

論文内容の要旨

論文題目： DNA ヘリカーゼ UvrD の機能単位の 蛍光 1 分子イメージング

氏名 中条 裕子

序論

DNA ヘリカーゼは原核生物や真核生物のみならず、バクテリオファージやウィルスまで高度に保存された酵素であり、DNA 複製、修復、組換え、接合伝達、転写伸長過程などに関与し、ゲノム情報の安定維持に関与している。研究対象である DNA ヘリカーゼ UvrD は DNA 損傷時のヌクレオチド除去修復、ミスマッチ修復、SOS 修復などで重要な役割を果たす酵素であり、ATP 加水分解のエネルギーを利用し、3' → 5' 方向に二本鎖 DNA を一本鎖 DNA に巻き戻す活性を持つ。UvrD は、これまでの生化学実験の結果から二量体以上の多量体で DNA を巻き戻すと考えられていたが、2006 年に報告された X 線結晶構造解析の結果では単量体でも巻き戻し活性がある可能性が示唆されている。また、生化学実験では UvrD のステップサイズ (ATP 1 分子の加水分解エネルギーで巻き戻すことのできる DNA 塩基数) は 4-6 bp と推測されているのに対し、X 線結晶構造解析の構造からは 1 bp であることが示唆されている。この 2 つの報告の差異は、生化学的方法ではアボガドロ数オーダーの分子の平均値を、X 線結晶構造解析の結果は動的に動き回るタンパク質のスナップショットから推定される反応過程を推測しているものであり、生体内で起こっている一連の反応過程をみているわけではないことに起因すると考えられる。本論文では、平均化されていない単一分子のダイナミクスを理解することができる蛍光 1 分子イメージングにより DNA に結合している蛍光色素標識 UvrD を 1 分子のレベルで直接観察し、蛍光色素の褪色の過程を解析することで UvrD の機能単位を明らかにすることを目的とした。

結果と考察

1. 部位特異的蛍光色素標識 UvrD の作製

本論文では、UvrD に蛍光色素 1 分子を高い標識率で特異的に標識し、その褪色の過程を観察することで、UvrD の機能単位の解明を試みることにした。タンパク質を特異的に蛍光標識するには、GFP などの蛍光タンパク質と遺伝子工学を用いて融合させるのが確実である。しかし、蛍光タンパク質は様々な改良が行われているものの、1 分子観察を行うには暗く、また分子量が大きいため立体障害

がおき、活性の低下を招いたり他の分子との相互作用ができなくなる可能性もある。そこで、本研究では UvrD の蛍光標識には Cys 残基の SH 基に選択的に反応するマレイミド基を持つ低分子蛍光色素を利用することにした。

N 末端側に 6 個の His を付加した UvrD (82 kDa) を精製し、蛍光色素を適当なモル比で混合して蛍光色素標識を行った。その結果、Tetramethylrhodamine- 5-maleimide (TMR, MW= 481.51) と Dye: Protein (D:P) = 3:1, 5:1 で混合した場合にそれぞれ標識率 43-50 %, 65-90 % の TMR- UvrD を、Cy5-Mono- Reactive Dye (Cy5, MW=791.99) と D:P = 3:1, 5:1 で混合した場合にそれぞれ標識率 89-105 %, 101-120 % の Cy5-UvrD を得た。蛍光色素標識 UvrD の巻き戻し活性を一本鎖突出 DNA を基質に用いて確認したところ、すべての蛍光色素標識 UvrD において活性が保持されていることが分かった (図 1)。

次に、UvrD 中に 6 個存在する Cys 残基 (図 2) のうち、蛍光色素標識される部位を同定するために、TMR-UvrD (D:P = 5:1), Cy5-UvrD (D:P = 5:1) をエンドプロテイナーゼ Asp-N で消化し、Tricine-SDS-PAGE で解析した結果、約 10 kDa のペプチドに蛍光色素標識された Cys 残基が含まれていることが分かった (図 3-a)-1,2; 3-b)-1,2)。TMR-UvrD の Asp-N 消化産物をサンプルとし、HPLC でペプチドマッピングを行い、TMR 由来の吸収が観察されるペプチドの N 末端アミノ酸配列を決定した結果、UvrD において蛍光色素で標識される Cys 残基は主に Cys 52 と Cys 640 の 2 つの残基であることを同定した。

単一 Cys 残基特異的蛍光色素標識を実現するために、Cys52 と Cys640 を Ala 残基に置換した C52A, C640A, C52A/C640A 各変異体を作製した。図 1 に示したのと同様の方法で巻き戻し活性があることを確認したのち、TMR および Cy5 を用いて蛍光色素標識を行った。各変異体の蛍光色素標識率を表 1 に示した。得られた蛍光色素標識変異体を Asp-N 処理し Tricine -SDS-PAGE により解析したところ、TMR 標識変異体においては TMR-C52A で

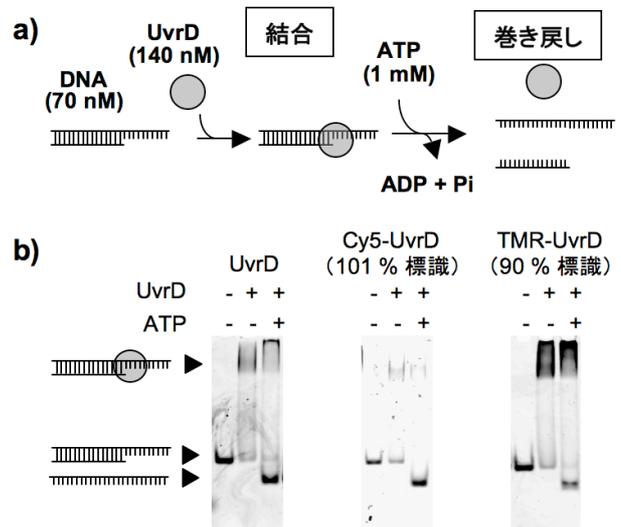


図 1. 蛍光色素標識 UvrD のヘリカーゼ活性の確認

a) ヘリカーゼ活性測定の様式図。20nt の一本鎖突出を持つ基質 DNA と UvrD を混合し、37°C、10 分保温した後 ATP を加え、37°C、2 分反応させる。DNA の巻き戻しを 10 % TBE ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動することで確認する。b) 電気泳動による UvrD と蛍光色素標識 UvrD の巻き戻し活性の確認

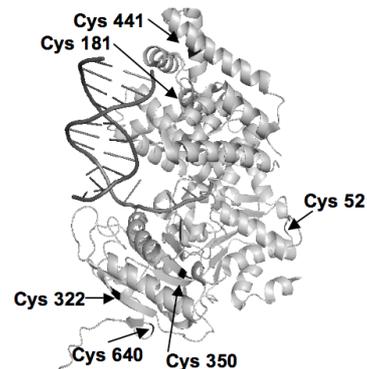


図 2. UvrD の立体構造と Cys 残基の位置

PDB No. 2IS1 より作成。Cys 残基の位置を矢印で示した。

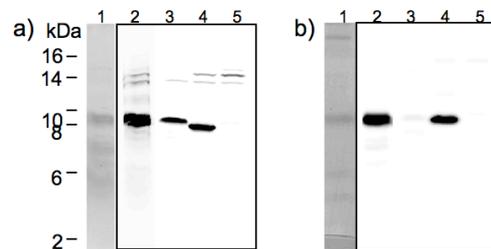


図 3. 蛍光色素標識 UvrD の Asp-N 消化産物の解析

a) TMR 標識 UvrD の消化パターン。1; TMR-UvrD の AspN 消化産物の CBB 染色像, 2; 1 の蛍光像, 3; TMR-C52A の蛍光像, 4; TMR-C640A の蛍光像, 5; TMR-C52A/C640A の蛍光像
b) Cy5 標識 UvrD の消化パターン。1; Cy5-UvrD の AspN 消化産物の CBB 染色像, 2; 1 の蛍光像, 3; Cy5-C52A の蛍光像, 4; Cy5-C640A の蛍光像, 5; Cy5-C52A/C640A の蛍光像

表 1 部位特異的変異体の蛍光色素標識率 (%)

	D:P	C52A	C640A	C52A/C640A
TMR	1:1	2-5	35-40	2-10
	3:1	19-30	60-75	10-15
Cy5	1:1	5-8	28-34	2-8
	3:1	6-9	67-75	5-11

Cys640 が、TMR-C640A では Cys52 が含まれると考えられるペプチドがそれぞれ TMR 標識され、TMR-C52/C640A では TMR ではほぼ標識されないことが示された (図 3). 一方、Cy5 標識変異体においては、Cy5-C52A は Cy5-C52A/C640A と同程度の低い標識率の Cy5 標識変異体しか得ることが出来なかった. 各蛍光色素標識変異体の巻き戻し活性を調べたところ、TMR-C52A は巻き戻し活性を失っていることが分かった. これは、蛍光色素で標識される Cys640 が活性中心近傍に位置しているため、この部位が蛍光色素標識されることで活性の低下を招いていると考えられる. 一方、TMR-C640A および Cy5-C640A では巻き戻し活性が確認された. 以上の結果から、TMR-C640A および Cy5-C640A は、巻き戻し活性を保持しながら、Cys52 に部位特異的に TMR あるいは Cy5 が標識されていることを確認した. 蛍光 1 分子イメージングには標識率が高く、より特異的に標識されていると考えられる Cy5-C640A を用いることにした.

2. UvrD の機能単位の蛍光 1 分子イメージング

蛍光 1 分子イメージングを可能にするためには、水のラマン散乱やガラス表面以外の蛍光や散乱光などの背景光を可能な限り除去する必要がある. このため、低バックグラウンド照明が可能な全反射型蛍光顕微鏡を用いたエバネッセント照明により、1 分子観察を行うことにした. エバネッセント場は境界面からの距離 z に対して指数関数的に減衰するため、ガラス表面のわずか数 100 nm のみを照明することができ、非常にコントラストの良い蛍光画像を取得することができる. この全反射型蛍光顕微鏡下で石英基板上に組み立てた DNA/Cy5-C640A 複合体の褪色過程を観察することで、UvrD の機能単位を明らかにすることにした. 蛍光色素が 1 分子の場合は褪色が 1 段階、2 分子の場合は 2 段階と、蛍光色素の数に応じた褪色が起きるので、DNA 上の Cy5-C640A の会合状態を識別することが可能である.

まず、観察に使用するタンパク質濃度を決定するために、片側の DNA 鎖の末端を Cy3 で標識した一本鎖突出 DNA を石英基板上に固定し、Cy5-C640A と ATP の両者が存在する観察溶液で蛍光 1 分子イメージングを行った. この条件下では、DNA が完全に巻き戻されれば Cy3 標識された DNA 鎖が石英基板から外れて溶液中に拡散し、蛍光が観察されなくなるため、観察に必要なタンパク質濃度を検討することができる. その結果、0.5 nM Cy5-C640A と ATP の観察溶液では Cy3 の蛍光が残っていたが、2 nM Cy5-C640A と ATP の存在する観察溶液では Cy3 の蛍光がバックグラウンドレベルまで下がったことから、蛍光 1 分子イメージングを行うタンパク質濃度を 2nM と決定した.

Lohman らの研究により、UvrD は DNA の一本鎖突出部分が 12nt 以下になると巻き戻し活性が顕著に低下することが分かっている. また、一本鎖部位を長くしていくと徐々に巻き戻し活性が上昇し、40nt 以上になるとわずかながら活性が低下することも報告されていることから、12 nt, 20 nt, 40nt の一本鎖突出 DNA を用いて蛍光 1 分子イメージングを行うことにした. 2nM Cy5-C640A 溶液を満たした状態で一本鎖突出末端 DNA との結合状態の蛍光 1 分子イメージングを行い、それぞれの輝点の

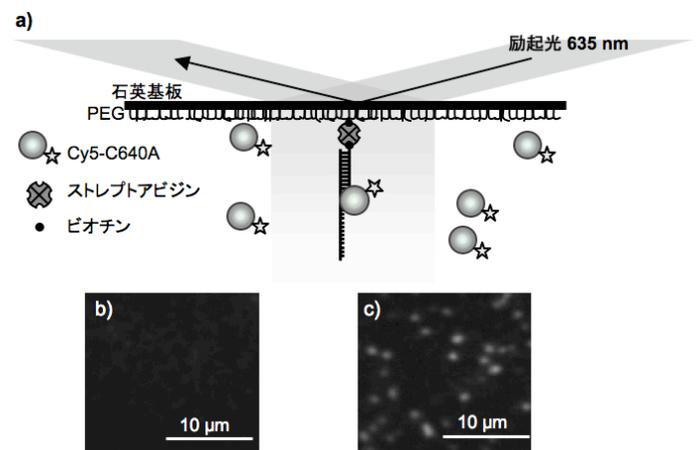


図 4. 蛍光 1 分子イメージング

a) 観察の模式図. 上図に示すように、ビオチン-ストレプトアビジンの結合を利用して、オリゴの末端をビオチンで標識した基質 DNA を石英基板上に固定する. その後、褪色防止剤を添加した Cy5-C640A 溶液を満たして蛍光 1 分子イメージングを行う. レーザー光を石英基板と水溶液の界面で全反射させると、ガラス面から数 100 nm の厚みでエバネッセント場が生じる. この領域に Cy5-C640A が存在すると Cy5 が励起されて蛍光を発するが、溶液中にフリーで存在している Cy5-C640A はブラウン運動をしているため輝点として観察できない. しかし、Cy5-C640A が DNA に結合してブラウン運動が停止すると 1 個の輝点として観察することが可能となる. b) DNA を固定せず、Cy5-C640A のみが存在する場合の蛍光像 (15 フレーム(0.5 秒)平均像). 溶液中の Cy5-C640A はブラウン運動をしているため輝点是非特異的に石英基板上に吸着している場合以外は観察されない. c) DNA/Cy5-C640A の蛍光像 (15 フレーム(0.5 秒)平均像)

蛍光強度の時間変化を解析した。一本鎖 DNA および平滑末端を用いた場合は、DNA のない状態と同程度のごく少数の非特異的に吸着した Cy5-C640A の輝点しか認められなかった(図 4-b)。一本鎖突出を持つ DNA を用いた場合は、1 段階、2 段階、3 段階以上の多段階褪色を示す数多くの輝点が認められた(図 4-c)。褪色段階数の比率(図 5-b)は、一本鎖突出部分の長さにかかわらず、蛍光色素標識率から求めた Cy5-C640A が二量体で存在していると仮定した場合の理論値とほぼ一致した。ATP- γ S 存在下で同様の観察を行ったところ、一本鎖突出部分の長さに応じて 2 段階以上の褪色を示す輝点の数が増えることが分かった(図 5-c)。この結果は ATP- γ S 存在下では DNA に結合している Cy5-C640A の数が増えていることを示唆し、生化学実験から得られた UvrD の機能単位は二量体かそれ以上の多量体であるという結果と一致する。ATP- γ S を加えることによる Cy5-C640A の結合数の増加は、Cy5-C640A 分子に

ATP が結合することで何らかの構造変化が起こり、他の Cy5-C640A 分子と結合しやすくなっていると考えられる。T4 フェージの DNA ヘリカーゼである T4 phage 41 gene は、NTP- γ S 非存在下では単量体か二量体で存在するが、NTP- γ S 存在下で多量体を形成することが報告されており、UvrD において同様の現象が起こっている可能性が考えられる。

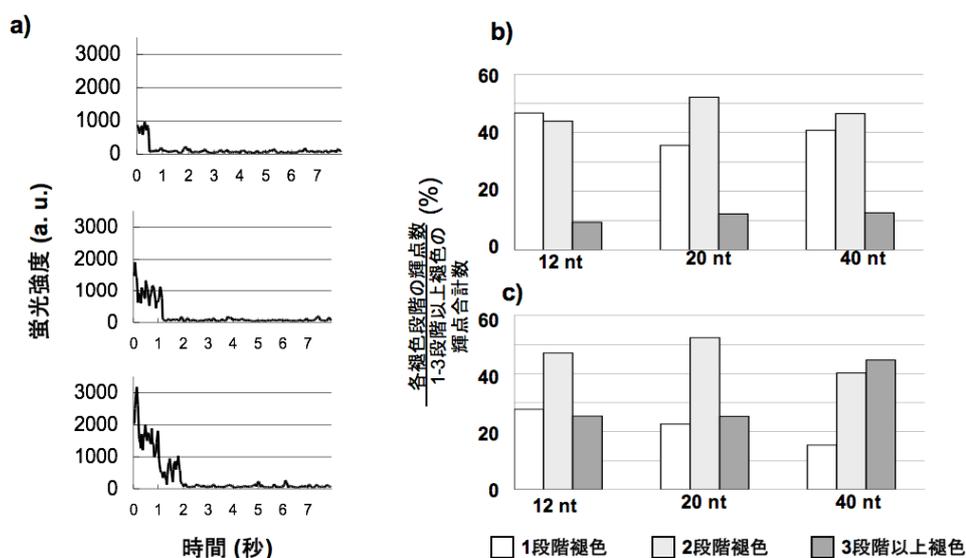


図 5. DNA/Cy5-C640A の計測

a) 1 段階、2 段階、3 段階褪色の例。 b) DNA/Cy5-C640A の褪色過程の比率。 c) b)に 1mM ATP- γ S を添加した場合の褪色過程の比率。 b) c) ともにすべての条件で 500-1000 個の輝点を解析した。グラフ下部の 12 nt, 20 nt, 40 nt はそれぞれ用いた DNA の一本鎖突出部分の長さを示す。

総括と展望

本論文では、単一の蛍光色素で部位特異的に標識される UvrD 変異体 C640A を作製し、蛍光 1 分子イメージング技術を用いて UvrD が DNA を巻き戻す機能単位の解析を行った。その結果、UvrD は二量体で DNA に結合すること、ATP- γ S 存在下の擬似的に DNA を巻き戻している状態では、おそらく二量体以上の多量体を形成していることが示された。このように、蛍光 1 分子イメージング技術は、X 線結晶構造解析や生化学実験だけでは完全に解明することのできない生体分子の反応機構を、タンパク質が機能している現場を直接観察することで、1 分子レベルで検証することが可能である。現在、UvrD の DNA への結合解離と DNA の形態変化などを同時計測できるようなシステムを開発中である。この計測システムを用いることで、DNA 複製・修復・組み換えの機構を 1 分子レベルで解明することも可能になると考えられる。