

# 論文審査の結果の要旨

氏名 中条 裕子

本研究では、蛍光1分子イメージング技術によりDNAに結合している蛍光色素標識DNAヘリカーゼ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の機能単位の解明を試みている。

UvrDは、これまで生化学実験の結果から二量体かそれ以上の多量体で機能していると考えられていたが、近年解かれたX線結晶構造解析の結果からは単量体で機能することが示されている。この問題に決着をつけるために、単一蛍光標識したUvrD変異体の褪色過程をモニターすることにより、UvrDが単量体で機能するのか、二量体以上の多量体で機能するのかを明らかにすることにした。

タンパク質を特異的に単一蛍光標識するには、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が、蛍光タンパク質は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やすい問題点がある。そこで、本研究ではUvrDの蛍光標識に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選択した。UvrDにはCys残基が6ヶ所存在するが、その中でマレイミド基をもつ低分子蛍光色素によって標識されるCys残基を、ペプチドマッピングにより同定した。この結果を基に、UvrD1分子に対し蛍光色素1分子が標識されるようにCys残基を一部欠損させたUvrD変異体を作成した。このUvrD変異体のCy5蛍光標識を試みた結果、活性を有したまま約75%の蛍光標識に成功した。

このCy5-UvrDを用い、蛍光1分子イメージングにより、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の機能単位の解明を試みた。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。UvrDの基質である一本鎖突出を持つ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。褪色段階数の比率を求めたところ、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- $\gamma$ 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多くなることが分かった。この結果は、UvrDは二量体でDNAに結合すること、ATP- $\gamma$ 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を示している。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ことを示した。

蛍光1分子イメージングによって、DNAと相互作用する蛍光標識したタンパク質の動きを見た例は少なく、本研究の成果は今後のDNA-タンパク質相互作用の1分子蛍光イメージングの研究の発展に大きく寄与することが期待される。したがって、博士(生命科学)の学位を授与できると認める。

以上 1349 字