

# DNA 結合蛋白質のスライディングの意義

杵渕 隆

総合研究大学院大学  
生命科学研究科  
遺伝学専攻

平成11年度  
(1999)

## 要旨

多くの DNA 結合蛋白質の機能は、長大な DNA 上の特異的部位と複合体を形成することで発揮される。この特異的複合体は、蛋白質が DNA の非特異的部位に結合し、DNA に沿った一次元拡散（スライディング）によって形成される。しかし、スライディングの生理的意味は、明らかではなかった。スライディングの存在は、すでに一分子ダイナミクスによって、*E.coli* RNA ポリメラーゼ及び *P.putida* の CamR に対して証明されている。この時の一分子観察は、DNA 結合蛋白質には、スライディングが特異的部位への結合と解離の両方に寄与しているものと（RNA ポリメラーゼ）、結合への寄与が解離よりも遙かに大きいもの（CamR）があることを示した。後者のタイプでは、非特異的部位が長くなれば、スライディングによって解離よりも結合が加速されるので、特異的部位に対する親和性が高くなる。この非特異的部位を長くしたときに、特異的部位に対する親和性が上昇する現象はアンテナ効果と名付けた。

本研究では、スライディングによるアンテナ効果の実証例として、大腸菌 TrpR の矛盾を解決することを試みた。トリプトファン合成の転写リプレッサーである TrpR は、特異性、つまり、特異的部位に対する親和性の強さに対する非特異的部位のその比が約 200 である事が示されている。TrpR が特異的部位に結合するためには、大腸菌内の非特異的部位の数  $10^6 \sim 10^7$  をこの比で割った数 10,000 が細胞内のコピー数として必要と考えられる。しかし、細胞内の TrpR のコピー数は、約 100 と計算され、TrpR の特異的結合に必要なコピー数が、100 倍も不足することになる。

TrpR の特異的結合の強さを決定する実験では、アンテナ効果が制限される 42bp の DNA 断片が用いられていた。従って、*in vivo* の特異結合活性の強さを反映していない可能性がある。もし、TrpR が 100 倍以上のアンテナ効果を持つならば、実際の特異的結合力は大きくなるかもしれない。これを検証するため、*trpO* を含む異なる長さの DNA に対する TrpR の結合強度を OH ラジカルフットプリンティング法を用いて測定した。その結果、18bp から 5,200bp で約  $10^4$  倍のアンテナ効果があることが示された。従っ

て、特異性は  $10^5$  以上になり、100 程度のコピー数でも十分であることが明らかになった。

アンテナ効果は、スライディング以外にも DNA のループングによっても引き起こされる可能性がある。次に、スライディングは阻害するが、ループングは妨げない基質、biotin 化した非特異的 DNA を *trpO* を含む DNA 断片に avidin を用いて連結したものをを用いて TrpR のアンテナ効果を測定した。その結果、この DNA に対しては、TrpR のアンテナ効果はないことが示された。従って、TrpR のアンテナ効果はスライディングによって引き起こされていることが証明された。

TrpR は、スライディングによるアンテナ効果を利用して特異的部位に対する親和性を高め、必要なコピー数を節約していると考えられる。これが、本研究で明らかになったスライディングの生理的意義である。このような節約は、TrpR のような常時必要とされない蛋白質には、最適であると考えられ、今まで知られていない "action at distance" な調節機構となっている。

## Summary

### Biological significance of sliding motion of DNA binding proteins

DNA binding proteins function by binding to a limited number of specific sites on DNA buried in numerous nonspecific sites. Such specific complexes can be formed from nonspecific complexes via sliding, one-dimensional diffusion along DNA. The existence of sliding motions have been proved by direct visualization of single molecules of *E.coli* RNA polymerase and *P. putida* CamR. Biological significance of sliding, however, is not clear yet. The single-molecule experiments also showed that these two proteins slide in a similar manner, but RNA polymerase mostly slides upon dissociation from its specific sites, while CamR seems to dissociate from its specific sites directly into bulk without any extensive sliding. For a protein like CamR, sliding accelerates association into a specific site more than dissociation from it, resulting in an increased affinity for the specific site on a longer DNA. This positive length effect is here named antenna effect.

As a proof of the existence of antenna effect due to sliding, I here solved a long-standing contradiction of specificity and copy number of *E. coli* TrpR, which is the repressor of *trp* operon. The specificity of TrpR, the ratio of affinities for specific and nonspecific sites, is about 200, so that a copy number of  $10^4$  is required per genome to occupy its 5 specific sites in competition with  $10^6$  non-specific sites. However, the actual copy number of TrpR is only 200-300/cell, seemingly contradicting to the fact that TrpR is the repressor.

The specificity of TrpR has been determined by a short DNA fragment which may have little antenna effect, suggesting an underestimation of its specificity. If TrpR has 100-fold antenna effect due to sliding, the contradiction of TrpR will be solved. To determine the

existence and the amplitude of the antenna effect of TrpR, the affinities of TrpR for the same *trpO* harbored on DNAs of various lengths are determined by hydroxyl radical footprinting. The affinity was enhanced by  $10^4$  times when the length was increased from 18bp to 5,200bp. The observed amplitude is large enough to increase the specificity of trpR to a level in consistent with the small copy number.

Antenna effect is also exerted by a second protein-DNA interaction within a specific complex as well as sliding. To determine which mechanism caused, 36bp*trpO* fragment was connected to 232bp non-specific DNA by means of avidin-biotin binding. In this way of connection, which blocks sliding but not the second interaction, the antenna effect (otherwise 9 fold) disappeared proving that antenna effect of TrpR is caused by sliding.

The obtained results demonstrate that the biological significance of sliding in this case is saving the copy number of a DNA binding protein by means of antenna effect. This saving mechanism will be beneficial for proteins like TrpR which is not always required. The newly found antenna effect due to sliding is "an action at a distance" and could be implicated in many gene regulatory systems.

# 目次

略語一覧	4
1. 緒言	5
2. 実験	
2-1 オリゴ DNA の合成と精製	16
2-2 プライマーと 18bp の長さを持つ DNA 断片の $^{32}\text{P}$ による標識	16
2-3 長さの異なる <i>trpO</i> を含む DNA 断片の調製	16
2-4 Avidin-DNA complex の作成	19
2-5 TrpR 蛋白質の精製	20
2-6 TrpR 蛋白質の定量	21
2-7 OH ラジカルフットプリンティング	21
2-8 プライマーエクステンションアッセイ	22
2-9 TrpR の DNA からの解離速度定数の算出	23
2-10 DNA 結合強度の算出	23
3. 結果	
3-1 OH ラジカルフットプリンティング法による <i>trpO</i> を含む異なる長さの DNA に対する TrpR の親和性の変化	26
3-2 TrpR の DNA からの解離速度定数	36
3-3 Avidin-DNA complex に対する TrpR の親和性	40

#### 4. 考察

4-1 スライディングを利用した新しい遺伝子調節機構 ----- 44

4-2 アンテナ効果の化学的考察 ----- 49

引用文献 ----- 53

謝辞 ----- 57

## 略語一覽

A	--- adenosine
ATP	--- adenosine 5'-triphosphate
bp	--- base pair
BSA	--- bovine serum albumin
C	--- cytidine
DNA	--- deoxyribonucleic acid
DNase	--- deoxyribonuclease
dNTP	--- deoxynucleoside 5'-triphosphate
DTT	--- 1,4-dithiothreitol (threo-1,4-dimercapto-2,3-butanediol)
EDTA	--- ethylenediamine tetraacetic acid
G	--- guanosine
HPLC	--- high-performance liquid chromatography
IHF	--- integration host factor
$K_{-1}$	--- dissociation rate constant
$K_{\text{nonspecific}}$	--- dissociation constant for nonspecific site
$K_d$	--- dissociation constant
$K_{\text{specific}}$	--- dissociation constant for specific site
NMR	--- nuclear magnetic resonance
dNTP	--- deoxynucleoside 5'-triphosphate
OD	--- optical density
PCR	--- polymerase chain reaction
pH	--- hydrogen ion concentration index
RNA	--- ribonucleic acid
T	--- thymidine
Tris	--- tris (hydroxymethyl) aminomethane
<i>trp O</i>	--- <i>trp</i> operator



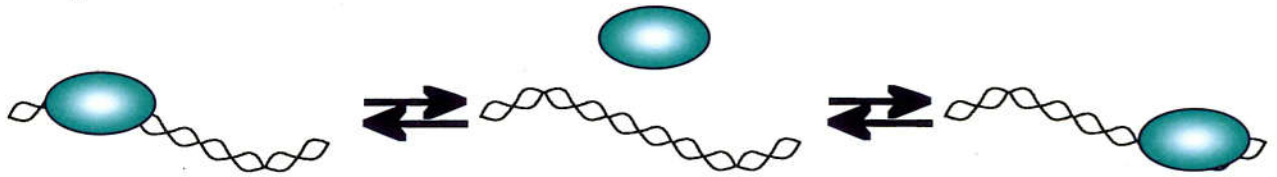
## 1. 緒言

## 1. 緒言

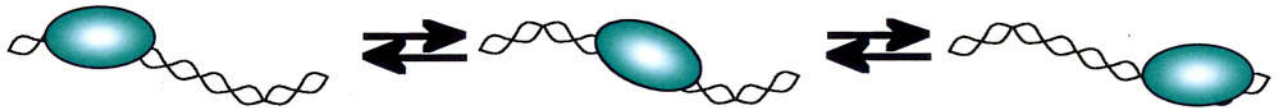
DNA 結合蛋白質は、DNA 上の特定の部位に結合して特異的複合体を形成し、遺伝子発現の調節に関わっている。例えば、RNA ポリメラーゼは、DNA 上のプロモーターと複合体を形成して転写を行い、リプレッサー蛋白質は、プロモーター付近の特異的部位（オペレーター）に結合し遺伝子の発現を抑制する。これは、転写制御の基本的な概念である。近年、蛋白質が DNA 上の特異的部位に結合している様子は、X 線結晶構造解析や NMR を用いて精力的に解明されつつある。しかし、特異的結合が遂行される道筋とは、どのようなものであろうか。DNA 上の特異的部位に蛋白質が結合し複合体が形成するのは、単にこれらの偶然な衝突によるものであろうか。本研究では、蛋白質がどのようなメカニズムで特異的部位にたどり着くかを解明する目的で行われた。

蛋白質が特異的複合体の形成に至る経路には、非特異的複合体が中間状態として存在し、三種のモデル<sup>1,2</sup>が提案されている (Fig.1)。第一は、結合と解離の繰り返して自明の機構である。第二は、スライディングモデルで DNA 上を沿って、一次的に移動し、特異的部位に蛋白質が到達する。第三は、インターセグメントトランスファーと呼ばれるやや複雑な機構<sup>3-6</sup>で、蛋白質 1 分子上に二つ以上の結合部位があるときに、DNA のループを持つ中間体を経て移動するもので、一次元をやや越えたものである。

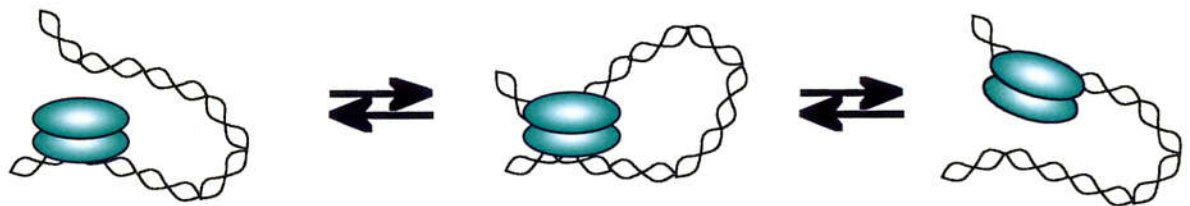
## Repeated dissociation and association



## Sliding



## Intersegment transfer



**Figure 1** One-dimensional diffusion mechanisms. Mechanisms of transfer within the same DNA molecule are here classified into three models. The Intersegment transfer requires two DNA binding sites like LacI tetramer<sup>3~5</sup> and steroid receptor dimer<sup>6</sup>. The green ovals are protein molecules and DNAs are expressed as helices.

1970 年に、Riggs らは、LacI リプレッサーが 48kbp の長い DNA の中にあるオペレーターに、オペレーターの大きさから考えられる最も早い衝突速度を 100 倍近く上回る速度で結合することを見い出した<sup>7</sup>。その後、Richter らは、蛋白質はまず非特異的部位に結合した後、その DNA 分子上を一次元的に移動して特異的部位に到達するという一次元拡散モデルを提唱した<sup>8</sup>。Berg らは、さらに考察を重ね、拡散理論を用いた一般的な理論を展開し、スライディングの存在を提唱した<sup>9</sup>。彼らは、同時に理論値と実験結果を比較し、この良い一致から、一次元拡散の存在、つまりスライディングモデルを確認した。しかし、このときの DNA-LacI 相互作用を解析した方法は、ニトロセルロースフィルターを利用したもので、この方法は、誤った結論を導き出すことが明らかにされた<sup>3</sup>。さらに、このときに使われた DNA には、2 つのオペレーター部位があることが後にわかり<sup>3</sup>、スライディングの理論に訂正が必要になった。しかし、実際には修正はたいしたものではなく、結論自体にはそれほど大きな影響を与えるものではなかったが、スライディングの研究は、この軽微な難点と難解な理論式が災いして、不幸な運命へと導かれた。

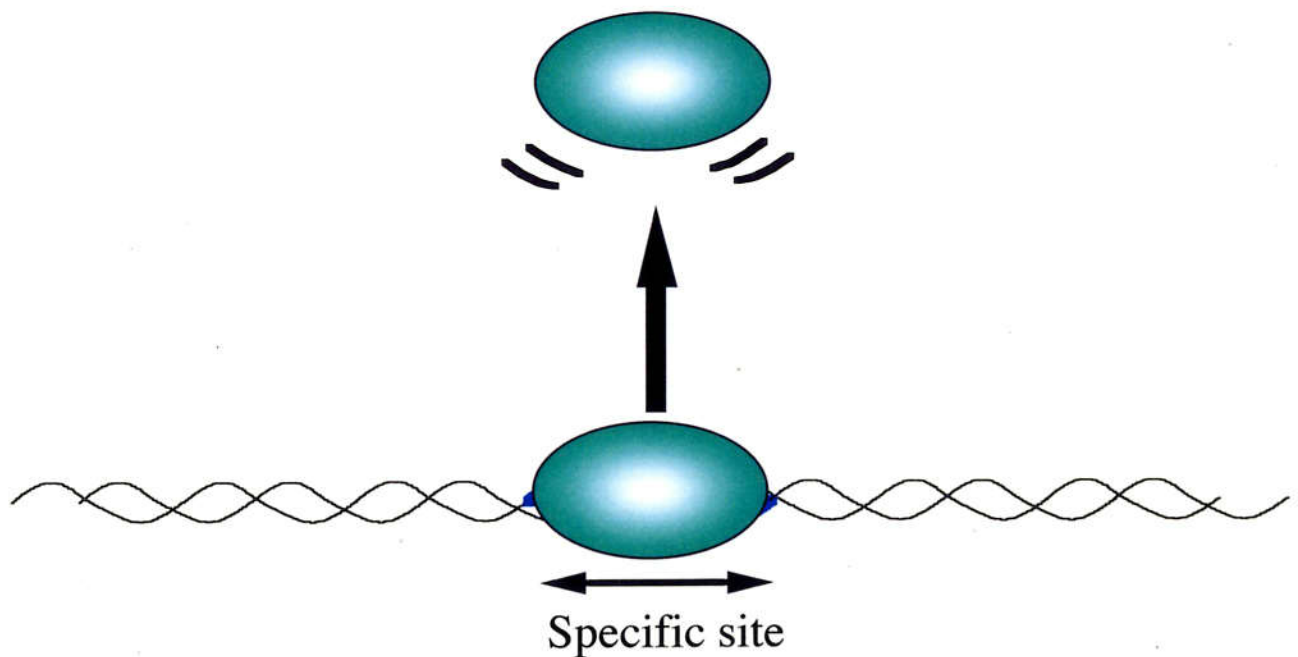
その後、制限酵素<sup>10~18</sup>、リプレッサー<sup>3,4,19,20</sup>、大腸菌 RNA ポリメラーゼ<sup>21,22</sup>、DNA の修復酵素<sup>23~29</sup>についてスライディングのキネティックな証拠が得られた。しかし、これらの証拠が得られても、スライディングモデルは、多くの分子生物学者の興味を引かなかった。その理由は、スライディングの証明の論理の難解さに加え、DNA

を修飾する酵素のプロセッシビリティ以外のスライディングの生理的意義が明確でなかったからである。

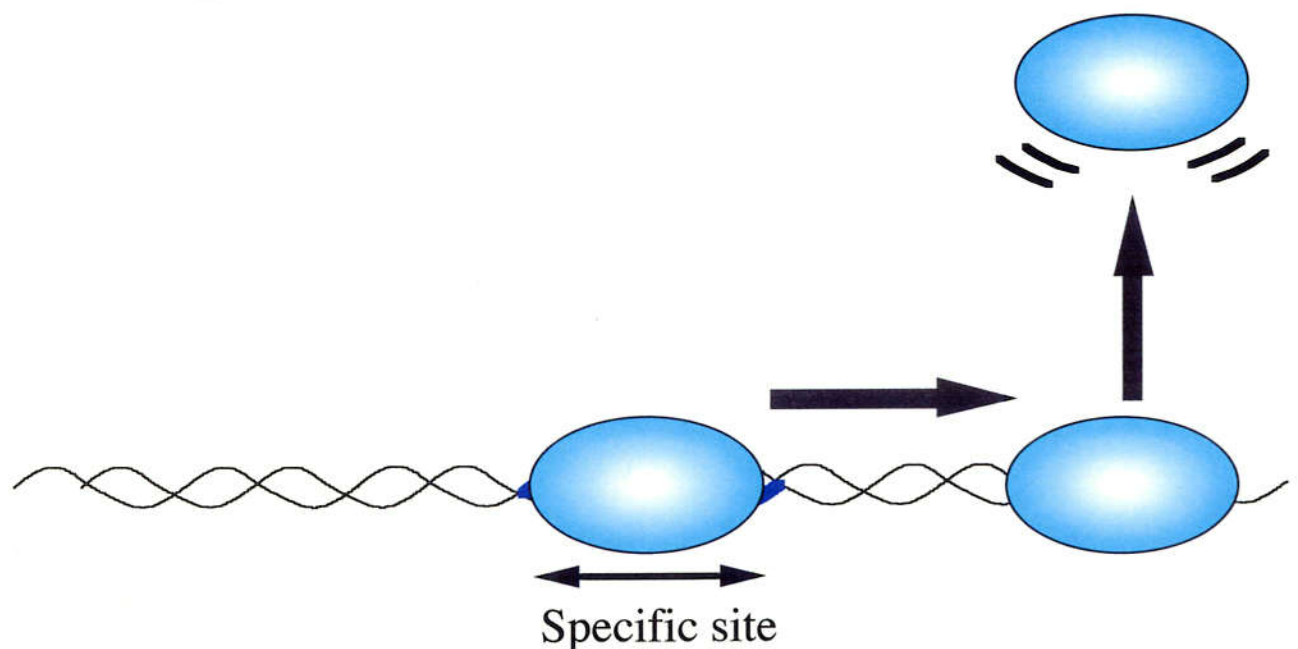
1980年代後半から、生体高分子の動きを直接観察する手法が発展した。1分子の動きを直接観察できるこの手法は1分子ダイナミクス<sup>1</sup>と呼ばれている。この手法を用いて、大腸菌 RNA ポリメラーゼ<sup>30</sup>と *P.putida* CamR リプレッサー蛋白質<sup>31</sup>が DNA 上をスライディングすることが証明された。

RNA ポリメラーゼは、5つのサブユニットからなる分子量 50 万の巨大な蛋白質で、らせん 5 回転分以上の DNA と結合する。一方、CamR リプレッサーは、2つの同一サブユニットからなる分子量 5 万の小さな蛋白質で、らせん 2 回転分の DNA と相互作用する小さくて比較的単純な結合部位を持つ。この大きく異なる 2つの蛋白質に対する加畑らの 1 分子アッセイは、特異的部位に結合するまでのスライディング運動には、差が無いことを示した。しかし、特異的部位から解離する経路には大きな差があることがわかった。Fig.2 にこの時観測された RNA ポリメラーゼと CamR の特異的部位からの解離する経路の違いを示す。RNA ポリメラーゼは、特異的部位からスライディングして非特異的部位から解離するが、CamR は、ほとんどが特異的部位から直接溶液中に解離する。このことは、RNA ポリメラーゼは結合時も解離時も非特異的部位を同程度に利用するが、CamR は、結合時にしか利用していないことを示している。つまり、CamR は、特異的部位への結合では、スライディ

## CamR repressor: direct dissociation



## RNA polymerase: two-step dissociation



**Figure 2** Different major pathways of dissociation from specific sites were observed for two proteins. Ovals are protein molecules and DNAs are expressed as helices. The upper mechanism exerts antenna effects.

ングを利用して結合速度を速めるが、解離時はスライディングを使わない。結果として、平衡状態における特異的部位に対する結合の親和性を高めている。この現象は、加畑らによって、非特異的部位の異なる長さの DNA に対する CamR の特異的結合の強さをゲルシフトアッセイ法を使って調べ、確認された<sup>31</sup>。

我々は、非特異的部位を長くした時に、特異的部位に対する親和性が上昇する現象をアンテナ効果と名付けた<sup>31</sup>。生体内では、DNA に対する結合は他の酵素反応に比べると速いので、DNA に対する結合速度が律速段階になることは、それほど多くない。むしろ蛋白質の DNA に対する親和性が反応に関わる。それならば、スライディングは、蛋白質の親和性を変化させられるので、この機構を利用した遺伝子発現の調節機構が存在するはずである。

過去の未解決の問題の中にアンテナ効果によって説明できるものがある。それは、大腸菌 TrpR の問題である。大腸菌 TrpR リプレッサーは、108 アミノ酸残基からなり、安定なホモダイマーを形成する蛋白質である<sup>32</sup>。TrpR のオペレーターに対する特異的結合は、リガンドである L-tryptophan が TrpR に結合することによって誘起される。TrpR - *trpODNA* 複合体の結晶構造解析から、L-tryptophan がヘリックス-ターン-ヘリックスの近傍に結合し、構造を変化させて、特異的部位を認識するメカニズムが示されている<sup>33</sup>。TrpR が制御するオペレーターは、*trpEDCBA*, *aroH*, *mtt*, *trpR* である<sup>33</sup>。各オペレーターに TrpR が結合することの生理的意義は、細胞内にお

ける tryptophan の濃度の上昇に伴い, tryptophan を合成する一連の酵素のオペロンを抑制することである. TrpR が特異的に結合するコンセンサスな DNA の配列は, 5'-GNACTNNNNNNNNAGTNC-3' である<sup>33</sup>. TrpR の特異的部位に対する親和性と非特異的部位に対するその比は, 約 200 である事が示されている<sup>34,35</sup> (Table1). 多くの DNA 結合蛋白質に対して, この比は, 通常  $10^5$  程度である. その理由は, これらの蛋白質が, 多くの非特異的部位に埋もれた特異的部位に, 高い特異性で結合するためである. 結合と解離の平衡関係から, 大腸菌の中の非特異的部位の数  $10^6 \sim 10^7$  をこの比で割った数  $N$  が細胞内のコピー数として必要と考えられる. 例えば, 大腸菌の IHF では,  $N$  の値は約 10,000 と計算され, 実際に, IHF のコピー数は 1 万であり, この関係を満たしている. この数を減少させると, 大腸菌 IHF プロモーターの変異株では, 増殖速度に影響が現れることが示されている<sup>36</sup>. 従って, 蛋白質の数が細胞内では, 実際に厳密に制御されている事がわかる. 一方, 細胞内の TrpR のコピー数は, 約 100 と測定<sup>37</sup>され, 上記の計算と矛盾する. では, TrpR はどのようなメカニズムで特異的部位にたどり着いているのであろうか. 本研究は, この TrpR のコピー数と結合の親和性の関係の矛盾を解明する目的で行われた.

TrpR の親和性は, 40bp 程度の短い DNA 断片を用いて, ゲルシフトアッセイ法により決定された<sup>34</sup>. もし TrpR がアンテナ効果により親和性を強めているならば, このような短い DNA ではアンテナ効果が限られてしまい, 弱い親和性が観測された



**Table 1** Specificity of TrpR contradicts with its copy number

	$\frac{K_{\text{nonspecific}}}{K_{\text{specific}}}$	$\frac{\text{copy}}{\text{cell}}$	number of nonspecific sites	antenna effect
TrpR	$200^{\text{ref.32}}$	$200^{\text{ref.35}}$	$10^6 \sim 10^7$	?
IHF	$500^{\text{ref.34}}$	$10,000^{\text{ref.34}}$	$10^6 \sim 10^7$	no

**10,000** molecules are required *in vivo*

可能性がある。これを検証するため、*trpO*を中心に持ち、非特異的部位の異なる長さを持ったDNAを用いて、それに対するTrpRの親和性を測定した。その結果、特異的部位に対するTrpRの親和性は、非特異的部位が長い程強くなることがわかり、TrpRのアンテナ効果が証明された。得られた知見にもとづき、スライディングの生物学的意義について考察する。

## 2. 実験

- 2-1 オリゴ DNA の合成と精製
- 2-2 プライマーと 18bp の長さを持つ DNA 断片の  $^{32}\text{P}$  による標識
- 2-3 長さの異なる *trpO* を含む DNA 断片の調製
- 2-4 Avidin-DNA complex の作成
- 2-5 TrpR 蛋白質の精製
- 2-6 TrpR 蛋白質の定量
- 2-7 OH ラジカルフットプリンティング
- 2-8 プライマーエクステンションアッセイ
- 2-9 TrpR の DNA からの解離速度定数の算出
- 2-10 DNA 結合強度の算出

## 2. 実験

### 2-1 オリゴ DNA の合成と精製

実験に使用したオリゴ DNA の配列を Table 2 に示す。オリゴ DNA は、日清紡に依頼して合成した。精製グレードは、逆相カートリッジまたは HPLC 精製のものを用いた。

### 2-2 プライマーと 18bp の長さを持つ DNA 断片の $^{32}\text{P}$ による標識

一本鎖 DNA の 5'末端は、反応溶液 30  $\mu\text{l}$  中、2.5  $\mu\text{M}$  一本鎖 DNA, 50 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM DTT, 2.5  $\mu\text{M}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP (6000 Ci/mmol)(ICN) の条件下で 4 U の T-4 polynucleotide kinase (TAKARA) を加えて、37 $^{\circ}\text{C}$ 、1 時間の反応を行って標識した。反応後、30 $\mu\text{l}$  のフェノール・クロロホルム溶液を加えて抽出した後、未反応の [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP を除くため、スピнкаラムにロードした。スピнкаラムは、Sephadex G-50 (Pharmacia) を用いた。1 分間 3000 rpm でプレ遠心した後、サンプルをロードして 3000 rpm で 2 分間遠心を行った。

### 2-3 長さの異なる *trpO* を含む DNA 断片の調製

18bp の長さを持つ DNA の配列を Tabel 2 に示す。この DNA 断片の 5' 末端を 2-2 で示した方法で標識した後、アニーリング反応を行った。アニーリング反応は、

**Table 2** DNA sequence of primer used in this study

Primer	DNA sequence
looped 18bp	5'-gtactcttttagcgagtac <sup>C</sup> c 3'-catgagasatcgctcatg <sub>c</sub> <sup>C</sup>
36bp 5'-primer	5'-gatgctatcgctactcttttag-3'
36bp 3'-primer	5'-ttagcgagtacaaccggggg-3'
50bp 5'-primer	5'-gtttatgatatgctatcgta-3'
50bp 3'-primer	5'-agtacaaccgggggaggcat-3'
200bp 5'-primer	5'-ctaccgctatttcatgggggataaa-3'
200bp 3'-primer	5'-cgctgttctgccatcgctgctgaat-3'
232bp 5'-primer	5'-gcgggggaagcaaaatgcct-3'
232bp 3'-primer	5'-aggcatttttgcttccccccgc-3'
500bp 5'-primer	5'-gtcctcagcagcttataacgccgga-3'
500bp 3'-primer	5'-gcgccgcgcaacagctcttcgacaa-3'
1000bp 5'-primer	5'-gaagaagctcgaccgtcttggccgc-3'
1000bp 3'-primer	5'-gtaatttcaatatgtttggtaggcatg-3'

30  $\mu$ l 反応溶液中, 2.5  $\mu$ M 18bp, 1M NaCl の条件で 100  $^{\circ}$ C, 5 分間インキュベーションした後, ゆっくりと温度を下げて行った. 反応後, サンプルを 12 %ポリアクリルアミドゲルにロードして電気泳動を行った. 泳動後, ゲルを 0.5  $\mu$ g/ml エチジウムブロマイド溶液で染色した後, 18bp のバンドを切り出した. ゲル断片をテフロンホモジナイザーで粉碎した後, 1 M NaCl TE buffer (10mM Tris-HCl(pH8.0)) 中で溶出した. 溶出後の溶液を Microcon 10 (AMICON) を用いて TE buffer に置換して 18bp の長さを持つ DNA 断片を精製した.

36bp-1,000bp の長さを持つ DNA 断片は, PCR 法<sup>38</sup>により作製した. 鋳型 DNA としては, 大腸菌ゲノム上の *trpR* オペレーターを持つプラスミド pRG16 (Princeton 大学の Jannette Carey 博士より供与) を用いた. 50bp, 200bp の DNA 断片を作製する際に用いた 5'-primer には, 2-2 で示した方法で標識したものを, 500bp, 1,000bp の DNA 断片を作成する際に用いた 5'-primer には, 未標識のオリゴ DNA を用いた.

Avidin-DNA complex を作成に用いた 36bp の 3'-primer 及び 36bp の 3'側に avidin を介して連結させる 232bp の DNA 断片の 5'-primer は, ビオチン化されたものを用いた.

5'-primer には, pRG16 上の 各長さの 5' 末端に相当する配列を持つ 20-26mer のオリゴ DNA を, 3'-Primer には各長さの 3' 末端に相当する配列を持つ 20-26mer のオリゴ DNA を用いた. PCR は Taq DNA polymerase buffer (10 mM Tris-HCl (pH9.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % TritonX-100), 0.5  $\mu$ M 5'-Primer, 0.5  $\mu$ M 3'-primer, 10 ng

template DNA, 200 mM dNTP, 1U *Taq* DNA polymerase (Boehringer Mannheim社) 中で反応を行い, 94 °C (0.5min) → 55 °C (0.5min) → 72 °C (1min) の cycle を 20 回行った。反応後, DNA 断片は, PCR prep (Promega) によって精製された。

5,200bp の長さを持つ DNA 断片は, pRG16 を *Nsp I* で切断して調製した。反応溶液 40 µl 中, 50 nM pRG16, 10 mM Tris-HCl (pH8.5), 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mM DTT, 100 mM KCl, 0.01 % BSA, 0.01 % Triton X-100 の条件下で 4 U の *Nsp I* を加えて 37 °C, 1 時間の反応を行い, pRG16 を切断した。反応後, 40 µl のフェノール・クロロホルムを加えて抽出した後, 4 µl の 3 M Sodium Acetate, 100µl のエタノールを加えてエタノール沈殿を行い, リニアーになった 5,200bp を得た。

#### 2 - 4 Avidin-DNA complex の作成

30 pmol の 36bp に 300 pmol の avidin (Vector Lab. Inc.) を加えて, 4°C, 100 µl TE buffer 中で一晩放置して 36bp のビオチン化された DNA 断片と avidin を結合させた。反応後, 12 % ポリアクリルアミドゲルにロードして電気泳動を行った。泳動後, ゲルを 0.5 µg/ml エチジウムブロマイド溶液で染色した後, complex のバンドを切り出した。ゲル断片をテフロンホモジナイザーで粉碎した後, 500 µl の 1 M NaCl TE buffer 中で complex を溶出した。溶出液を Microcon 10 (AMICON) を用いて TE buffer に置換して 36bp-avidin complex を精製した。この complex に 30 pmol の 232bp を加

えて、4℃、50 µl TE buffer 中で一晩放置して両者を結合させた。反応後、サンプルを 12 % ポリアクリルアミドゲルにロードして電気泳動を行い、36bp-avidin complex の精製と同じ条件でゲルからの溶出、buffer 置換を行って 36bp-avidin-232bp complex を精製した。

## 2-5 TrpR 蛋白質の精製

TrpR 蛋白質は、Paluh らの方法<sup>32</sup>に準じて精製された。TrpR の遺伝子が組み込まれているプラスミド pJPR2 を導入した *E.coli* CY15071 株を 37℃、200 µg/ml ampicillin, 0.2 % glucose, 0.1 % acid casein hydrolysate, 0.1 % yeast extract を含む minimal media 培地 1 L で cell density が  $4 \times 10^8$  cells/ml になるまで培養し、IPTG を最終濃度 1 mM になるように加えて、TrpR の大量発現の誘導を行った。その後、一晩培養し、遠心分離を行い、湿菌体 4-5 g を得た。菌体 4-5 g を 225 ml の 0.1 M Tris-HCl (pH7.6) に懸濁し、ソニケーターで細胞壁の破壊を行った。この細胞破碎液の遠心分離を行った後、上澄みに 45 % 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて、氷中で 30 分以上攪拌した後、遠心分離を行った。遠心分離後、上澄みを分離し、これに、75 % 飽和になるように硫酸アンモニウムを加えた後、遠心分離をした。得られた沈殿を P-11 buffer (10 mM NaPi (pH7.6), 0.1 mM EDTA, 0.1 M NaCl) に溶解し、2L の P-11 buffer に対して透析を行った。P-11 buffer で平衡化した P-11 (whatman) カ



ラム (1.4×20 cm) に、透析後の内液を負荷し、各 80 ml の 0.15 M NaCl P-11 buffer と 0.75 M NaCl P-11 buffer を用いて直線的な濃度勾配をかけた。溶出した分画を SDS-PAGE で確認し、98% 以上の純度で精製された TrpR 蛋白質を得た。

## 2-6 TrpR 蛋白質の定量

TrpR 蛋白質は、2-5 に示した方法で精製され、Princeton 大学の Jannette Carey 博士より供与された。TrpR 蛋白質は、硫酸アンモニウムによって塩析されて沈殿になっていたのを、これを 500  $\mu$ l の 10 mM NaPi (pH6.5), 25 mM NaCl buffer に溶解して透析を行った。透析は、1L の 10 mM NaPi(pH6.5), 25 mM NaCl buffer に対して 2 回行った。TrpR 蛋白質は、TrpR のモル吸光計数 ( $OD_{280}=1.2\text{mg/ml}$ )<sup>39</sup> を用いて定量した。

## 2-7 OH ラジカルフットプリンティング

TrpR binding buffer (10 mM NaPi (pH6.5), 0.25 mM L-tryptophan, 25 mM NaCl) に必要量の DNA と TrpR を加えて全量を 70  $\mu$ l とした後、25  $^{\circ}$ C で 1 時間放置した。2.5  $\mu$ M [Fe(EDTA)], 0.25 mM Sodium Ascorbate, 0.015 %  $\text{H}_2\text{O}_2$  になるように各試薬を 5  $\mu$ l 加えて 25 $^{\circ}$ C で 3 分間反応させた後、50 % glycerol を 56  $\mu$ l 加えて反応を停止させた。141  $\mu$ l のフェノール・クロロホルムを加えて抽出した後、14  $\mu$ l の 3M Sodium Acetate, 423  $\mu$ l のエタノールを加えてエタノール沈殿を行い、500bp, 1,000bp, 5,200bp の

DNA 断片の場合には、プライマーエクステンションアッセイを行った。18bp, 50bp, 200bp の DNA 断片は、loading buffer (10 mM EDTA, 80 % formamide, 0.025 % xylene cyanol, 0.025 % bromophenol blue) に溶解した後、18bp は、20 % 変性ポリアクリルアミドゲル、50bp は、10% 変性ポリアクリルアミドゲル、200bp は、6 % 変性ポリアクリルアミドゲル中で電気泳動を行った。泳動後、ゲルを乾燥させ、イメージングプレート（富士フィルム）に露光させて、BASS 2000（富士フィルム）を用いてオートラジオグラムを得た。

## 2-8 プライマーエクステンションアッセイ

OH ラジカル反応後の 500bp, 1,000bp, 5,200bp を 40  $\mu$ l の Taq DNA polymerase buffer (10 mM Tris-HCl (pH9.4), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 % TritonX-100) に溶解した。200bp を PCR で作成する時に使用した 3'-primer を 1  $\mu$ M になるように加え、200 mM dNTP, 1U Taq DNA polymerase (Boehringer Mannheim社) の条件下で、94  $^{\circ}$ C (0.5min)  $\rightarrow$  55  $^{\circ}$ C (0.5min)  $\rightarrow$  72  $^{\circ}$ C (1min) の cycle を 20 回行った。反応後、40  $\mu$ l のフェノール・クロロホルムを加えて抽出し、4  $\mu$ l の 3 M Sodium Acetate, 100  $\mu$ l のエタノールを加えてエタノール沈殿を行った後、loading buffer (10 mM EDTA, 80 % formamide, 0.025 % xylene cyanol, 0.025 % bromophenol blue) に溶解した。このサンプルを 6 % 変性ポリアクリルアミドゲルにロードして電気泳動を行った。泳動後、

2-6と同様にオートラジオグラフィーを行った。

#### 2-9 TrpR の DNA からの解離速度定数の算出

TrpR binding buffer に  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$  ATP で標識した 18bp または 200bp をそれぞれ 40 nM, 5 nM になるよう加え、18bp の場合は 10  $\mu\text{M}$ , 200bp の場合は 200 nM になるように TrpR を加えて全量を 0.5  $\mu\text{l}$  とした後、25  $^{\circ}\text{C}$  で一時間放置した。この complex に 30 nM の 5,200bp を 1  $\mu\text{l}$  加えて、4-120 秒間放置した後、12% ポリアクリルアミドゲルにロードした。電気泳動は、running buffer (10 mM NaPi(pH6.5), 100  $\mu\text{M}$  L-Tryptophan) を用いて、25  $^{\circ}\text{C}$ , 200 V (スラブ幅 20 cm) の条件で行った。泳動後、2-6と同様にオートラジオグラフィーを行った。

解離速度定数  $K_{-1}$  は、BASS2000 でフリーの DNA のバンドを定量して、(1) 式にあてはめて算出した。

$$A=A_0 e^{-k_{-1}t} \text{-----(1)}$$

Sigma Plot software (Jandel) を使い、求めた定量値を最小二乗法にフィットさせて  $K_{-1}$  を算出した。

#### 2-10 DNA 結合強度の算出

DNA 結合強度  $K_d$  は、BASS2000 で検出したハイパーセンシティブなバンドを定

量して，(2) 式にあてはめて算出した．

$$F=I*[TrpR]/([TrpR]+Kd) \text{ -----}(2)$$

I: ハイパーセンシティブなバンドの定量値

Sigma Plot software(Jandel) を使い，求めた定量値を最小二乗法にフィットさせて  
Kd を算出した．

## 3. 結果

### 3-1 OH ラジカルフットプリンティング法による *trpO*

を含む異なる長さの DNA に対する TrpR の親和性の変化

### 3-2 TrpR の DNA からの解離速度定数

### 3-3 Avidin-DNA complex に対する TrpR の親和性

### 3. 結果

#### 3-1 OH ラジカルフットプリンティング法による *trpO* を含む異なる長さの DNA に対する TrpR の親和性の変化

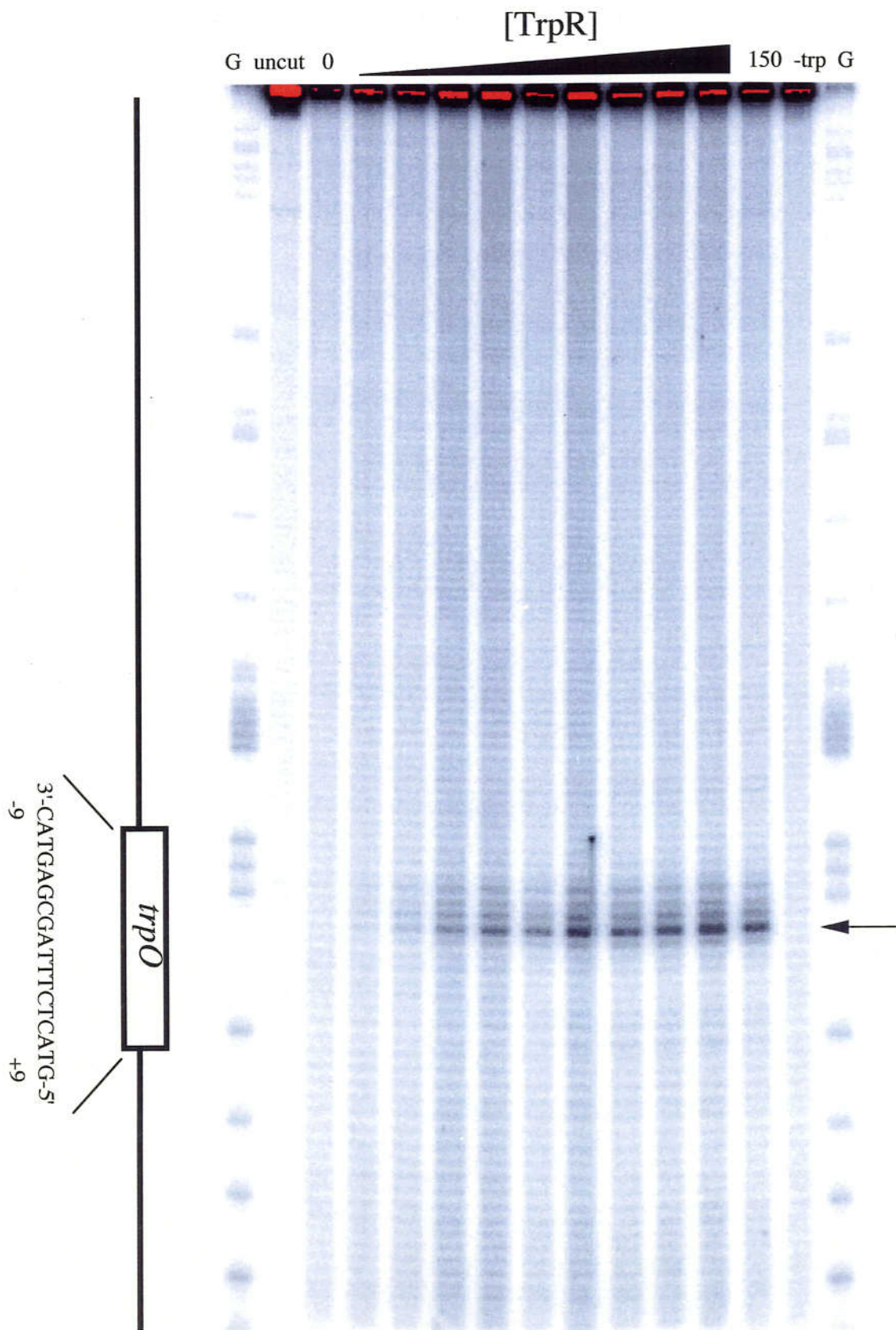
緒言で述べたように TrpR には、特異的部位に対する親和性と細胞内のコピー数に熱力学的な矛盾が存在する。この矛盾をきたすもとになった実験では、TrpR の親和性は、40bp 程度の短い DNA 断片を用いて、ゲルシフトアッセイ法を使って決定された。従って、そのような短い DNA に対しては TrpR のアンテナ効果が有効に検出されていない可能性があり、結果として細胞内の親和性より弱い親和性が観測された可能性がある。我々は、TrpR がアンテナ効果を持ち、長い非特異的部位を持つ DNA 上の特異的部位に対して強い親和性で結合出来るなら、これまでの結果の矛盾は解けると考えた。これを検証するため、全長の異なる DNA の中央に位置する *trpO* に対する親和性を測定し、TrpR のアンテナ効果を見積もった。

まず最初に、ゲルシフトアッセイ法によって、DNA 全体に対する TrpR の親和性を測定した。結果、TrpR - DNA complex のシフトしたバンドがスメアーになってしまい DNA に対する親和性を正確に算出することは出来なかった。この理由は、TrpR は DNA からの解離が速いためであると考えられる。そこで、TrpR の DNA に対する結合強度の測定を、OH ラジカルフットプリンティング法で行った。この方法は、ゲルシフトアッセイ法のように DNA からの解離の影響を受けずに特異的部

位からのシグナルを定量的に検出できる。また、DNase I フットプリンティング法のように DNase I- 蛋白質相互作用によりフットプリンティングの効率が変化して誤った定量性を与える心配がない。そして、プライマーエクステンションアッセイと組み合わせれば、ポリアクリルアミドゲル電気泳動による限界を越えた長さの DNA に対する親和性をも決定できる優れた利点を持つ。

長さの異なる DNA は、大腸菌の TrpR プロモーター由来の *trpO* を持ち、*trpO* を中心として両側に同じ長さの非特異的部位を持つようにデザインした。また、PCR の鋳型として用いた pRG16 上の DNA 配列を調べたところ、*trpO* 以外に TrpR が特異的に結合する配列はなかった。

Fig.3 に 200bp に対する TrpR の OH ラジカルフットプリンティングの結果を示す。OH ラジカルの反応は、TrpR の親和性を定量的に決定するために、1 本の DNA を 2 回以上切ることはないシングルカットの条件で行った。Fig.3 中に示されるように、*trpR* オペレーターの -1T, +1A, +2G, +3C, +4G の位置に、TrpR の濃度に依存して OH ラジカルに対して感受性が上昇する部位が観測された。これら対応するバンドは、TrpR の co-repressor である L-tryptophan の無い条件では観測されなかった。従って、この DNA の領域が OH ラジカルに対して感受性が高くなるのは、TrpR が DNA に特異的に結合した結果であることが結論づけられる。これらのバンドの中で最も感受性の高い -1T のバンドの放射能をオートラジオグラムのバンドの濃度とし



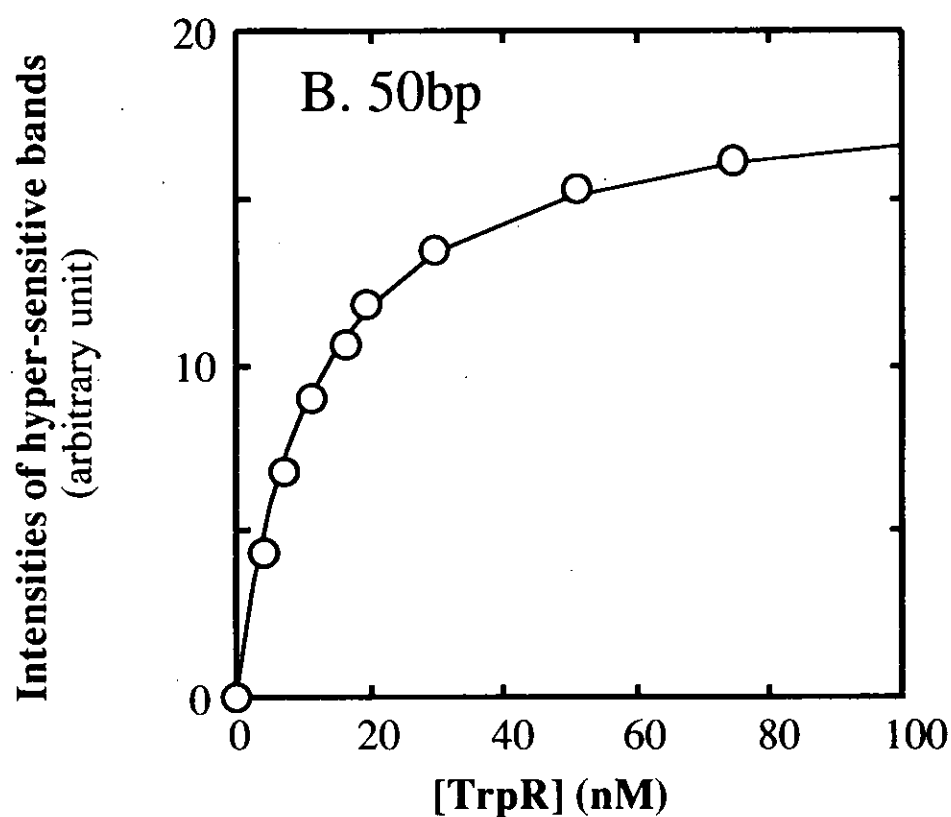
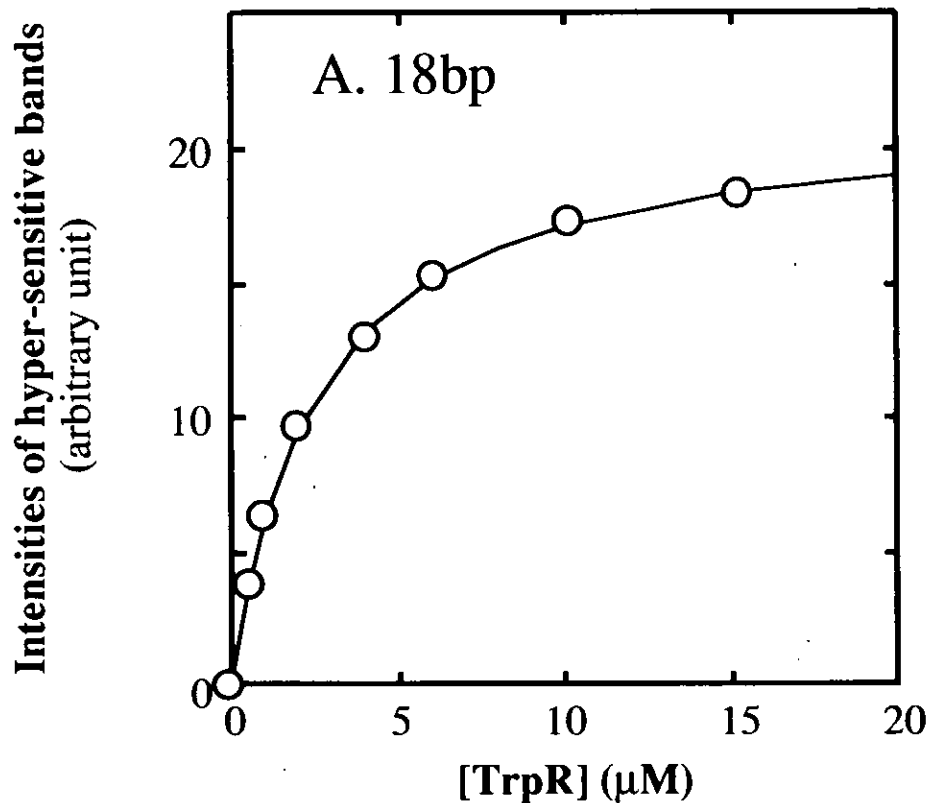
**Figure 3** Hydroxyl radical footprinting of TrpR at a *trpO* on a 200bp DNA fragment. G denote G ladder. TrpR concentration was varied 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 75, 100, 150 nM. L-tryptophan was omitted from the reaction mixture of lane 150 nM, otherwise it was present at 250  $\mu$ M. The position and the sequence of *trpR* operator are shown in the left hand side. The arrow indicates the hypersensitive band used for the determination of the binding constant.



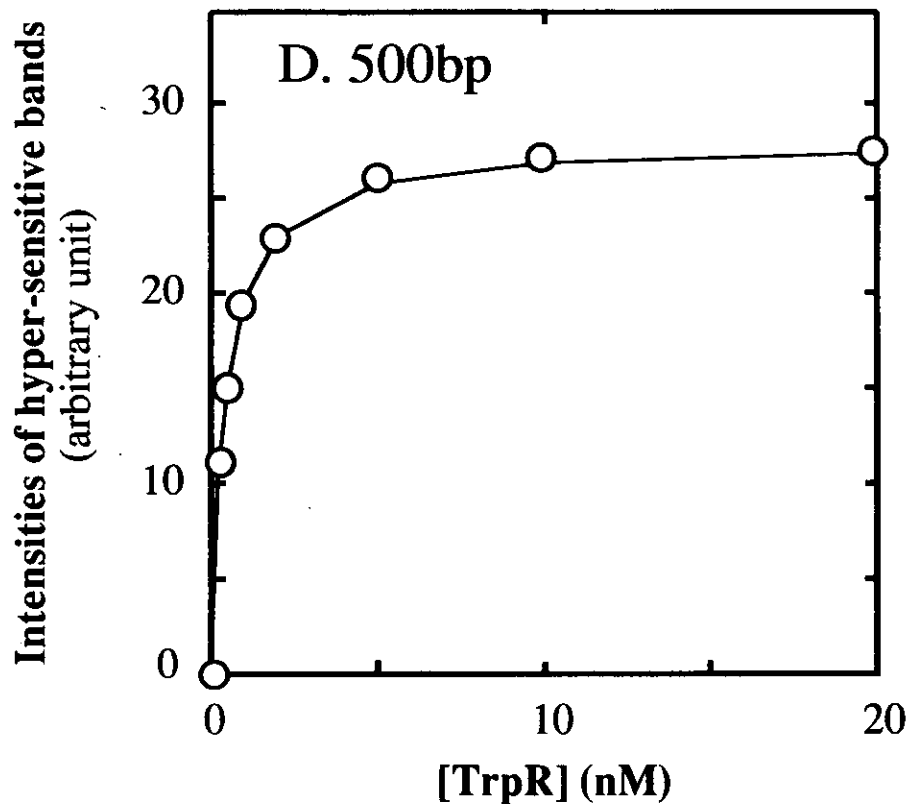
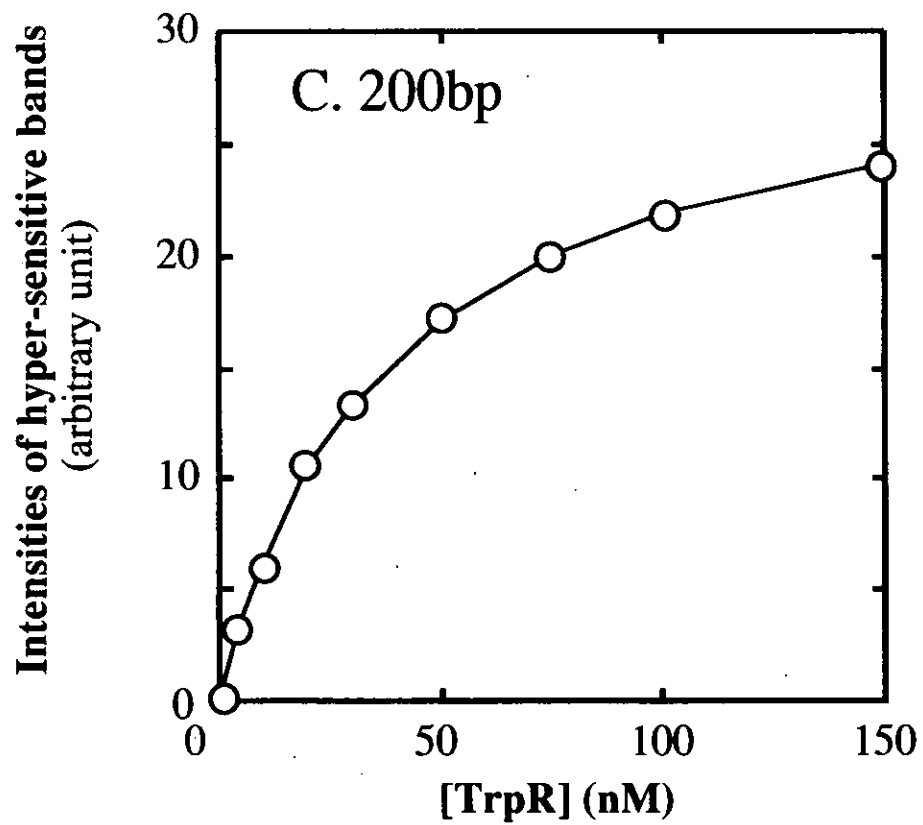
て定量して、TrpR の濃度に対してプロットした (Fig.4). このプロットに対して、最小二乗法を用いて結合強度  $K_d$  を算出した. 同様な方法を用いて、18bp, 50bp に対するフットプリントから結合強度  $K_d$  を算出した (Fig.4, Fig.5). それぞれの結合強度  $K_d$  は、Table 3 に示す.

500bp, 1000bp, 5,200bp は非特異的部位が長いため、5'-末端を直接 RI で標識して電気泳動を行ってシグナルを検出することは困難であるので、これらの DNA からシグナルは、OH ラジカル反応後、プライマーエクステンションアッセイを行って検出した. 5,200bp の結果を Fig.6 に示す. 200bp と同じ位置に TrpR の濃度に依存して OH ラジカルに対して感受性が高くなるバンドが観測された. これらのバンドの中で最も感受性の高い -1T のバンドを定量して、TrpR の結合強度  $K_d$  を算出した (Fig.7). 同様な方法を用いて、500bp, 1000bp に対する結合強度  $K_d$  を算出した (Fig.6, Fig.7). それぞれの結合強度  $K_d$  を Table 3 に示す. 各 DNA に対する TrpR の  $K_d$  値を非特異的部位の長さに対してプロットしたグラフを Fig.8 に示す. 図中に示されるように、200bp を除いては、TrpR の特異的部位に対する親和性は、非特異的部位が長くなるほど高くなり、18bp から 5,200bp で約  $10^4$  倍のアンテナ効果が観測された. これは、TrpR の矛盾を解くには、十分な効果である.

200bp に対する TrpR の親和性が、他の各 DNA に対する  $K_d$  値をつないだ曲線から予想される値より低いのは、200bp は 5'-末端近傍に cruciform を作る DNA 配列が



**Figure 4** Binding isotherms obtained by the analysis of OH radical footprinting. The hypersensitive band was plotted as a function of TrpR concentration. The binding curves were least-square fit of a simple binding isotherm (eq.1) with the values for  $K_d$ . The DNA length are 18bp (A) and 50bp (B).

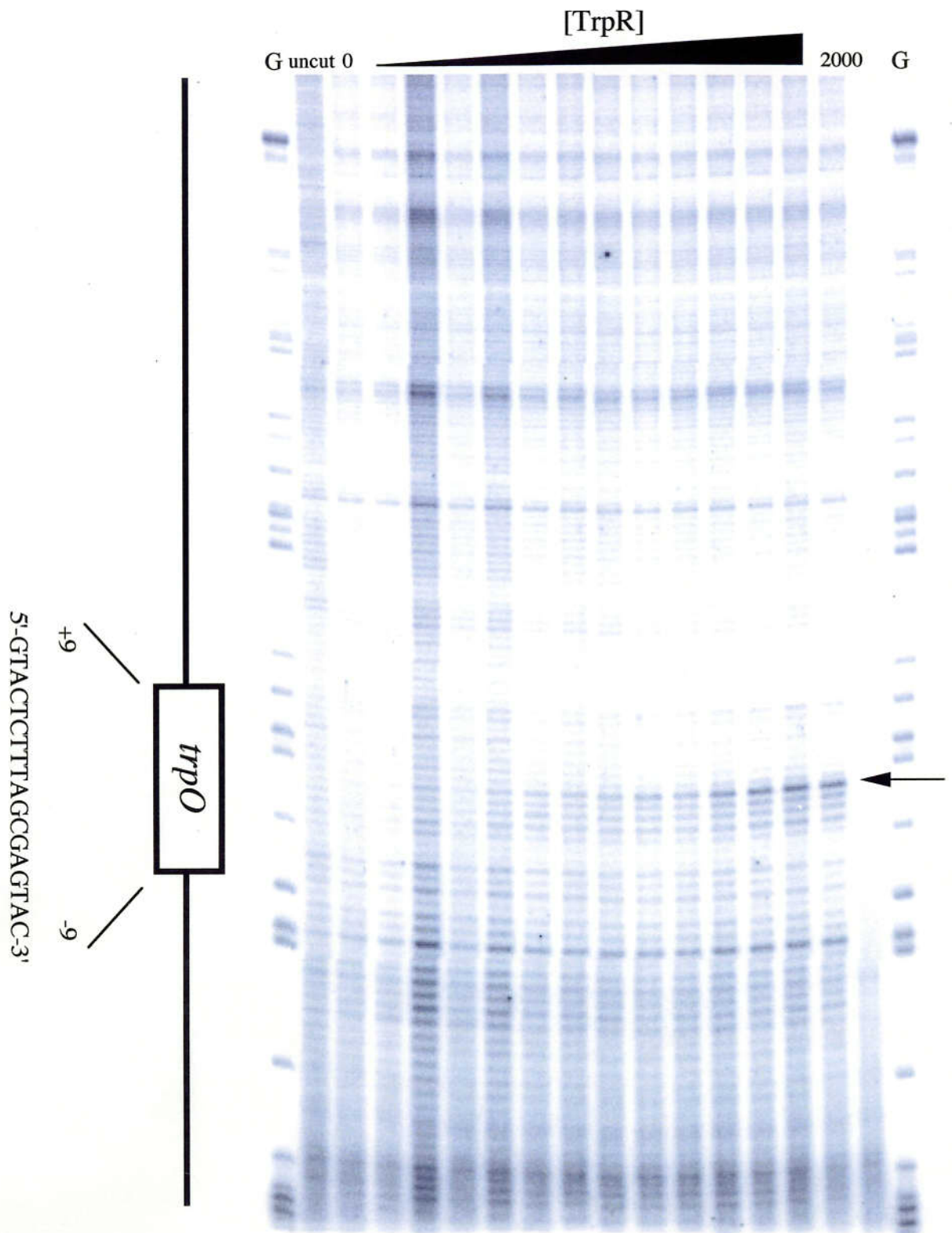


**Figure 5** Binding isotherms obtained by the analysis of OH radical footprinting. The hypersensitive band was plotted as a function of TrpR concentration. The binding curves were least-square fit of a simple binding isotherm (eq.1) with the values for  $K_d$ . The DNA length are 200bp (C) and 500bp (D).

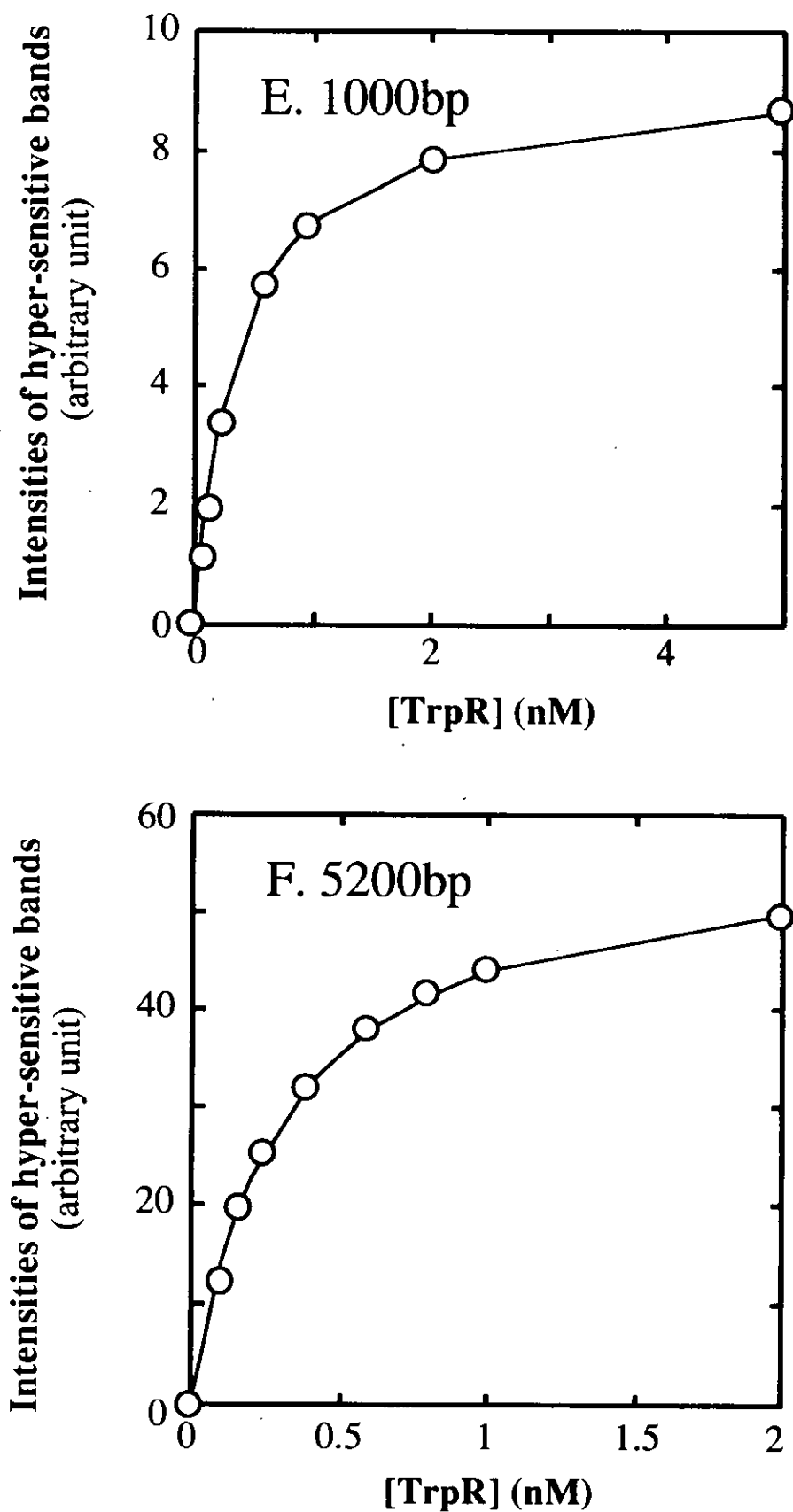
**Table 3** K<sub>d</sub> values of TrpR for various length of DNA

DNA	K <sub>d</sub> <sup>a</sup>
18bp	K <sub>d</sub> = 2.4 ± 0.2 μM
50bp	K <sub>d</sub> = 11 ± 1 nM
200bp	K <sub>d</sub> = 37 ± 1 nM
500bp	K <sub>d</sub> = 0.43 ± 0.02 nM
1,000bp	K <sub>d</sub> = 0.35 ± 0.06 nM
5,200bp	K <sub>d</sub> = 0.20 ± 0.01 nM

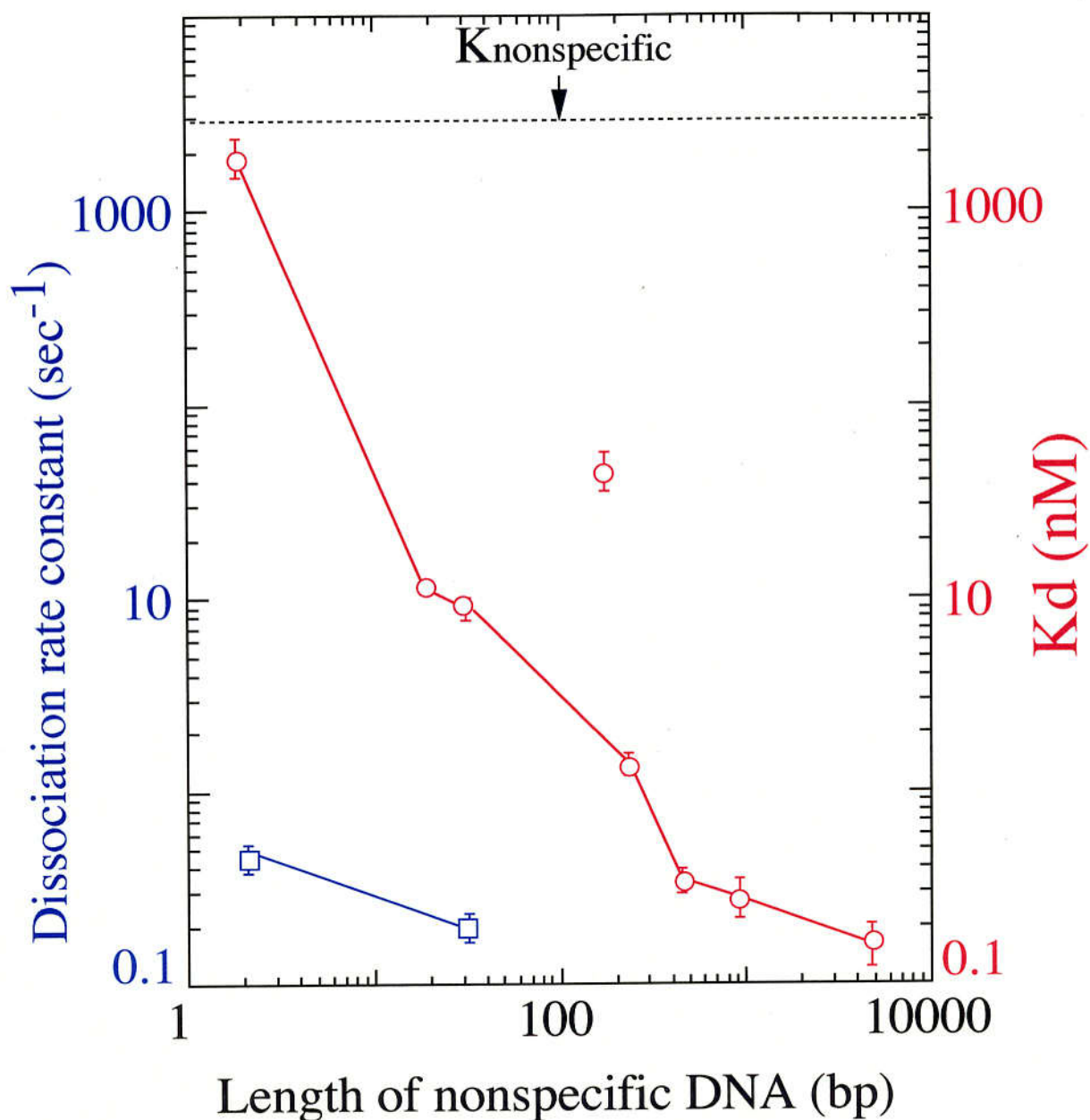
<sup>a</sup>Dissociation constant was determined by OH radical footprinting.



**Figure 6** Hydroxyl radical footprinting of TrpR at a *trpO* on a 5,200bp DNA fragment with primer extension. The primer locates 100bp downstream of the center of the operator. G denote G ladder. TrpR concentration was varied 0, 10, 20, 40, 60, 100, 150, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 2000 pM. L-tryptophan was present at 250  $\mu$ M. The position and the sequence of *trpR* operator are shown in the left hand side. The arrow indicates the hypersensitive band used for the determination of the binding constant.



**Figure 7** Binding isotherms obtained by the analysis of OH radical footprinting. The hypersensitive band was plotted as a function of TrpR concentration. The binding curves were least-square fit of a simple binding isotherm (eq.1) with the values for  $K_d$ . The DNA length are 1000bp (E) and 5200bp (F).



**Figure 8** Dissociation equilibrium constants and dissociation rate constants of TrpR-*trpO* complex formed on various length of DNA. Dissociation equilibrium constant  $K_d$  are presented in red and dissociation rate constants are indicated in blue.

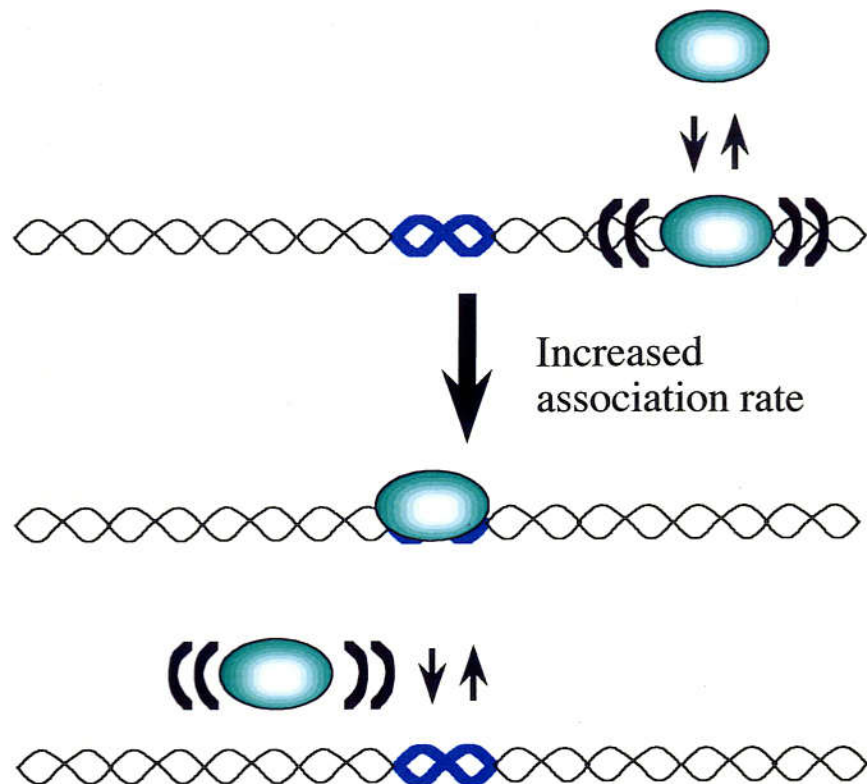
あり、5'-末端側のスライディングがこの二次構造によって阻害されたため、アンテナ効果が減少したと推測することが出来る。

### 3-2 TrpR の DNA からの解離速度定数の算出

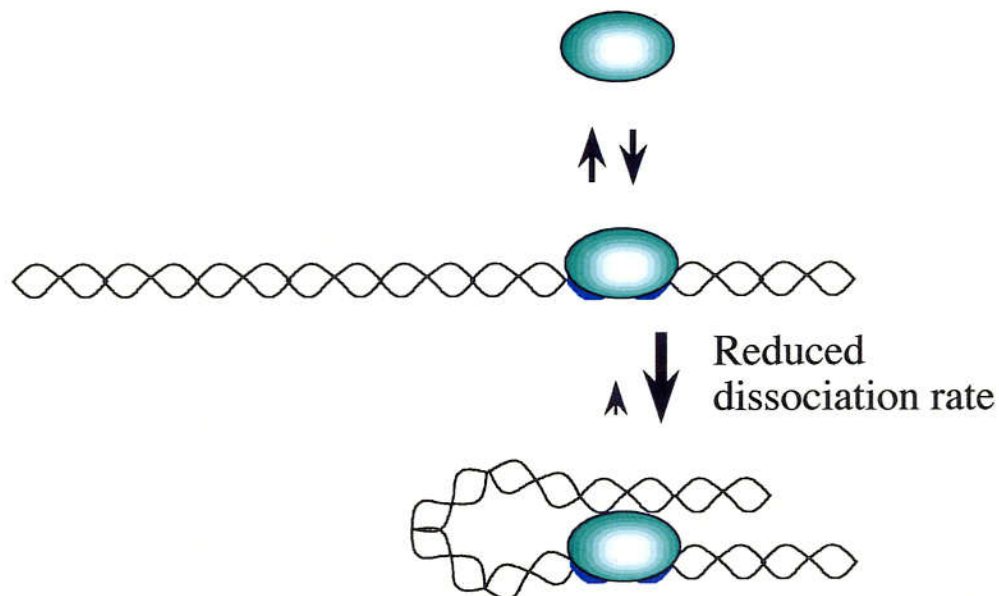
今まで、アンテナ効果を引き起こすモデルとしてスライディングのみを述べたが、スライディングモデル以外にも DNA のループングによってもアンテナ効果は起こり得る。この2つのモデルを Fig.9 に示す。スライディングモデルでは、非特異的部位の長さに依存して結合速度が加速され、解離時はほとんどスライドしないので、解離は加速されず、結局、蛋白質の特異的部位に対する親和性が高くなる。一方、ループングモデルでは、蛋白質が特異的部位に結合後、非特異的部位がループングして、蛋白質が第2の相互作用を起こし複合体が安定化され、親和性が高くなる。故に、前者では、非特異的部位が長くなるにつれて結合速度が増加し、後者では、解離速度が減少するはずである。従って、結合速度定数と解離速度定数の非特異的部位の長さに対する依存性を調べれば、どちらが原因となって TrpR のアンテナ効果を引き起こしているかがわかる。これを検証するため、18bp, 50bp に対する TrpR の解離速度定数をゲルシフトアッセイ法で測定した (Fig.10)。結果は、18bp, 50bp の解離速度定数はそれぞれ  $0.47, 0.24 \text{ (sec}^{-1}\text{)}$  であった (Table 4)。この測定結果を Fig.8 中に示した。18bp, 50bp に対する親和性は、それぞれ  $2.5\mu\text{M}, 11\text{nM}$  であり、この2つの DNA の間では、約 230 倍のアンテナ効果が存在する。もし、ループン



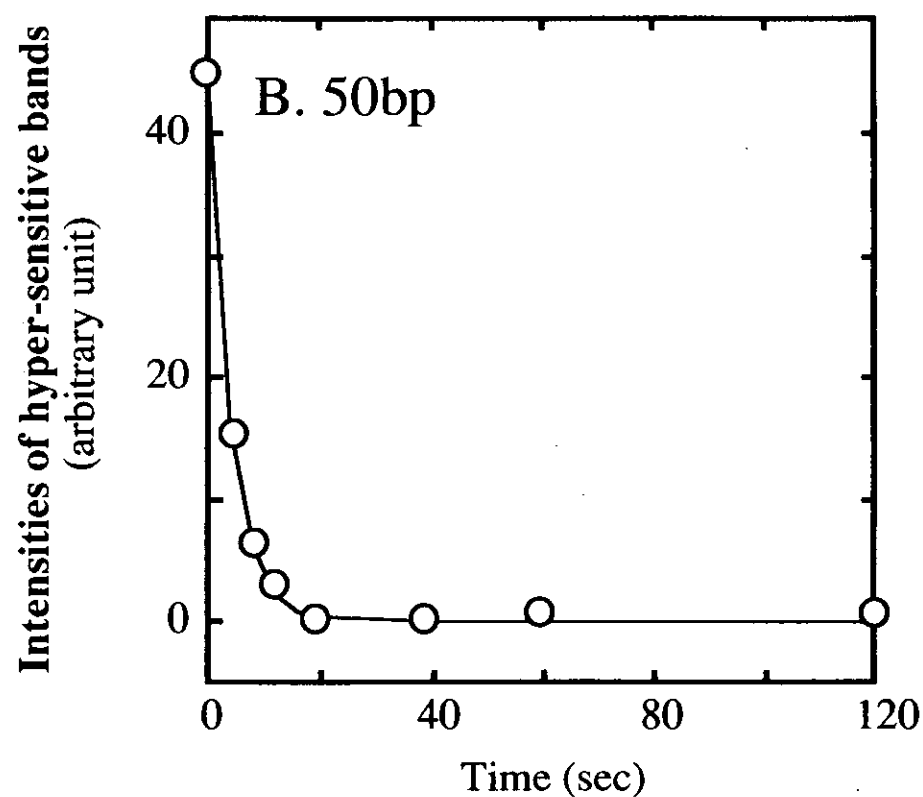
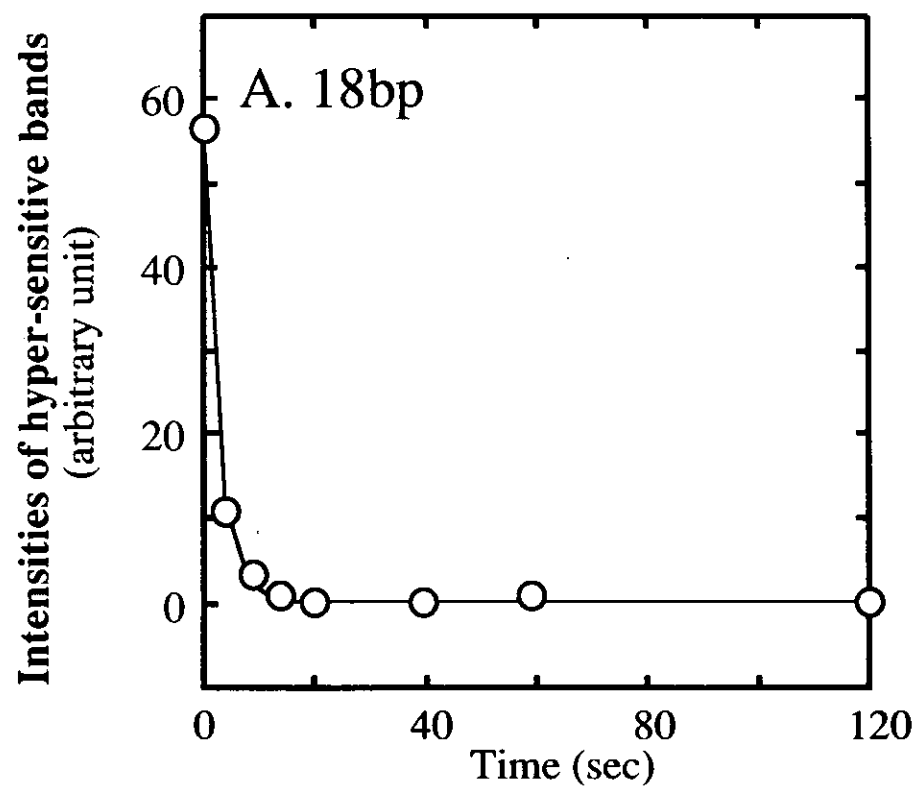
## A. Sliding model



## B. Looping model



**Figure 9.** Two models which exert antenna effect. The green ovals are DNA binding protein molecule and DNAs are expressed as helices. The blue part indicates specific site. A. Sliding model; Association was accelerated by sliding along nonspecific DNA. Dissociation from the specific site is rarely mediated by non-specific complex, and the protein directly dissociates into bulk. B. Looping model; Dissociation was decelerated by looping of nonspecific DNA. The specific complex is further stabilized by the second protein-DNA interaction which is possible if DNA is long enough.



**Figure 10** Dissociation rate isotherms obtained by the analysis of gel shift assay. The band of TrpR-DNA complex was plotted as a function of incubation time after adding competitive DNA. The dissociation curves were least-square fit of a simple binding isotherm (eq. 2) with the values for dissociation rate constant  $K_{-1}$ . The DNA length are 18bp (A) and 50bp (B).

**Table 4** Dissociation rate constants of TrpR for 18bp and 50bp

DNA	$K_{-1}^a$
18bp	0.47 sec <sup>-1</sup>
50bp	0.24 sec <sup>-1</sup>


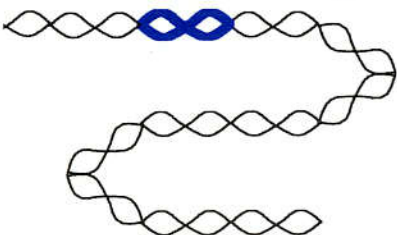

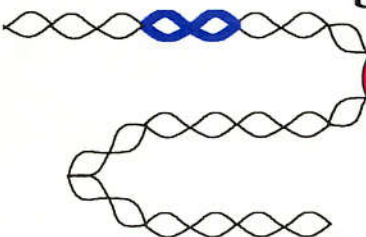
<sup>a</sup> Dissociation rate constant was determined by gel shift assay.

グモデルが TrpR のアンテナ効果を引き起こしているのであれば、50bp の解離速度定数は 18bp の  $1/230$  にならなければならない。しかし、実際の 50bp の解離速度定数は、18bp の 0.6 倍程度にしかっていない。故に、ルーピングモデルでは、TrpR のアンテナ効果は説明できず、スライディングによって TrpR のアンテナ効果は引き起こされていることが結論づけられる。

### 3-3 Avidin-DNA complex に対する TrpR の親和性の測定

このように、TrpR のアンテナ効果は、スライディングによって引き起こされている可能性が高い。もしそうなら、スライディングを長い DNA 上で阻害して、アンテナ効果が無ければ、スライディングモデルが TrpR のアンテナ効果を引き起こしていることを示す決定的な証拠になる。そこで、スライディングバリヤーとして avidin tetramer をオペレーター付近で、立体障害を起こさない程度の遠い位置（オペレーターから 18bp）に biotin を介して DNA に結合させたものを用いた。実際には、*trpO* を中心に持つ 36bp と 232bp の非特異的 DNA を結合させた。コントロールとして *trpO* を中心に持つ 36bp、36bp と 232bp の非特異的 DNA が一本になったものを用いた (Table 5)。これらの DNA に対して OH ラジカルフットプリント法を用いて親和性を測定した。もしスライディングモデルが正しいのであれば、36bp と 232bp の非特異的 DNA を直接結合させた DNA と 36bp と 232bp を avidin を介して結

**Table 5** Antenna effect of TrpR is due to sliding

DNA	K <sub>d</sub> (nM) <sup>a</sup>	Relative affinity
<p>36bp</p> 	15	(1)
<p>36+232bp</p> 	1.7	9
<p>                        avidin- biotin                 </p>	14	1.1
<p>                        avidin- biotin                 </p>	15	1

<sup>a</sup>Dissociation constants were determined by OH radical footprinting. The red circles are avidin molecules and DNAs are expressed as helices. Blue line points specific site.

合させた DNA に対する TrpR の親和性を比較した場合、avidin を介して結合させた DNA に対する TrpR の親和性がスライディングの阻害のため低くなるはずである。もし、ルーピングモデルが正しいのであれば、両方の DNA に対する親和性を比較した場合、ルーピングは阻害されないで、親和性は変わらないはずである。それぞれの結果を Table 4 に示した。Avidin を介して非特異的部位を結合させた DNA に対する親和性が短い DNA と同程度に低くなり、TrpR のアンテナ効果は、スライディングによって引き起こされている事が証明された。

## 4. 考察

4-1 スライディングを利用した新しい遺伝子発現調節機構

4-2 アンテナ効果の化学的考察

## 4. 考察

### 4-1 スライディングを利用した新しい遺伝子発現調節機構

OH ラジカルフットプリンティング法を用いて *trpO* を含む異なる長さの DNA に対する TrpR の結合強度を測定した。この結果より、TrpR の特異的部位に対する親和性は、全長、つまり非特異的部位の長さが大きくなるほど高くなり、18bp から 5,200bp で約 $10^4$ 倍のアンテナ効果があることが示された。故に、TrpR は、5,200bp の DNA に対して、18bp に比べて約 $10^4$ 倍の特異性を持って結合出来ることがわかった。これにより、過去 10 数年来未解決の問題であった TrpR の矛盾を解くことが出来た。そして、avidin - DNA に対する TrpR の結合強度を調べた実験結果より、TrpR のアンテナ効果は、スライディングによって引き起こされている事が証明された。故に、TrpR は、スライディングによるアンテナ効果を利用して特異的部位に対する親和性を高め、必要なコピー数を節約していると考えられる。これが、スライディングの生理的意義である。まるで実際の濃度の 100 倍以上存在しているかのようになり、スライディングを利用して蛋白質が DNA 上の特異的部位になだれこむのである。このような節約は、TrpR のような常時必要とされない蛋白質には、最適な調節機構であると考えられる。当初、DNA 結合蛋白質のスライディングの生理的意義は、物理的に蛋白質の DNA に対する結合速度を速めることであると考えられていた。しかし、DNA 結合蛋白質の結合速度は、制限酵素等の基質に対する反応速度と



比較して速く<sup>40</sup>，結合速度自身が律速反応になることは少ない。従って，この場合，スライディングの生理的意義はないであろう。しかし，CamR 及び TrpR の実験結果からスライディングによって蛋白質の特異的部位に対する親和性が変化させられることが示された。これにより，蛋白質はアンテナ効果を利用して様々な遺伝子発現を調節することが可能になる (Fig.11)。アンテナ効果は，他の様々な蛋白質にも見出されている<sup>40-42</sup>ことから，多くの DNA 結合蛋白質がアンテナ効果を利用して，遺伝子発現を調節していると推測される。

一方，DNA 上の特異的部位の立場から見れば，蛋白質をスライディングで特異的部位に連れてくる非特異的部位は，特異的部位に蛋白質を引き寄せる役割をなす。しかし，スライディングで特異的部位に蛋白質を到達させることが出来ない程遠くにある非特異的部位は，特異的部位に対して競合するので，むしろ，逆の役割をなす。何も無い裸の DNA 上では，スライディングする距離は，確率的に長くなったり短くなったりして，この二種の非特異的部位の境界は明瞭なものではない。しかし，Avidin のように DNA に結合した蛋白質がスライディングをブロックする場合には，この境界が明らかなものとなる。後述するように，これは未知の調節機構を暗示している。

アンテナ効果は，また他の問題も解決する可能性がある。大腸菌 RNA ポリメラーゼは，その特異的部位であるプロモーターの下流に 360bp までの非特異的 DNA

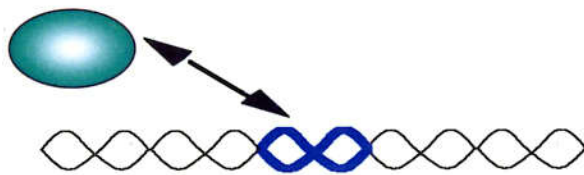
領域を伸張したときに、最大4倍のアンテナ効果を示すが、上流側に伸ばした時には、効果がないことが明らかにされている<sup>23</sup>。つまり、RNAポリメラーゼは、非対称にアンテナ効果を持つ。この現象をルーピングによるアンテナ効果で説明することは困難である。360bpの長さでは、DNAは剛性を持つやわらかいヒモとして扱われなければならないので、上流でも下流でもほぼ同様に、ルーピングによる第二の蛋白質-DNA相互作用が可能である。従って、ルーピングがTrpRのアンテナ効果を引き起こしているならば、アンテナ効果は対称になるはずである。故に、大腸菌RNAポリメラーゼのアンテナ効果も、ルーピングではなくスライディングによるものであろう。アンテナ効果の非対称性は、ポリメラーゼ自身が非対称なことから、スライディングが非対称になって引き起こされていると説明されていた。つまり、ポリメラーゼは、後ろ向きにはスライド出来るが、前向きにはスライド出来ないというものである。しかし、スライディングの原動力は、熱運動する溶媒分子との衝突によるものであるから、このモデルでは、ランダムな熱運動を方向性の有る運動に変換したことになり、熱力学上ありえないモデルになってしまう。従って、スライディング運動自体は非対称でなければならない。もし、特異的部位に結合したRNAポリメラーゼが、上流の非特異的部位へスライディングして解離し、下流には、スライディングしないで直接溶液中に解離するのであれば、下流側にしかアンテナ効果はなく、この非対称のアンテナ効果を説明することができる。プロモーターの

DNA 配列は対称ではないので、このような非対称の解離があってもおかしくはない。

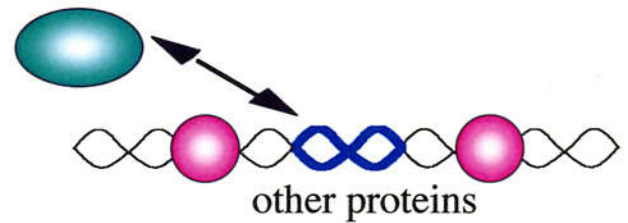
生体内では、DNA 結合蛋白質の DNA に対する結合速度は、DNA 修飾酵素の DNA に対する反応速度に比べると速い場合が多いので、蛋白質の DNA に対する結合解離が律速段階になることは、ほとんどないと考えられる。従って、スライディングによる結合解離の加速自体が意味を持つことはないであろう。しかし、スライディングを利用したアンテナ効果は、蛋白質の DNA に対する結合の親和性を強くさせるので、この機構を利用した調節機構の存在が示唆される。アンテナ効果を利用した遺伝子発現の調節機構を Fig.11 に示す。Fig.11b に示すように他の蛋白質が、特異的部位の近傍に複合体を形成したり、DNA の切断や高次構造形成がスライディングを妨げるとしたら、アンテナ効果は阻害され、蛋白質の特異的部位に対する親和性は低くなる。ヌクレオソームがスライディングを阻止するバリヤーと考えれば、ヌクレオソーム形成による転写抑制もこの機構に含まれる。また、二つの転写の協調した調節を独立したものにするインシュレーターはスライディングを妨げるバリヤーが存在する領域である可能性がある。現在の真核生物の転写調節が、より定量的なレベルで解析されるようになった時、アンテナ効果の存在が重要になるかもしれない。

Fig.11b に示した DNA の切断によるアンテナ効果は、DNA の組み換え反応の時に起こる可能性がある。もし、切断された DNA の端において蛋白質の親和性が低下

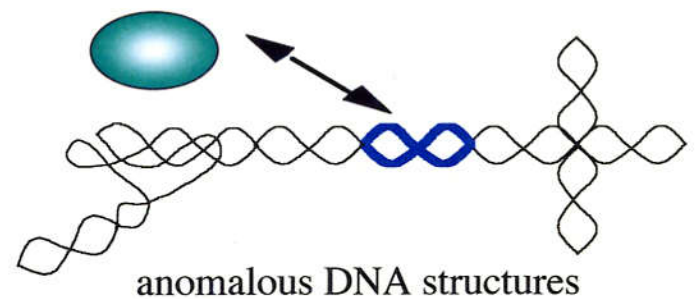
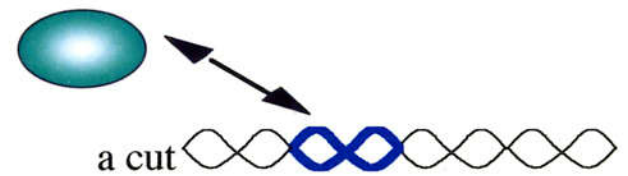
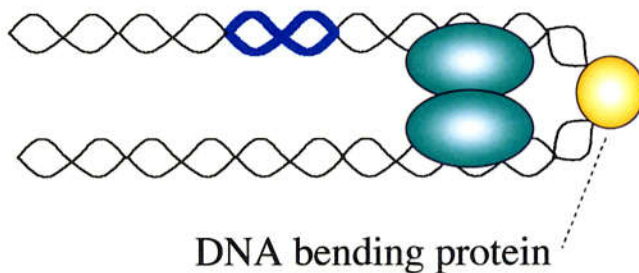
(a) Increased affinity



(b) Decreased affinities



(c) Extremely high affinity



**Figure 11** New mechanisms of gene regulation by antenna effect due to sliding. Increased the affinity of protein for a specific site by antenna effect (a) can be canceled by the presence of other DNA-protein complex locating near the specific site. Blocking of sliding may be a cut of DNA or anomalous DNA structure like triple helix and cruciform (b). Intersegment transfer can extend the region covered by a single consequential sliding and the affinity may be enhanced a great deal (c). Thus, a DNA bent induced by the binding of the yellow protein may greatly increase the specific binding of the green protein. The ovals are a DNA binding protein molecule and DNAs are expressed as helices. The blue part indicate specific site.

するなら、アンテナ効果として考えることができる。

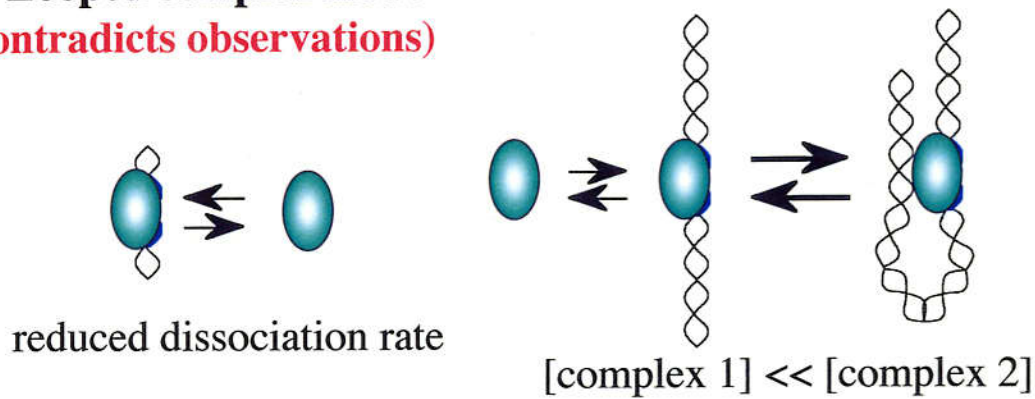
DNAを曲げる蛋白質が結合している場合には、インターセグメントトランスファーを行う蛋白質は、さらに高度な機構が考えられる。インターセグメントトランスファーを利用して、より長いスライディングが可能になり、大きなアンテナ効果を持つ可能性がある (Fig.11c)。

ある蛋白質の特異的部位に対する親和性が、他の蛋白質によって変化させられることは、二つの独立していると考えられてきた結合の間に干渉が生じることになる。もし、その二つの結合が別のそれぞれの調節回路に含まれるものならば、この二つの調節回路は無関係ではなくなる。つまり、スライディングによるアンテナ効果は、二つの調節回路のクロストークを生み、調節ネットワークの交点を形成することになる。今まで、調節ネットワークの交点は、bifunctional な蛋白質や DNA の相同した部分が行っていると考えられていたが、アンテナ効果も、これらの交点になり得る。そして、スライディングの意義は単に親和性の増加だけでなく、もっと豊かな内容を持つ事になる。

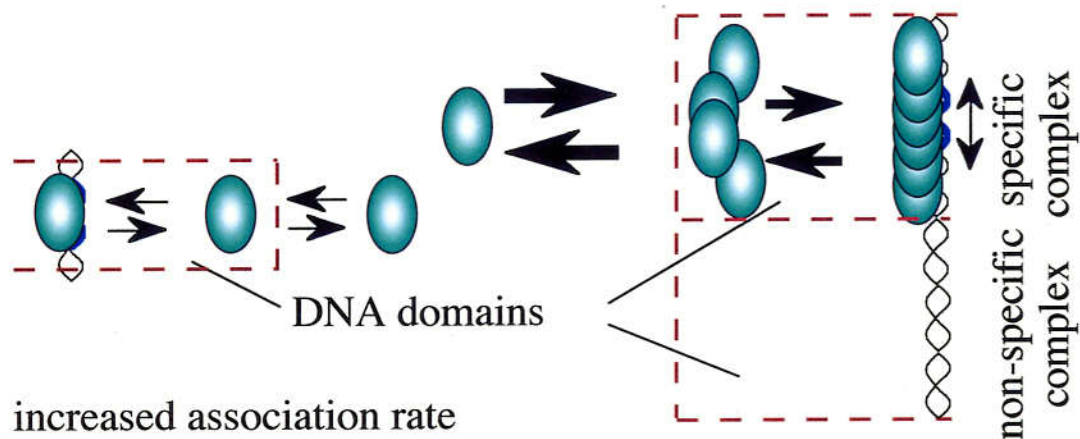
#### 4-2 アンテナ効果の化学的考察

第2の非特異的相互作用によって、特異的複合体がさらに安定化されるなら、アンテナ効果を生み出す (Fig.12A)。この場合、extended complex を仮定する必要はな

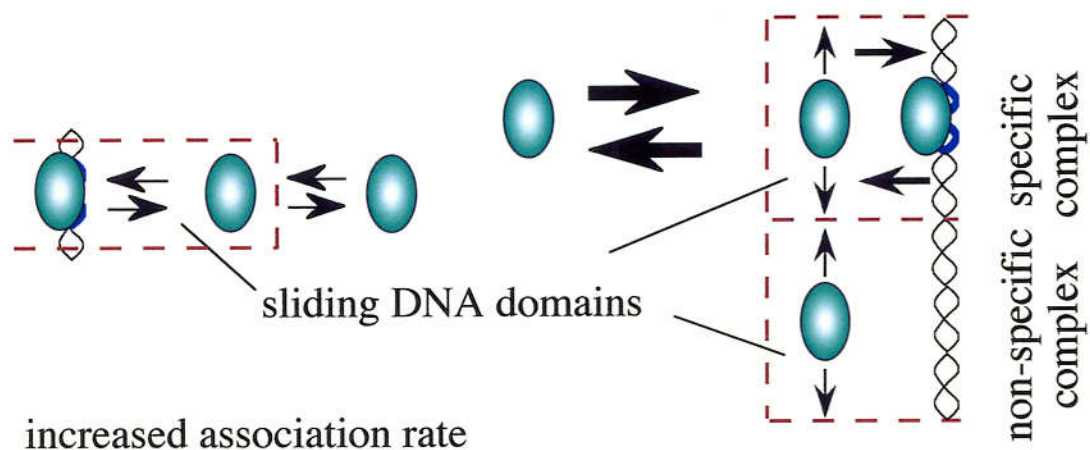
**A. Looped complex model**  
**(contradicts observations)**



**B. Intervening DNA domain model**



**C. Sliding DNA domain model**



**Figure 12** Possible mechanisms exerting antenna effect. A: Looped complex model. The specific complex is further stabilized by a second nonspecific interaction between DNA and the protein. In the case of TrpR, this model was denied by the experiment shown in figure 8. B: Intervening DNA domain model. An elongated space surrounding a DNA chain, which is termed the "DNA domain" here, is supposed on the extended chemical species and protein molecules dissociates from the extended specific site into this space before becoming free in bulk. C: Sliding DNA domain model. Sliding is supposed the diffusion within the domain in the alone model and no further states are assumed for nonspecific complex, so that nonspecific complex is the protein in the DNA domain itself. Association was accelerated by sliding along nonspecific DNA in this model.

く、各塩基対ごとに別の“非特異的部位に結合したTrpR”を仮定すれば事足りる。

この looping model は、受け入れやすいものであるが、TrpR の場合は、解離速度常数の DNA 長への依存性が少ないことと、avidin - biotin で結合した DNA を用いた実験の結果は、このモデルに矛盾する。

Extended complex を仮定した場合は、アンテナ効果があっても、遊離状態から特異的部位への直接結合に関する微視的可逆性は常に満たされる。ここで、解離直後の蛋白質の状態に応じて、2つのモデルを考えることが出来る。第一は、解離直後の蛋白質はまだ DNA の影響下にあつて、遊離状態とは別のコンフォメーションを持つという仮定であり、“DNA ドメイン”と呼ぶ特別の空間を必要とするものである (Fig.12B)。遊離状態の蛋白質と介在空間との平衡、介在空間に存在する蛋白質と特異的部位にスライディングで到達できる距離にある非特異的複合体との平衡を考えれば、微視的可逆性は成立する。DNA・RNA ポリメラーゼの高速クロスリンクの実験から、DNA・RNA ポリメラーゼ複合体は、DNA の近傍には存在しているがクロスリンクされず、“DNA ドメイン”と呼ばれる介在空間中に存在することが示唆されている<sup>43</sup> (Fig.12B)。これは、上述した介在空間のモデルを間接的に支持する。この説は、ほとんど全ての実験を説明することが出来る。しかしこの説の難点は、DNA ドメインの長さがスライディング距離と一致する構造的な根拠を見出すことである。

もう一つの extended complex を仮定するモデルは、DNA ドメイン内の拡散そのものをスライディングと考えるものである (Fig11C)。このモデルは、非特異的複合体とスライディング複合体とは同じものになっている。

スライディング時の蛋白質は、溶媒の速さと比較して3~2分の1の速さで移動することが観測されている<sup>30</sup>。これは、DNA と蛋白質との結合による摩擦が小さいことを示す。従って、スライディング時の蛋白質は、DNA からあまり拘束を受けていないことが推察される。故に、Fig.12C 中に示すようにスライディング運動を行っている複合体は、結合しているというよりむしろ、DNA のまわりの介在空間中を移動しているのかもしれない。

このようなモデルは、化学法則を満たすためとはいえ、本来境界のないはずの連続的な非特異的部位に境界があり、奇怪である。しかし、これは化学の欠陥ではなく、化学の基本法則である本来連続的なものを分割して近似化する方法が顕在化したためであろう。

今後の課題は、提案された機構がどれくらい生きた細胞内で働いているかを調べることである。細胞内でスライディングバリアーを発現させて、それによりアンテナ効果がどのように変化するかを観察する。



## 引用文献

1. 嶋本伸雄 ナノバイオロジー入門, 講談社, 1994, p.1-48
2. von Hippel, P.H., and Berg, O.G. *J. Biol. Chem.*, (1989) 264, 675-678
3. Fickert, R., and Mueller-Hill, B. (1992) *J. Mol. Biol.* 226, 59-68
4. Ruusala, T., and Crothers, D. M. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89, 4903-4907
5. Hsieh, M., and Brenowitz, M. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 22092-22096
6. Lieberman, B. A., and Nordeen, S. K. (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 1061-1068
7. Riggs, A. D., Bougeois, S., and Cohn, M. (1970) *J. Mol. Biol.* 53, 401-417
8. Richter, P. H., and Eigen, M. (1974) *Biophys. Chem.* 2, 255-263
9. Berg, O. G., Winter, R. B. and von Hippel, P. H. (1981) *Biochemistry* 20, 6929-6948
10. Jeltsch, A., Alves, J., Wolfs, H., Maass, G., and Pingoud, A. (1994) *Biochemistry* 33, 10215-10219
11. Ehbrecht, H. -J., Pingoud, A., Urebenbake, G., Maass, G., and Gualerzi, C. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 6160-6166
12. Terry, B. J., Jack, W. E., and Modrich, P. (1985) *J. Biol. Chem.* 260, 13130-13137
13. Jack, W. E., Terry, B. J., and Modrich, P. (1982) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79, 4010-4014

14. Langowski, J., Alves, J., Pingoud, A., Maass, G. (1983) *Nucl. Acids Res.* 11,  
501-513
15. Jeltsch, A., Fritz, A., Alves, J., Wolfs, H., and Pingoud, A. (1993) *Anal. Biochem.*  
213, 234-240
16. Nardone, G., George, J. ,and Chirikjian, J. G. (1986) *J. Biol. Chem.* 261,  
12128-12133
17. Berkhout, B., and van Wamel, J. (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 1837-1840
18. Jeltsch, A., Wenz, C., Stahl, F., and Pingoud, A. (1996) *EMBO J.* 15, 5104-5111
19. Khoury, A. M., Lee, H. J., Lillis, M., and Lu, P. (1990) *Biochim. Biophys. Acta.*  
1087, 55-60
20. Kim, J. G., Takeda, Y., Matthews, B. W., and Anderson, W. F. (1987) *J. Mol. Biol.*  
196, 149-158
21. Ricchetti, M., Metzger, W., and Heumann, H. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*  
85, 4610-4614
22. Belinstev, B. N., Zavriev, S. K., and Shemyakin, M. F. (1980) *Nucl. Acids Res.* 8,  
1391-1404
23. Surby, M. A., and Reich, N. O. (1996) *Biochemistry* 35, 2201-2208
24. Surby, M. A., and Reich, N. O. (1996) *Biochemistry* 35, 2209-2217

25. Nardone, G., George, J., and Chirikjian, J. G. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 12128-12133
26. Ganesan, A. K., Seawell, P. C., Lewis, R. J., and Hanawalt, P. C. (1986) *Biochemistry* 25, 5751-5755
27. Gruskin, E. A., and Lloyd, R. S. (1986) *J. Biol. Chem.* 261, 9607-9613
28. Lloyd, R. S., Hanawalt, P. C., and Dodson, M. L. (1980) *Nucl. Acids Res.* 8, 5113-5127
29. Hamilton, R. W., and Lloyd, R. S. (1989) *J. Biol. Chem.* 265, 17422-17427
30. Kabata, H., Kurosawa, O., Arai, I., Washizu, M., Margaron, S. A., Glass, R. E., and Shimamoto, N. (1993) *Science* 262, 1561-1563
31. Shimamoto, N. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 15293-15296
32. Joachimiak, J., Kelley, R. L., Gunsalus, R. P., Yanofsky, C., and Sigler, P. B. (1983) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 668-672
33. Sigler, P., B. (1992) *Transcriptional regulation* 475-499 Cold Spring Harbor Laboratory Press
34. Klig, L.S., Crawford, I. P., and Yanofsky, C. (1987) *Nucl. Acids Res.* 15, 5339-5351
35. Carey, J. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 85, 975-979

36. Yang S.-W., and Nash, H. A. (1995) *EMBO J.* 14, 6292-6300
37. Gunsalus, R. P., Miguel, A. G., and Gunsalus, G. L. (1986) *J. Bact.* 167, 272-278
38. Frederick, M. A., Roger, B., Robert, E. K., David, D. M., J. G. Seidman, John, A. S., and Kevin, S. (1989) *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*  
Greene publishing Associates and Wiley-Interscience
39. Joachimiak, A., Kelley, R. L., Gunsalus, R. P., Yanofsky, C., and Sigler, P. (1983)  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 80, 668-672
40. Surby, M. A., and Reich, N. O. (1996) *Biochemistry* 35, 2201-2217
41. Lee, S. P., Censullo, M. L., Kim, H. G., and Han, M. K. (1995) *Biochemistry* 34,  
10215-10223
42. Khoury, A. M., Lee, H. J., Lillis, M., and Lu, P. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*  
1087, 55-60
43. Park, C. S., Hillel, Z. and Wu, C. -W. (1982) *J. Biol. Chem.* 257, 6944-6949

## 謝辞

本研究にあたり、終始御懇切なる指導を賜りました国立遺伝学研究所超分子機能研究室教授嶋本伸雄博士及び永井宏樹助手に厚くお礼申し上げます。

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、小川智子教授、徳永万喜洋助教授、木村 誠助手、そして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。

終始有益なご助言と激励を賜りました Yale 大学研究員久堀智子博士に深く感謝します。そして、常に討論に加わり鼓舞して下さいました超分子機能研究室の諸氏に感謝いたします。

京都大学工学部助手加畑博幸博士には、研究面から私生活まで面倒を見ていただきました。心から感謝いたします。

TrpR の研究に関してころよく協力を承知していただき、プラスミド及び精製 TrpR 蛋白質を供与して下さった Princeton 大学の Jannette Carey 博士に厚く感謝の意を表します。

明星大学清水光弘助教授には、プライマーエクステンションアッセイを行うにあたり有用な助言を頂きました。心からお礼申し上げます。

私がこの論文を仕上げるまでの研究成果を挙げることが出来たのは、終始私を支え続けてくれた妻 郁代のおかげであり、言葉で表せないほど感謝しております。