

2003年2月21日

環境・生命工学専攻	学籍番号	963833
申請者氏名	松浦 俊一	

指導教官氏名	桂 進司 水野 彰
--------	--------------

論文要旨 (博士)

論文題目	DNA 1分子直接観察法を用いた酵素動態解析に関する研究
------	------------------------------

近年の蛍光観察技術の進展にともない核内における生体高分子の詳しい機能が解析されるようになり、従来の試験管内実験系では解析できなかった新たな知見を得ることができるようになってきている。従来の電気泳動などを用いた DNA-タンパク質複合体の解析法では 100 万分子以上の分子を対象としているため、得られた結果は多数の分子の平均的な挙動を示し、個々の分子の挙動がどのような分布をもっているのかを明らかにすることはできない。一方、1 分子観測を基礎とした実験系では 1 分子レベルで反応の素過程を解析することが可能になるために、本来の分子の挙動が明らかになることが考えられる。DNA-酵素間相互作用の 1 分子観察では、観察の対象となる DNA と酵素分子をそれぞれ蛍光標識する必要がある。また、顕微鏡視野内において DNA の位置を制御したあと DNA 鎖を適度な長さまで伸張させるなど形態を制御する技術が必要である。本研究では顕微鏡視野内における DNA 分子の形態制御法と酵素の蛍光標識法の確立を行い、これを DNA1 分子レベルでの酵素反応の直接観察に応用することを目的としている。

本研究では DNA-酵素間相互作用の 1 分子リアルタイム観察のモデル系として、まず λ エキソヌクレアーゼによる DNA 分解反応の直接観察を行った。直流電場によって伸張制御された DNA 分子に λ エキソヌクレアーゼを作用させたところ、従来法で得られる平均速度に比べ 100 倍程度速い速度 (約 1000 nt/sec) で分解されることが明瞭に示された。従来の DNA の固定化技術ではガラス基板表面への DNA の非特異的な吸着が問題となっているため、ガラス基板表面を疎水性に改質することで DNA 分子の非特異的な吸着を抑制するとともにチオール修飾 DNA を一端で結合させる方法について検討した。ジクロロジメチルシランを用いて疎水処理したガラス基板にチオール修飾 λ DNA を末端特異的に固定できることを見出した。本研究ではまた制限酵素 *EcoRI* をモデルとして DNA 結合性酵素の蛍光標識法の開発を行った。制限酵素を DNA 上の認識部位に結合させた状態で蛍光物質によるアミノ基標識を行うことで酵素の DNA 結合活性を保持したまま蛍光標識することに成功した。最終的にはここで確立した標識法を真核細胞の修復酵素である DNA ポリメラーゼ β に応用し、DNA 1 分子レベルでの DNA-酵素間相互作用を可視化することを試みた。ガラス基板表面に静電的に伸張固定した DNA に蛍光標識 DNA ポリメラーゼ β を作用させたところ、DNA 鎖に沿って一方向に移動したあと停留する DNA ポリメラーゼ β の蛍光像が確認された。また、2 本鎖 DNA の特定の位置にニックやギャップのような損傷部位を挿入した場合には、DNA ポリメラーゼ β は損傷箇所を優先的に結合することが示された。固定化 DNA を直流電界中で伸張させた場合においても DNA ポリメラーゼ β は DNA に結合した状態を保持した。