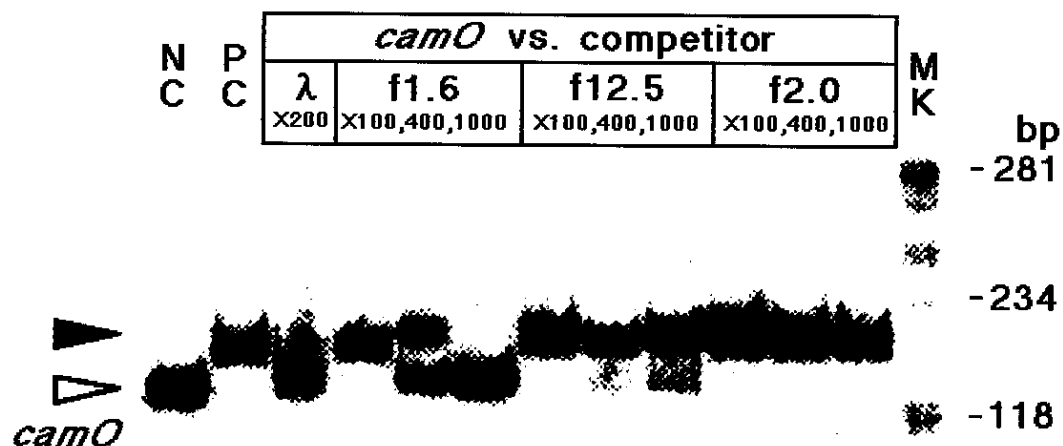


Fig. 3-6.

Gel shift assay for pseudo-operator binding of *P. putida* CamR.

CamR dimer (1250 nM) and ^{32}P -labeled *camO* DNA (0.25 nM) were equilibrated in the presence or absence of molar excess of non-labeled competitor DNA.

Competitors used are 50 nM of non-cut λ DNA, 25-250 nM of pseudo-operator DNA f1.6 (115 bp) and f12.5 (144 bp), and 25-250 nM of non-homologous sequence f2.0 (290 bp), as indicated on top.

Lane NC, no CamR protein added. Lane PC, CamR without competitor added. Lane MK, molecular size standards, indicated at the right. The samples were loaded onto a running 4.0% polyacrylamide gel. Black arrowhead shows gel shifts.

存在がFig. 3-4でのトラップされたC a m R分子の分布に影響を与えているものと考えられる。

5. 免疫沈殿による静的複合体の検出

シュードオペレーターf1.6とf12.5の存在が明らかになったが、Fig. 3-4のヒストグラムからはさらに多数のC a m R結合部位が $\lambda::camO$ DNA上の広範囲のセグメントにわたって存在していると考えられる。あるいは、このような緩慢な分布の原因が本研究のアッセイ法にあるのではないかという可能性が挙げられる。前説を肯定し後者を否定するため、以下の実験を行ない検証した。概要を図示する (Fig. 3-7のパネルA)。

$\lambda::camO$ DNAの種々の制限酵素断片を調製し (パネルCのレーンO)、未修飾C a m Rとの間に複合体を形成させ、それをanti-C a m R IgGを介してprotein G-Sepharose樹脂に結合させ遠心回収した (パネルBのレーンr、その上清がレーンs)。低塩濃度の緩衝液で2回洗浄と遠沈を繰り返した後 (その上清がパネルCのレーンW1とW2)、除タンパク処理により複合体からDNAを単離して電気泳動で分析し、C a m Rが $\lambda::camO$ DNA上のどの場所に安定に結合していたのかを巨視的に捉えようと試みた (パネルCのレーンr)。この実験条件では、溶液中のC a m RをすべてSepharose樹脂のペレットとして回収することができた (パネルBのレーン8)。そこに含まれている $\lambda::camO$ DNAの制限酵素断片をまずTE溶液で洗い出し (パネルCレーンW1)、つぎに50 mMのNaCl含有TE溶液で洗いを行なったところ (レーンW2)、C a m Rと比較的弱く結合していたと考えられる断片群が遊離した。2回の洗いの後にもかかわらずC a m Rに結合していた断片群がレーンrに検出され、そのいずれの中にもオペレーター $camO$ とシュードオペレータf1.6、f12.5を含んだ断片が存在し、そのほかにもいくつかの断片が見い出された (パネルD)。

これらの結果は $\lambda::camO$ DNA上にホモロジー検索で見い出せなかった結合部位の存在を明らかにするとともに、Fig. 3-4に現われた分布のパターンを支持する。

なお、実験に関して注記を添える。

- a) C a m Rを加えずanti-C a m R IgGとprotein G-Sepharose樹脂だけで実験を行なったところ、少量の制限酵素断片が樹脂と共沈されたもののそれらはすべて2回の洗いの操作で樹脂から遊離され、パネルCのレーンrの様には電気泳動で検出されなかった (データ省略)。
- b) 使用した λ gt11 DNAとそれ由来の $\lambda::camO$ DNAについて、3つのBam HI 認

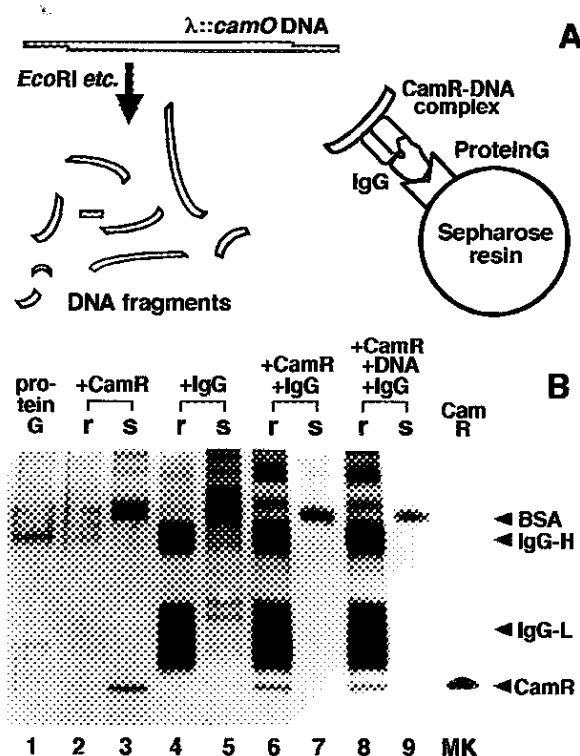


Fig. 3-7.

Immunoprecipitation assay for determination of location of CamR trapped on $\lambda::camO$ DNA .

(A) Schematic diagram of the isolation of CamR-bound DNA fragments using a solid phase immune complex (a modification of the procedure described by McKay, 1981). $\lambda::camO$ DNA was cleaved with *Eco* RI, *Sst* I plus *Bam* HI, or *Hpa* I as presented in the following page (C, lanes denoted by "o"). The DNA samples (4.4 ng/ml) were preincubated with CamR (7.7 ng/ml), BSA (4 ng/ml), rabbit anti-CamR IgG (1.5 mg/ml), and slurry of Protein G-Sepharose (32 μ l), and centrifuged. Supernatants were removed (B, lanes denoted by "s") and pelleted Sepharose resins were rinsed with TE buffer. The wash solutions were saved (C, designated as "W1") and residual resins were rinsed again with 50 mM NaCl / TE buffer. After the removal of the buffer solutions (C, "W2"), resins were resuspended in 0.5% SDS, 10 mM Tris, 50 mM NaCl (lane "r" in each panel) and electrophoresed through (B) a 12.5 % polyacrylamide gel and (C) 0.7% agarose gels (*vide* text, experimental part).

(B) SDS-PAGE of immune complexes. Proteins were visualized with silver staining. Lanes 1 to 9 contained Protein G-Sepharose. Lane 1, no proteins added; lane 2 to 9, added as indicated; lane MK, purified CamR alone.

(continued)

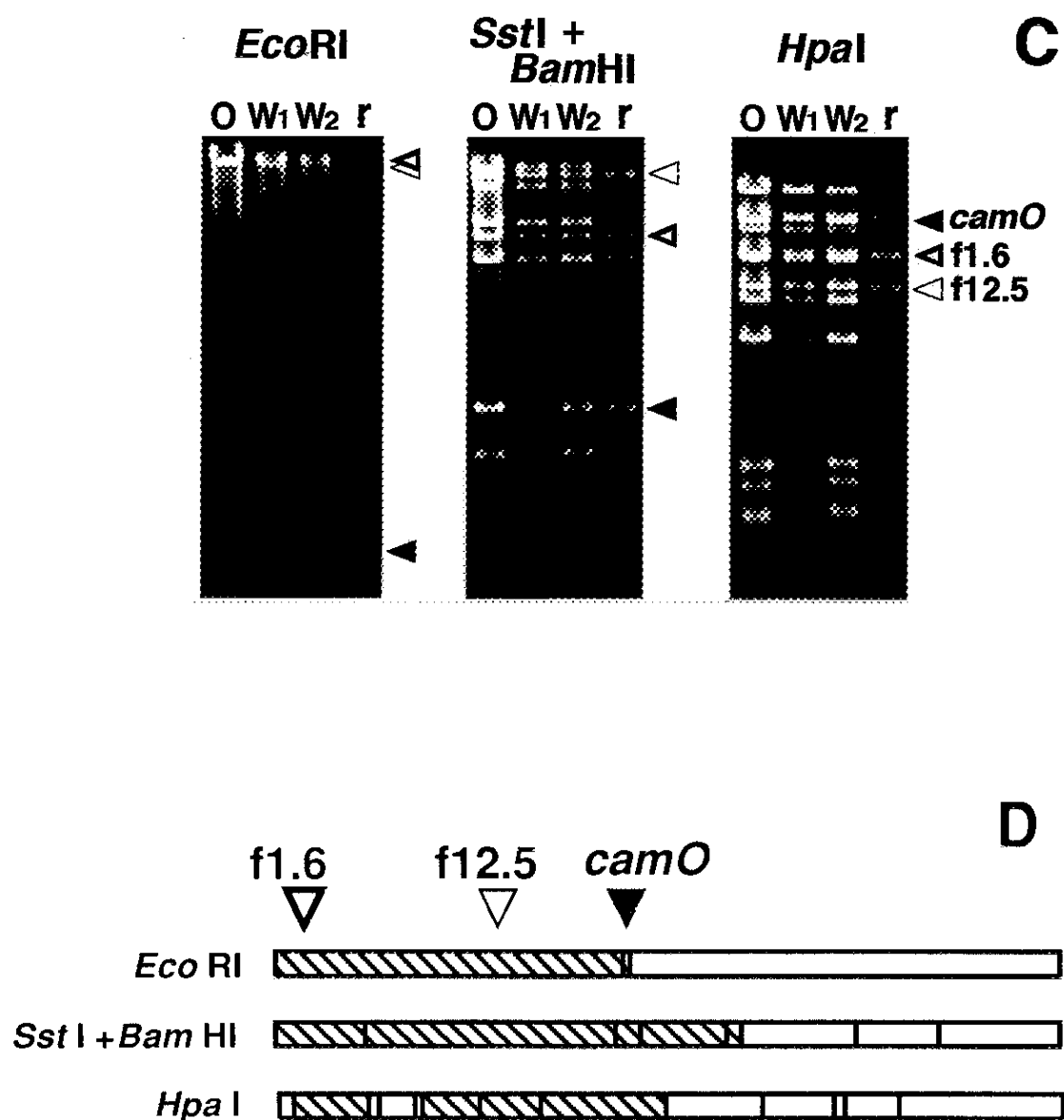


Fig. 3-7. (continued)

(C) Immunoprecipitated DNA fragments bound to CamR.

DNA was stained with 0.5 μ g/ml of EtdBr.

Arrowheads indicate fragments carrying *camO*, f1.6, and f12.5, respectively.

(D) Summary. Shaded boxes indicate the locations of the DNA fragments visualized in lane r in each panel (C).

識部位の中に非常に切断されにくいものがあつた（28 Kbp近辺と35 Kbp近辺の2カ所）。メチル化などの影響と考えられるが詳細は不明である。そのために完全ダイジェストされない長鎖断片がパネルCとDの「*Sst* I+*Bam* HI」に見られるが、それは制限酵素地図から容易に判別され得られた結論にはなんら影響を与えないものである。

3から5項で明らかにしたように、1分子ダイナミクスアッセイでは親和性の弱い部位特異的複合体を直接可視化することが可能である。一般的にゲルシフト法やフットプリント法^{2,4)}などで可視化されるシグナルは、プローブとタンパク質の解離が検出され得るだけ十分遅い（最低限、電気泳動中もしくは切断反応中は解離しない）複合体のみを反映しているに過ぎず、それらアッセイ法のネガティブデータは解離速度の大きい複合体や結合速度の小さい複合体の存在を否定しない。どのような複合体が検出されるかは、要する時間やプローブの種類などアッセイ法の性質によるだろう。本研究における1分子ダイナミクスアッセイは、複合体をリアルタイムで直視観察する技術である点で間接的な分子生物学的手法とは異なる利点を有する。

6. 動的複合体、スライディングの検出

第2章の大腸菌RNAポリメラーゼの方法と結果を踏まえて、*Pseudomonas putida* CamRリプレッサーについても同様な1分子ダイナミクスアッセイを行なった。蛍光標識したCamRリプレッサーの $\lambda::camO$ DNAベルト（25℃恒温）上における分子動態を、バルクフローが1.0から20 $\mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ の速度内であつたDNAとのなす角度が30度以上のときにトレースしたところ、RNAポリメラーゼのときと同様に5つの様式、(1)トラッピング、(2)スライディング、(3)ジャンピング、(4)シンプルドリフト、(5)その他、(2)なのか(4)なのか判別不能なもの、に分類された（たとえばFig. 3-4、Fig. 3-8）。また、CamRのスライディング運動にもDNAとの間の摩擦力に起因していると考えられる速度の低下が観測され、物理化学的な相互作用力の存在が示唆された（次章で詳述）。さらに、スライディング途中でトラップされる分子も多く、それはCamRの結合部位camOオペレーターのみならず、シュードオペレーターf1.6やf12.5が位置すると期待される場所で観察された（Fig. 3-9）。

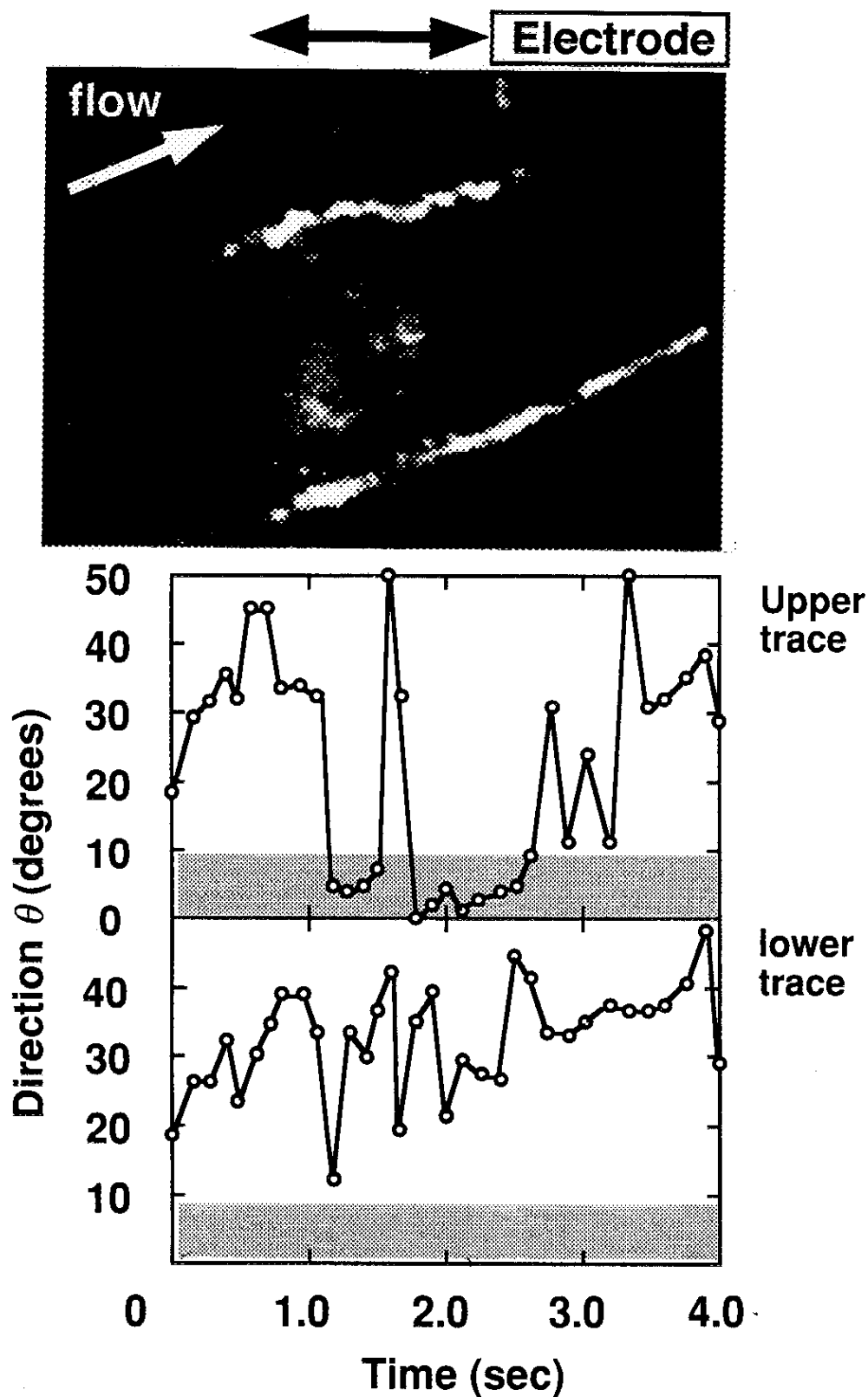


Fig. 3-8. Movements of fluorescently labeled *P. putida* CamR molecules. $\lambda::camO$ DNA belt was partially visualized with a trace amount of EtdBr. Absolute value of averaged direction θ for each 3- μ m translocation is shown. Defined region of sliding ($\theta \leq 10^\circ$) is shaded. The belt (dihedral arrow) was immobilized at 0° . The upper molecule shows sliding, and lower simple drift.

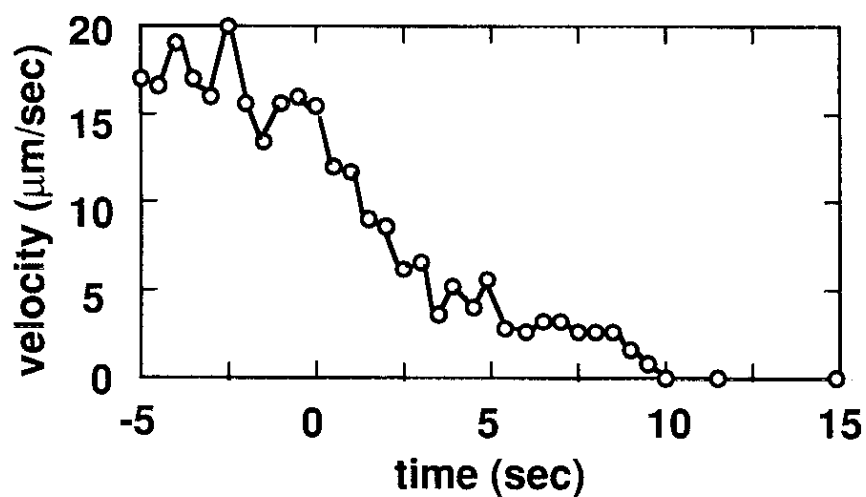
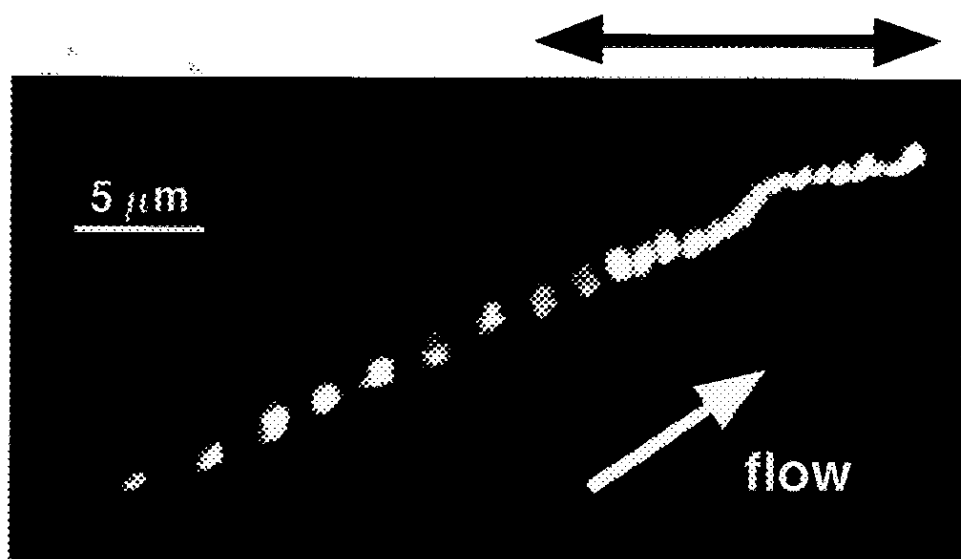


Fig. 3-9.
 Typical time course of the velocity of a sliding molecule.
 λ DNA containing no *camO* site was used in the assay.
 Labeled CamR passed the edge of the belt at 0 sec,
 and trapping occurred at 10 sec. The binding site
 agrees with the position of pseudo-operator f1.6.

DNAベルト上で観測されたトレースの統計をFig. 3-10に示す。蛍光標識したCamR分子（実線枠）について、150サンプルの半数以上がスライディング、ジャンピング、トラッピングのいずれかを示し、それらの中でさらにスライディングとトラッピングがともに4割を占めた（白抜き、縦軸の数値は左から順番に22%、10%、24%、21%、23%）。用いたDNAベルトが違うため一概には論じられないが、トラッピングの占める割合がRNAポリメラーゼのとき（6%、Fig. 2-8）と比べてかなり大きいことが特徴である。加えてFig. 3-2の結果から、約20%のフラクションがDNAとの安定な複合体形成ができないと考えられるため、トラッピングの頻度はさらにより高い可能性がある。一方、スライディングの割合はRNAポリメラーゼの方がCamRより2倍高く、このような頻度の違いはDNAとの複合体の寿命に両者間で差異があるためではないかと考えられる。

さて、このような1分子ダイナミクスのアッセイ系にオペレーターを含む32 bpのオリゴヌクレオチド（camO32 hairpin stem、本章第2節）を大過剰加えて競争反応を行なったところ（黒塗り）、スライディング、ジャンピング、トラッピングの様式が大きく阻害されほとんどの分子がシンプルドリフトを行なった（縦軸の数値は左から順番に4%、2%、6%、73%、15%）。このことはRNAポリメラーゼのデータと一致しており（Fig. 2-8）、観測された分子のトラッピング、スライディング、ジャンピングがCamRタンパク質のDNAへの結合によるものであることを示している。とくに、スライディングにはトラッピングのような部位特異性がないことからこれは非特異的DNA結合の1形態であると考えられる。

7. タンパク質のDNA結合部位とスライディング

これまでの結果はスライディングがタンパク質とDNAとの結合により派生している可能性を支持したが、さらにコントロール実験を行なってこれを確かめるとともに、スライディング運動がCamRのいわゆるDNA結合部位に起因しているのか、それともタンパク質表面の任意の部位で生じているのかについて調べた。

前項で競争阻害剤として用いたオペレーターを含む32 bpのオリゴヌクレオチドcamO32 hairpin stemにbiotin-dUTPを取り込ませ、そこに蛍光タグを導入して可視化した。この蛍光標識DNAをタンパク質のときと同様に1分子ダイナミクスアッセイした結果がFig. 3-10の統計である（破線枠）。203個の分子のトレースの内90%近くがシンプルドリフトであり、スライディング、ジャンピング、トラッピングの頻度は極めて低かった（破線枠の白抜き、縦軸の数値は左から順番に4%、0%、3%、86%、6%）。この割合はDNA結合部

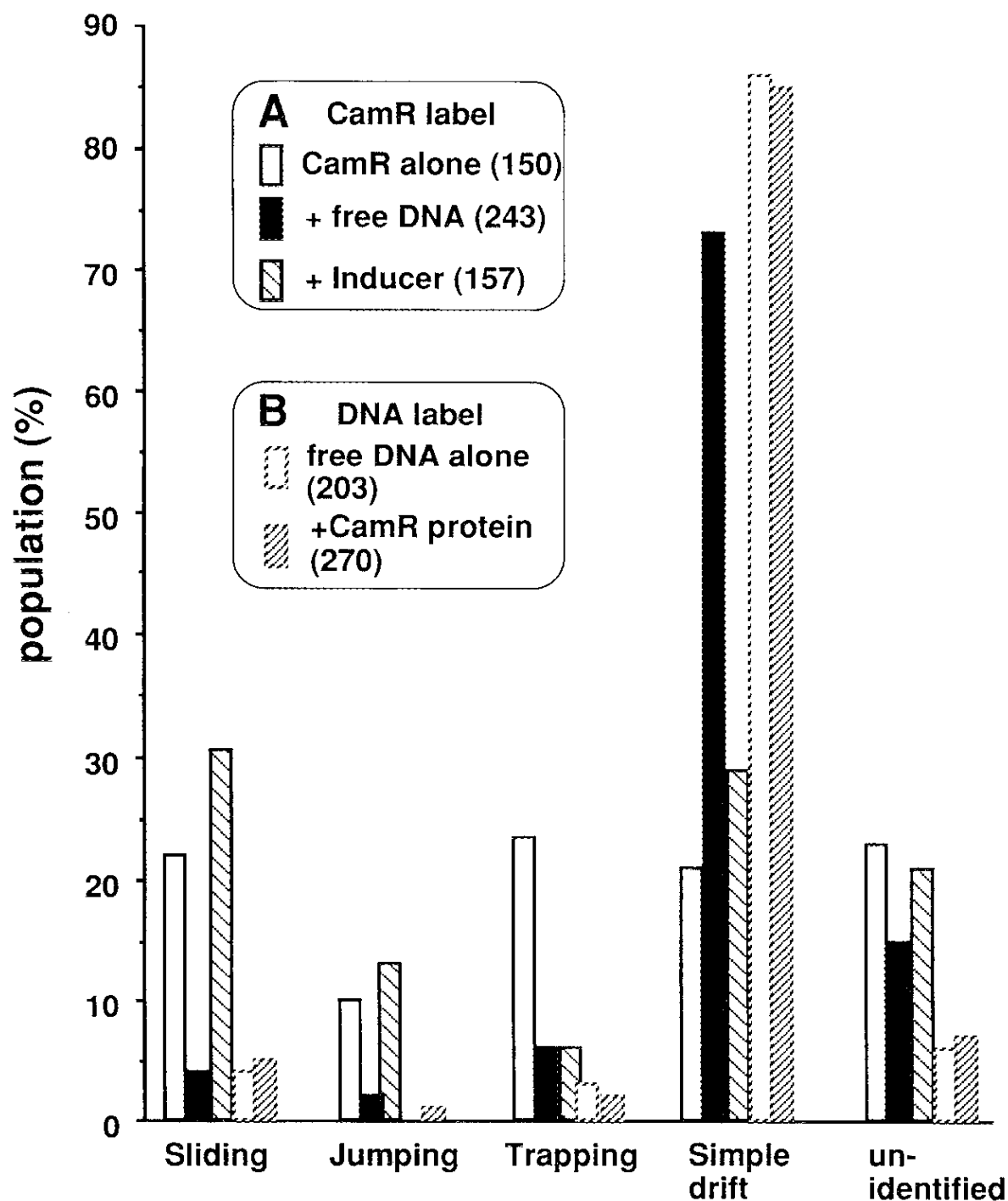


Fig. 3-10.

Statistical assay for single-molecule dynamics of free and complexed CamR. (A) Effects of operator-containing DNA and inducer on the movements of labeled CamR. Prior to assay, labeled protein (44 nM) was equilibrated with *camO* 32 hairpin stem (44 μ M) or *d*-camphor (5 mM).

(B) Modes of movements of *camO* 32 hairpin stem coupled with fluorescent tag and its complex with intact CamR.

Data collecting were the same as in Fig. 2-8 except that $\lambda::camO$ DNA belt was used in the assay. In parentheses, the total number of traces are represented.

位をもたないIgGタンパク質をアッセイしたときの結果 (Fig. 2-9) と非常によく一致する。

つぎに蛍光標識DNAとモル比8倍過剰の未修飾CamR、すなわち可視化されないタンパク質とをプレインキュベートし、その複合体をサンプルとして分子動態を観測した (破線枠の斜線)。これはDNA結合部位以外のタンパク表面でのみDNAベルトと接することができる試料である。その統計は蛍光標識DNAだけの結果 (破線枠の白抜き) とほぼ同一であり、スライディングは蛍光標識CamR単独での結果 (実線枠の白抜き) のように有意に検出されなかった (破線枠の斜線、縦軸の数値は左から順番に5%、1%、2%、85%、7%)。このことはスライディングにはタンパク質の任意の表面が関与しているのではなく、DNA結合部位が必須であることを表わしている。スライディングとは動物的かつ非特異的なDNA-タンパク質複合体であることが明らかとなった。

8. CamRの動態に与えるインデューサーの効果

CamRリプレッサー100 nMとそのインデューサーである*d*-camphor 5mMをプレインキュベーションしてから1分子ダイナミクスアッセイし、そのトレースを集計した (Fig. 3-10の実線枠斜線、縦軸の数値は左から順番に30%、14%、6%、29%、21%)。

一般にリプレッサータンパク質はインデューサーと結合するとオペレーター結合が大きく阻害されると考えられているが、それ以外の非特異的なDNA部分への結合に関する情報は極めて乏しい。筆者の結果では*d*-camphor存在下でのCamRのスライディング (非特異的) はむしろ割合からいって増加し、トラッピング (シュードまたは本来のオペレーターへの特異的結合) のみが大きく阻害された。さらにFig. 3-4に代表されるようなトラップされたCamR分子に対してあとから5 mMの*d*-camphorを添加すると、それらはいったんDNAから解離するもののシンプルドリフトしてDNAベルトから離れたり、スライディングを開始したりする動態が可視化された。つまり、少なくとも*d*-camphorとCamRの場合、インデューサーはリプレッサーの特異的相互作用のみを阻害し、スライディングに代表される非特異的相互作用には大きな影響を与えないことが明らかとなった。

以上のことから、リプレッサーには特異的・非特異的2つの結合モードを調節する機能部位あるいは構造変化が存在し、インデューサーはスライディングを含む非特異的相互作用に関与するモードには影響を与えないと推測される。

最後に、Fig. 3-10のヒストグラムについて注記する。

蛍光ラベルされたCamRタンパク質の中にはDNAと複合体を形成できない分子が20

%程度存在することが超遠心分析 (Fig. 3-3) で明らかとなり、その15%はもともと *d*-camphor に強固に結合した CamR のせいではないかと示唆された (Fig. 3-2) 。もしそうであれば本項の結果からそれらは DNA 結合全般が阻害されているのではなく、特異的結合能のみが失活している可能性があり、実線枠白抜きのスライディングのデータは *d*-camphor に強固に結合した CamR の影響を受けないが、トラッピングのデータは過小評価されている。

第4章

総括

1. タンパク質分子のDNAベルト上における動態

第2章、第3章を通じて、大腸菌RNAポリメラーゼホロ酵素および*Pseudomonas putida* CamRリプレッサーの、伸長固定化DNA（DNAベルト）上における分子動態を可視化した。両方のタンパク質に共通した事象として、溶液のブラウン運動による「シンプルドリフト」、DNA上で静止する「トラッピング」、視野に対して上下運動を行なう「ジャンピング」が観測され、さらにDNAにそって平行に移動する「スライディング」を可視化することに成功した。同一観測視野、同一観測時間内において、スライディングはこれらの動態の中でも高い頻度で検出されたことからタンパク質とDNAとの主要な相互作用様式であると考えられる（Fig. 2-8、Fig. 3-10）。

スライディングはDNAベルト内の任意の場所で観測されたが、その頻度は、タンパク質のDNA結合に対する阻害剤によって大きく低下した（Fig. 2-8、Fig. 3-10）。また、いわゆるDNA結合ドメインをもたない抗体タンパク質（Fig. 2-9）やオリゴヌクレオチド（Fig. 3-10）、あるいはそのオリゴヌクレオチドとCamRの複合体（Fig. 3-10）にはスライディングは認められなかった。これらのことから、スライディングとはDNA結合ドメインによる非特異的DNA相互作用の動的1形態であると結論される。

ジャンピングはDNAベルト内でもとくに電極のエッジ近傍でよく観測された。その点を除けばジャンピングもスライディングのように上記の傾向を示したことから、DNAとの結合が関与している運動であると考えられる。DNAの両端が電極エッジに固定された場合ループを形成することがあるが（第2章第3節2項）、ジャンピングはそのように垂直方向に固定されたDNA上のスライディングではないかと思われる。

トラッピングについても同様にDNA結合によるものであることが示された（Fig. 2-8、Fig. 3-10）。トラッピングはスライディングと異なりベルト上のある特定の場所で生じ、そこはプロモーター（Fig. 2-4）やオペレーター、シュードオペレーター（Fig. 3-4）といったタンパク質が特異的に結合する位置に該当した。トラッピングとはタンパク質の特異的複合体形成であると考えられる。スライディング中にそれら特定の部位でトラップされることもしばしば可視化され（Fig. 2-10、Fig. 3-9）、タンパク質が特異的部位との結合までの道程としてDNA上をスライディングすることが可能であることを示している¹⁻⁸⁾。

2. スライディングの性質

RNAポリメラーゼとCamRリプレッサーとの間には、唯一DNA結合活性をもつ点を除けば、種の由来、サブユニット構造、機能（合成酵素と調節タンパク質）などタンパク質自体の性質に共通性は乏しい（第1章、Table 1）。しかしながら、ともにDNA上のスライディングが観測されたことから、これはおそらくDNA結合タンパク質のDNAに対する普遍的な相互作用様式ではないかと思われる。ただし、現在統計的な解析を行なっている段階ではあるが、スライディングの平均距離にはRNAポリメラーゼとCamRリプレッサーの間で差がみられ、前者の方が後者より長い傾向が認められた。タンパク質が、固有の性質としてスライディングの平均長を有している可能性がある（後述）。

本研究で用いた1分子ダイナミクスアッセイでは、RNAポリメラーゼとCamRリプレッサーのスライディングは、バルクフローが $0.5\ \mu\text{m} \cdot \text{sec}^{-1}$ 以下のゆったりとした速度のときは、ランダムなブラウン運動にスーパーインポーズされて明白にトレースされなかった。バルクフローの付与により流速が増加すると、スライディングはより長じてはっきりトレースされるようになり、それは見かけ上 $3\ \mu\text{m}$ 以上にわたる距離に及んだ。これまでに主に速度論的研究から求められてきた種々のDNA結合タンパク質のスライディング長は 10^2 から 10^3 bp、約40から400 nmであり²⁻⁸⁾、これは光学顕微鏡の分解能を越えた微小さである。

もしスライディングが「距離」よりもむしろ「時間」で規定されているなら、たとえばタンパク質はDNAと非特異的な複合体を形成して寿命の間にスライディングを行なっているのであれば、より速度の大きいバルクフロー（溶媒分子との方向性をもった熱衝突）の付与はより長いスライディング距離を与える。これは第2章第3節10項と第3章第3節6項の結果、

(1) 観測されたRNAポリメラーゼのスライディングの平均時間は、速度論的*in vitro*実験による解離速度定数から求められる非特異的複合体の寿命と同程度であった²⁾。

(2) 最大 $20\ \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ 以下の範囲ではバルクフローの速度と観測されるスライディングの平均距離はほぼ比例した。

ことと一致する。

筆者が観測した長い距離のスライディングは、このことを反映したものであると考えられる。非特異的なDNA-タンパク質複合体の寿命がタンパク質個々によって異なるものなら、それに付随したスライディングの平均距離もまたタンパク質固有の性質であると言える。

3. スライディングの機構

今回1分子ダイナミクスアッセイで用いた溶液にはATPなどエネルギー源になり得るような物質は含まれていない。バルクフローの速度とスライディングの距離との関係が示すように、スライディングは溶媒分子との熱衝突に起因する受動的な運動であると考えられる。スライディングをしているタンパク質の運動をトレースすると、シンプルドリフトの場合に見られるブラウン運動によるトレース角の揺らぎがほとんど生じなかった (Fig. 2-6、Fig. 2-10、Fig. 3-8)。DNAとの結合によりタンパク質がブラウン運動に対して抵抗性を獲得したためと思われる。このような特異的ではないが比較的安定で動的な複合体の状態を、Crothersらは「準結合状態 (semi-bound state)」と呼んでいる⁷⁾。von HippelとBergは、タンパク質-DNA間の静電相互作用が準結合状態を維持しスライディングを可能としているのではないかと仮定している^{1, 8)}。しかし筆者のアッセイでは、比較的正電荷に富む抗体タンパク質にスライディングの存在を認めなかったことから (Fig. 2-9)、スライディング中のタンパク質は一義的に静電引力だけでDNAとの準結合状態を形成しているのではなく、それ以外にもタンパク質 (のDNA結合ドメイン) の構造に起因するような相互作用力が働いているのではないかと推測される。

準結合状態に関して筆者はつぎのような1モデルを想定している。高分子溶液物性学の知見⁹⁾に則れば、帯電表面の近傍は、水分子やカウンターイオン群の粘性・配向性の面でバルクの溶液中とは非常に異なる環境を提示している^{10, 11)}。それは一般に界面電気2重層と呼ばれ、分子間のLondon-van der Waalsエネルギーと静電的反発エネルギーの総和で定義される⁹⁾。ポリアニオンであるDNAの場合、界面電気2重層は2重鎖にそって周囲をシリンダー状に被うように生じており、その精密な構造や強度は場所ごとの塩基配列に依存していると考えられる。そのような界面電気2重層が、タンパク質のDNA結合ドメインの界面電気2重層を捉え、潜在的にスライディングのための軌道として働いていると推察される。筆者はこれが準結合状態の実態ではないかと考えている。スライディング中のタンパク質が標的部位に接近すると、それまで接してきた非特異的塩基配列周囲にあるものとは違った界面電気2重層に遭遇するだろう。この空間は標的部位の化学的雰囲気や構造に起因したものであるが、そことタンパク質とで界面電気2重層同士が重なり合えば両者により強い親和性が生じる。親和性の強弱は界面電気2重層の位相が合致するかどうかで決定され、非特異的DNA周囲の界面電気2重層との重なりは、標的部位周囲のものとの重なりより劣ると予測される。よく一致した重なりはタンパク質と標的部位との間に水素結合をもたらし、特異的複合体を形成させる。実験的証拠はないものの、この段階が「塩基の読みとり (readout)」であり「認識」ではないだろうか。もしそうであれば、

タンパク質は界面電気2重層の重なりを通したreadoutの試行を繰り返し、あるいはその過程で不完全な水素結合形成による「読み誤り」を起こしているとも想像される。現に、Fig. 2-10やFig.3-9は、DNA結合タンパク質が特異的部位の探索を行なう際にスライディングをDNA上の移動手段として活用している可能性を示唆している^{1, 2, 8)}。それが摩擦力としてスライディングの際の速度の低下に現われているのかもしれない。このようなモーメントの変化は種々のDNA結合タンパク質に関する速度論的実験²⁻⁸⁾や理論的研究¹²⁾からも同様に指摘され、スライディング中の分子の拡散係数は100分の1から1000分の1減少する。

4. インデューサーの分子的作用

第3章10項で示したとおり、*d*-camphorは*Pseudomonas putida* CamRタンパク質のスライディングは阻害せず、トラッピングの頻度のみを大きく低下させた。スライディングは非特異的結合を、トラッピングは特異的結合を反映した分子動態であることから、CamRと*d*-camphorの場合にはインデューサーはリプレッサーの特異的相互作用のみを破壊すると考えられる。大腸菌の*lac*オペロンを調節するリプレッサー (LacR) とそのインデューサーの一種IPTGの結合についても、IPTGはLacRの非特異的なDNA結合能に影響を与えないことがニトロセルロース膜法¹³⁾やカラムクロマトグラフィー法¹⁴⁾、分光学的方法¹⁵⁾を利用した実験から報告されている。もしかするとインデューサーの分子機能の本質は非特異的相互作用を積極的に生かしておくことではないだろうか。DNA結合の非特異性が*in vivo*で果たしている役割、とりわけスライディングを巡る生理的意義の解明は現在進行中である。

最近HinrichsらのグループはCamRと非常にホモロジーの高いTetRタンパク質 (本章第1節) に関して、そのインデューサーであるtetracyclineとの共結晶構造 (DNA非共有) を解き、リプレッサーのオペレーター結合活性を調節するインデューサーのメカニズムを考察している¹⁶⁾。そこでは、結合した2分子のtetracyclineがTetRダイマー内の6番目のアルファヘリックスを軸として2本のヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフをそれぞれ相反する向きへ動かし、結果としてDNA結合ドメインの空間を広げるような構造変化「seesawモデル」が提案され、このドメイン空間の拡大がTetRの特異的オペレーター結合能を失活させる原因であると考えられている。残念ながらTetRの非特異的DNA結合とtetracyclineの関係を研究した例はなく、「seesawモデル」がオペレーター以外のDNAに対して適用され得るか否かは不明だが、広げられたDNA結合ドメインは特

異的DNA結合のみが不能で、非特異的相互作用は許す形状をとっている可能性がある。おそらく、CamRタンパク質にもd-camphorによる同様な構造変化を通した機構が介在しているのではないかと予測される。

現在Shirakihara、Yura・GoらのグループによりCamRのX線結晶構造解析およびモジュール解析の研究が始められている。d-camphorとCamRのDNA結合に関する機能-構造関連の解明を待ち望むとともに、本実験での知見がそれらへの一助となり得ることを期待する。

5. DNAとタンパク質の非特異的複合体

Pseudomonas putida CamRリプレッサーと $\lambda::cam$ ODNAとの相互作用に関して (Fig. 3-4)、リプレッサーはいわゆるオペレーター配列以外にも複数の部位と結合できることを明らかにした。部位の内訳は、まずf1.6、f12.5のシュードオペレーターで、ホモロジー検索による結果であった (Fig. 3-5)。f1.6とf12.5をプローブにしてCamRとの結合をゲルシフトアッセイで確認することを試みたが、オペレーターをプローブに用いた場合にはシフトしたシグナルが得られなかった。そこでcompetition assayを併用したゲルシフトアッセイで2つとも確かにCamRと結合することを証明したが (Fig. 3-6)、それは親和性が本来のオペレーター部位よりも弱い結合であると考えられた。つぎに1分子ダイナミクスアッセイを用いて、それらシュードオペレーターとCamRが部位特異的結合を行なうことを可視化し、さらに免疫沈殿の実験と合わせて、ホモロジーサーチでも検索できなかったような複数のCamR結合部位が $\lambda::cam$ ODNA上に存在することを巨視的に示した (Fig. 3-7)。これらは各々適用したアッセイ系に依存して見いだされた複合体群で、CamRリプレッサーの部位特異的な結合を反映したものである。

このように、ゲルシフトなど通常の実験手法では検出されない弱い部位特異的結合は、これまでの分子生物学では「非特異的結合」という範疇に分類されてきたものである。したがってDNAとタンパク質とのいわゆる「非特異的複合体」とは、(1) スライディングのような静的アッセイ法では捕捉できない動的複合体と(2) 静的ではあるが用いた研究手段では検出できなかった弱い(寿命の短い)部位特異的複合体との総称であると考えられる。

§ 結 語 §

以上、本博士論文では大腸菌RNAポリメラーゼホロ酵素および*Pseudomonas putida* CamRリプレッサーを対象にして、タンパク質のDNA上における分子動態の直視観測、リプレッサーのDNA結合に与えるインデューサーの役割の検討、さらに20年来未解決であったタンパク質のDNA上のスライディングの同定を行ない、タンパク質のDNAに対する動的相互作用の理解を試みた。また、そのための道具立ての開発・改良法にも付記的に触れた。

§ 第2章 §

誘電泳動法とavidin-biotin結合の応用により位置と配向性を制御してDNAをスライドガラス上に固定する新しい生物試料の調製が可能となった。蛍光基を抗原抗体反応を利用してタンパク質に導入することにより分子のDNA結合活性を破壊することなく可視化する方法を確立した。大腸菌RNAポリメラーゼホロ酵素のDNA上における分子動態を直接捕捉することに成功し、ホロ酵素のスライディングを証明した。

本章においては以下に示した論文を公表した。

- ・ N. Shimamoto, H. Kabata, O. Kurosawa, M. Washizu,
“Structural Tools for the Analysis of Protein-Nucleic Acid Complexes,
Advances in Life Science”, pp. 241-253, ed. by D. M. J. Lilley,
H. Heumann, and D. Suck, Birkhaeser Verlag, Basel (1992).
- ・ H. Kabata, O. Kurowa, I. Arai, M. Washizu, S. A. Margaron, R. E. Glass,
N. Shimamoto,
“Visualization of Single Molecule Dynamics of RNA Polymerase
Sliding along DNA”,
Science **262** (5139), 1561-1563 (1993).

§ 第3章 §

Pseudomonas putida CamRリプレッサーについてもスライディングの存在を見出し、これがDNA結合タンパク質の普遍的な性質である可能性を示唆した。インデューサーである*d*-camphorはCamRの特異的DNA結合のみを阻害し、スライディングに参与する相互作用には影響を与えないことを明らかにした。

本章ではその一部を論文として公表した。

- ・ 加畑博幸、嶋本伸雄、

- 「DNA-タンパク質複合体の動態を探る」、
Molecular Electronics and Bioelectronics, **5** (4), 251-262 (1994).
- ・ H. Aramaki, H. Kabata, N. Shimamoto, Y. Sagara, and T. Horiuchi,
 “Purification and Characterization of a *cam* Repressor (CamR) for
 the Cytochrome P450cam Hydroxylase Operon on the *Pseudomonas*
putida CAM Plasmid” ,
Journal of Bacteriology (1995) in press.

§ 第 4 章 §

以上の知見からDNA-タンパク質相互作用について考察し、スライディングとは非特異的DNA結合であること、そしていわゆる非特異的複合体とは、スライディングのような動的複合体と用いたアッセイ法では検出されなかった弱い部位特異的複合体との総称であると結論した。

本章ではその一部を公表した。

- ・ 加畑博幸、嶋本伸雄、
 「ナノバイオロジー、生体機構を直接目で見る技術」、
 臨床検査 **38** (12)、1322-1333 (1994).
- ・ 加畑博幸、嶋本伸雄、
 「DNA上におけるタンパク質分子のダイナミクス～非特異的DNA結合とスライディング」
 生物物理 **35**、(1994) 印刷中.

また、副次的につぎの表題の論文を公表した。

- ・ H. Kabata, A. Nomura, I. Arai, N. Shimamoto, S. Kunugi,
 “Effect of High Pressure on *Eco RI* Reaction” ,
Journal of Molecular Recognition, **7** (1), 1561-1563 (1993).

この研究成果は分子生物学と電気工学の技術的協調の所産である。DNAとタンパク質との相互作用を「目で見て」観測することにより従来のモデルよりも明確な情報と新しい概念を提示することができた。さらに転写複合体の移動のメカニズムやリプレッサーとポリメラーゼとの相互作用機構の解析、スライディングの生理的意義の究明など、研究テーマを展開中である。

第 1 章

- 1) P. H. von Hippel and O. G. Berg, *J. Biol. Chem.* **264**, 675-678 (1989).
- 2) D. A. Erie, G. Yang, H. C. Schultz, and C. Bustamante, *Science* **266**, 1562-1566 (1994).
- 3) H-M. Wu and D. M. Crothers, *Nature* **308**, 509-513 (1984).
- 4) W. A. Ree, R. W. Keller, J. P. Vesenka, G. Yang, and C. Bustamante, *Science* **260**, 1646-1649 (1993).
- 5) D. K. Hawley and W. R. McClure, *Nucleic Acids Res.* **11**, 2237-2255 (1983).
- 6) B. Lewin, "Genes" , 5th. Ed., Chap.14-15, Oxford Uinversity Press, Oxford (1994).
- 7) O. G. Berg, R. B. Winter, and P. H. von Hippel, *Biochemistry* **24**, 6929-6948 (1981).
- 8) A. D. Riggs, S. Bourgeois, and M. Cohn, *J. Mol. Biol.* **53**, 401-417 (1970).
- 9) J. H. Carra and R. F. Schleif, *EMBO J.* **12**, 35-44 (1993).
- 10) A. Hochschild and M. Ptashne, *Cell* **44**, 681-687 (1986).
- 11) L. Finzi and J. Gelles, *Science* **267**, 378-380 (1995).
- 12) W. E. Jack, B. J. Terry, and P. Modrich, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **79**, 4010-4014 (1982).
- 13) G. Nardone, J. George, and J. G. Chirikjian, *J. Biol. Chem.* **261**, 6160-6166 (1985).
- 14) B. J. Terry, W. E. Jack, and P. Modrich, *J. Biol. Chem.* **260**, 13130-13137 (1985).
- 15) A. Jeltsch, J. Alves, H. Wolfes, G. Maass, and A. Pingoud, *Biochemistry* **33**, 10215-10219 (1994).
- 16) R. B. Winter, O. G. Berg, and P. H. von Hippel, *Biochemistry* **20**, 6961-6977 (1981).
- 17) J. G. Kim, Y. Takeda, B. W. Matthews, and W. F. Anderson, *J. Mol. Biol.* **196** 149-158 (1987).
- 18) T. Ruusala and D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 4903-4907 (1992).
- 19) P. T. Stukenberg, P. S. Studwell-Vaughan, and M. O'Donnel, *J. Biol. Chem.* **266**, 11328-11334 (1991).
- 20) X-P. Kong, R. Onrust, M. O'Donnel, and J. Kuriyan, *Cell* **69**, 425-437 (1992).

- 21) B. N. Belintsev, S. K. Zavriev, and M. F. Shemyakin, *Nucleic Acids Res.* **8**, 1391-1404 (1980).
- 22) C. S. Park, Z. Hillel, and C-W. Wu, *J. Biol. Chem.* **257**, 6944-6949 (1982).
- 23) C. S. Park, F-Y. Wu, and C-W. Wu, *J. Biol. Chem.* **257**, 6950-6956 (1982).
- 24) M. Ricchetti, W. Metzger, and H. Heuman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 4610-4614 (1988).
- 25) P. Singer and C-W. Wu, *J. Biol. Chem.* **262**, 14178-14189 (1987).
- 26) H-J. Ehbrecht, A. Pongoud, C. Urbanke, G. Maass, and C. Gualerzi, *J. Biol. Chem.* **260**, 6160-6166 (1985).
- 27) J. Langowski, J. Alves, A. Pingoud, and G. Maas, *Nucleic Acid Res.* **11**, 501-513 (1983).
- 28) R. Fickert and B. Mueller-Hill, *J. Mol. Biol.* **226**, 59-68 (1992).
- 29) 加畑博幸、嶋本伸雄、臨床検査 **38**、1322-1333 (1994).
- 30) 加畑博幸、嶋本伸雄、*Molec. Elect. Bioelect.* **5**、251-262 (1994).
- 31) 徳永万喜洋、蛋白質核酸酵素 **39**、272-280 (1994).
- 32) 楠見明弘、蛋白質核酸酵素 **39**、176-189 (1994).
- 33) R. Yuan, D. L. Hamilton, and J. Burkhardt, *Cell* **20**, 237-244 (1980).
- 34) F. W. Studier and P. K. Bandyopadhyay, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 4677-4681 (1988).
- 35) 長沢治子、石浜明、「核酸の化学と分子生物学 (化学総説46)」、pp. 143-151、日本化学会編、学会出版センター、(1985).
- 36) H. Aramaki, Y. Sagara, K. Takeuchi, H. Koga, and T. Horiuchi, *Biochimie* **76**, 63-70 (1994).
- 37) H. Aramaki, Y. Sagara, M. Hosoi, and T. Horiuchi, *J. Bacteriol.* **175**, 7828-7833 (1993).

第 2 章

- 1) M. Ricchetti, W. Metzger, and H. Heuman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 4610-4614 (1988).
- 2) P. Singer and C-W. Wu, *J. Biol. Chem.* **262**, 14178-14189 (1987).
- 3) W. R. McClure, *Ann. Rev. Biochem.* **54**, 171-204 (1985).
- 4) M. Washizu and O. Kurosawa, *IEEE Trans. Ind. Appl.* **26**, 1165-1172 (1990).
- 5) R. F. Schleif and P. C. Wensik, "Practical Methods in Molecular Biology", Springer-Verlag, New York (1981).

- 6) J. Sambroock, E. F. Fritsh, and T. Maniatis, "Molecular Cloning" ,
2nd Ed., Vol. 3, Append., Cold Spring Harbor Laboratory Press,
New York (1989) .
- 7) J. Sambroock, E. F. Fritsh, and T. Maniatis, "Molecular Cloning" ,
2nd Ed., Vol. 1, Chap. 6, Cold Spring Harbor Laboratory Press,
New York (1989) .
- 8) J. H. Morissey, *Anal. Biochem.* **117**, 307-310 (1981).
- 9) J. E. Coligan, A. M. Kruisbeek, D. H. Marglies, E. M. Shevach, W. Strober,
"Current Protocol in Immunology" , pp. 2.0.3-2.8.10, Wiley, New York
(1992).
- 10) M. Washizu, O. Kurosawa, I. Arai, S. Suzuki, and N. Shimamoto,
"Applications of Electrostatic Stretch-and-Positioning of DNA" ,
Conf. Rec. IEEE/IAS '93 Ann. Meet., pp. 1629-1637 (1993).
- 11) N. Shimamoto, H. Kabata, O. Kurosawa, M. Washizu,
"Structural Tools for the Analysis of Protein-Nucleic Acid Complexes,
Advances in Life Science" , pp. 241-253, ed. by D. M. J. Lilley,
H. Heumann, and D. Suck, Birkhaeser Veerlag, Basel (1992).
- 12) M. Fujioka, T. Hirata, and N. Shimamoto, *Biochemistry* **30**, 1801-1807
(1991).
- 13) R. R. Burgess and J. J. Jendrisak, *Biochemistry* **21**, 4634-4638 (1975).
- 14) N. Gonzalez, J. Wiggs, and M. J. Chamberlin, *Archives Biochem. Biophys.*
182, 404-408 (1977).
- 15) K. Zalenskaya, J. Lees, C. N. Gujuluva, Y. K. Shin, M. Slutsky, and
A. Goldfarb, *Gene* **89**, 7-12 (1990).
- 16) K. Igarashi, N. Fujita, and A. Ishihama, *J. Mol. Biol.* **218**, 1-6 (1991).
- 17) M. D. Savage, G. Mattson, S. Desai, G. W. Nielander, S. Morgensen, and
E. J. Conklin, " Avidin-Biotin Chemistry: A Handbook" , PIERCE, Illinois
(1992).
- 18) 黒沢修、森昭功、鷺津正夫、嶋本伸雄、「DNA酵素と相互作用可能な静電配向DNA
Aの固定法」、静電気学会講演論文集、pp. 195-198、(1993).
- 19) H. Kabata, O. Kurowa, I. Arai, M. Washizu, S. A. Margaron, R. E. Glass,
N. Shimamoto, *Science* **262**, 1561-1563 (1993).
- 20) D. L. Wulff and M. Rosenberg, "LAMBDA" 2nd. Ed., pp.53-73,
ed. by R. W. Hendrix, J. W. Roberts, F. W. Stahl, and R. A. Weisberg,
Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1983).

第3章

- 1) H. Aramaki, Y. Sagara, M. Hosoi, and T. Horiuchi, *J. Bacteriol.* **175**, 7828-7833 (1993).
- 2) A. Wissmann, R. Baumeister, G. Mueller, B. Hech, V. Helbl, K. Pfeleiderer, and W. Hillen, *EMBO J.* **10**, 4145-4152 (1991).
- 3) M. Fujita, H. Aramaki, T. Horiuchi, and A. Amemura, *J. Bacteriol.* **175**, 6953-6958 (1993).
- 4) H. Aramaki, Y. Sagara, M. Hosoi, and T. Horiuchi, *J. Bacteriol.* **175**, 7828-7833 (1993).
- 5) O. G. Berg, R. B. Winter, and P. H. von Hippel, *Biochemistry* **24**, 6929-6948 (1981).
- 6) A. D. Riggs, S. Bourgeois, and M. Cohn, *J. Mol. Biol.* **53**, 401-417 (1970).
- 7) R. B. Winter, O. G. Berg, and P. H. von Hippel, *Biochemistry* **20**, 6961-6977 (1981).
- 8) T. Ruusala and D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 4903-4907 (1992).
- 9) J. G. Kim, Y. Takeda, B. W. Matthews, and W. F. Anderson, *J. Mol. Biol.* **196**, 149-158 (1987).
- 10) T. E. Haran, A. Joachimiak, and P. B. Sigler, *EMBO J.* **11**, 3021-3030 (1992).
- 11) S. J. Scharf and H. A. Erlich, "Current Protocol in Molecular Biology", pp. 2.0.1-3.17.5, ed. by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl, Wiley, New York (1987).
- 12) L. G. Davis, M. D. Digner, and J. F. Battey, "Methods in Molecular Biology", pp. 90-104, Elsevier, New York (1986).
- 13) C. E. Seidman and K. Struhl, "Current Protocol in Molecular Biology", pp. 1.7.1-1.15.6, ed. by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, and J. A. Smith, Wiley, New York (1987).
- 14) E. M. Southern, U. Maskos, and K. Elder, *Genomics* **13**, 1008-1017 (1992).
- 15) U. Maskos and E. M. Southern, *Nucleic Acid Res.* **20**, 1679-1684 (1992).
- 16) 角田光雄、「表面の改質 (化学総説44)」, pp. 99-108、日本化学会編、学会出版センター、(1985).
- 17) R. L. Kaas and J. L. Kardos, *Polym. Eng. Sci.* **11**, 11-18 (1971).
- 18) L. Boksanji, O. Liardon, and E. sz. Kobats, *Adv. Colloid Interface Sci.* **6**, 95-137 (1976).
- 19) S. H. Chang, K. M. Goodeing, and F. E. Regnier, *J. Chromatogr.* **120**, 321-333 (1971).

- 20) H. Aramaki, M. Fujita, Y. Sagara, A. Ameura, and T. Horiuchi,
FEMS Letters **123**, 49-54 (1994).
- 21) H. Aramaki, H. Kabata, N. Shimamoto, Y. Sagara, and T. Horiuchi,
J. Bacteriol. (1995) in press.
- 22) R. D. G. McKay, *J. Mol. Biol.* **145**, 471-488 (1981).
- 23) F. Sanger, A. R. Coulson, G. F. Hong, D. F. Hill, and G. B. Peterson,
J. Mol. Biol. **162**, 729-773 (1982).
- 24) K. Struhl, "Current Protocol in Molecular Biology" , pp. 12.0.3-12.0.5,
ed. by F. M. Ausubel, R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman,
J. A. Smith, and K. Struhl, Wiley, New York (1987).

第 4 章

- 1) P. H. von Hippel and O. G. Berg, *J. Biol. Chem.* **264**, 675-678 (1989).
- 2) P. Singer and C-W. Wu, *J. Biol. Chem.* **262**, 14178-14189 (1987).
- 3) M. Ricchetti, W. Metzger, and H. Heuman, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**,
4610-4614 (1988).
- 4) C. S. Park, Z. Hillel, and C-W. Wu, *J. Biol. Chem.* **257**, 6944-6949 (1982).
- 5) C. S. Park, F-Y. Wu, and C-W. Wu, *J. Biol. Chem.* **257**, 6950-6956 (1982).
- 6) H-J. Ehbrecht, A. Pongoud, C. Urbanke, G. Maass, and C. Gualerzi,
J. Biol. Chem. **260**, 6160-6166 (1985).
- 7) T. Ruusala and D. M. Crothers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**,
4903-4907 (1992).
- 8) R. B. Winter, O. G. Berg, and P. H. von Hippel, *Biochemistry* **20**,
6961-6977 (1981).
- 9) J. N. Israelchvili, "Intermolecular and Surface Forces with Applications
to Colloidal and Biological Systems" , ACADEMIC PRESS, London (1985).
- 10) D. Stinger, *Biopolymer* **31**, 169-176 (1991).
- 11) M. F. Toney, J. N. Howard, J. Richer, G. L. Borges, J. G. Gordon, I. R. Melroy,
D. G. Wiesler, D. Yee, and L. B. Sorensen, *Nature* **368**, 444-446 (1994).
- 12) P. U. Giacomoni, *Eur. J. Biochem.* **98**, 557-566 (1979).
- 13) A. Revzin and P. H. von Hippel, *Biochemistry* **16**, 4769-4776 (1978).
- 14) S-Y. Lin and A. D. Riggs, *J. Mol. Biol.* **72**, 671-690 (1972).
- 15) K. Matthews, *Biochim. Biophys. Acta* **359**, 334-340 (1974).
- 16) W. Hinrichs, C. Kisker, M. Duevel, A. Mueller, K. Tovar, W. Hillen, and
W. Saenger, *Science* **264**, 418-420 (1994).

§ 謝 辞 §

本研究を進めるに際して絶えずご指導下さいました副指導教官の石濱 明教授、試料提供のご協力を戴きました藤田信之助手、有益なご助言を下さいました東谷篤志助手をはじめ、ご尽力下さいました本学ならびに国立遺伝学研究所の多くの皆様に深くお礼申し上げます。

研究遂行にあたり、終始お力添え戴いた国立遺伝学研究所の永井宏樹助手に厚くお礼を申し上げます。また、常に討論に加わり鼓舞して下さいった構造研究室の諸氏に感謝いたします。

R N A ポリメラーゼの研究に対して、貴重な試料を供与して戴いた Nottingham 大学の Robert E. Glass 教授と Stephanie A. Margaron 博士に心からお礼申し上げます。

C a m R の研究に関してこころよく協力を承知して戴き、試料と機器分析のご援助を下さった第一薬科大学の荒牧弘範助手に厚く感謝の意を表します。

論文作製にあたり、精査と適切な指針を賜りました本学の桂 勲教授、堀内賢介教授、藤山秋佐夫助教授、そして東京工業大学の猪飼 篤教授に心よりお礼申し上げます。

本研究全般を通じて、高度な電気工学的手法のご指導を戴きました成蹊大学の鷺津正夫助教授に深く感謝申し上げます。同じく有益なご助言を与えて下さいました黒沢 修先生と同研究室の皆様にお礼申し上げます。

最後に、本学で研究を行なうにあたり 3 年間終始ご指導ご鞭撻を賜りました主任指導教官の嶋本伸雄助教授に心より感謝の意を表します。

総合研究大学院大学
生命科学研究科遺伝学専攻
分子遺伝学講座
加畑 博幸