

論 文

相同組換えタンパク質を利用した
光学顕微鏡下での特定塩基配列検出技術の開発木村祐史^{*1}, 杵渕隆^{**}, 加畑博幸^{***}, 胡桃坂仁志^{****}, 鷺津正夫^{*}

(2004年8月23日受付; 2004年11月25日受理)

Detection of Specific Sequences under a Fluorescence Microscope Using
Homologous Recombination Protein, RecAYuji KIMURA^{*1}, Takashi KINEBUCHI^{**}, Hiroyuki KABATA^{***},Hitoshi KURUMIZAKA^{****} and Masao WASHIZU^{*}

(Received August 23, 2004; Accepted November 25, 2004)

Optical mapping is a powerful method to map target sequences on DNA and facilitates to order large insert clones covering a large DNA, such as the human genome. To expand applications of optical mapping, the RecA protein was utilized for locating sequences of interest. The RecA protein forms a functional complex with single-stranded DNA, binds to double-stranded DNA, and searches sequences on the DNA homologous to that of the single-stranded DNA. We combined sequence-probing function of RecA with a microelectrode system by which DNA is immobilized with a uniformly-stretched conformation of DNA molecules. This combination enabled us to visualize fluorescence-labeled DNA probes, which consisted of exonuclease-resected duplex DNA, bound along target DNA. From the analysis of the binding position of the DNA probes, we expect RecA can be used as a sequence-probing tool for optical mapping.

1. はじめに

近年になり、酵母、線虫、昆虫、ヒトを含んだ様々なモデル生物の遺伝子配列が決定されてきている¹⁾。配列解析の典型的な戦略は階層的ショットガン法である²⁾。階層的ショットガン法では、目的のゲノムを無作為に切断し、ゲノムDNA挿

入断片(100-200kb)をもつクローン(BAC クローン)のライブラリーを作成する。これらクローンをゲノムの元々の位置に配置し並べたあと、個々のクローンの塩基配列を無作為ショットガン法により決定し、最終的に全ゲノムの塩基配列が再構築される。

個々のクローンを再配置する作業は、STS 等のマーカ、あるいは制限酵素による制限部位をたよりに行われる。最終的に塩基配列決定に用いられるクローンは、挿入 DNA 断片ができるだけ長く、かつ挿入 DNA 断片同士の重複部位ができるだけ短くなるように選ばれる。この作業は、非常に多数のクローンによる被覆度(例えば、全ゲノム配列の 10 倍以上の被覆度)が必要とされるので、非常に時間のかかる作業となる³⁾。そのため、より迅速にクローンを再配置するために、オプティカルマッピングと呼ばれる技術が開発されてきた³⁻⁵⁾。

オプティカルマッピングにおいては、制限酵素の制限部位などの特定塩基配列を蛍光プローブにより検出する。蛍光プローブの位置を蛍光顕微鏡で観察することで、DNA 上の特定塩基配列の位置をすみやかに決定することができる。Schwartz らは蛍光標識 DNA 分子が制限酵素により分割される様子を蛍光顕微鏡下で観察し、分割位置から制限部位を DNA に沿って決定し、BAC クローンの制限酵素地図を作製

キーワード: オプティカルマッピング, 相同組換え, RecA, 静電伸長固定, DNA

^{*} 東京大学工学系研究科機械工学専攻 (113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

Department of Mechanical Engineering, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, JAPAN

^{**} 理化学研究所ゲノム科学総合研究センター (230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22)

Genomic Sciences Center, RIKEN, 1-7-22 Suehiro-chou, Yokohama, Kanagawa 230-0045, JAPAN

^{***} 京都大学医学研究科先端領域融合医学研究機構 (606-8501 京都府京都市左京区吉田近衛町)

The Horizontal Medical Research Organization, Kyoto University, Konoe-chou, Yoshida, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, JAPAN

^{****} 早稲田大学理工学部電気・情報生命工学科 (169-8555 東京都新宿区大久保 3-4-1)

School of Science and Engineering, Waseda University, 3-4-1 Okubo, Shinjyuku-ku, Tokyo 169-8555, JAPAN

¹ kimura@washizu.t.u-tokyo.ac.jp

することに成功した³⁾ Kabata らは蛍光標識した *EcoR* I の蛍光スポットの位置から *EcoR* I による制限部位を画像化した⁵⁾。これらの研究は光学顕微鏡と制限酵素の配列特異性の組み合わせが DNA 塩基配列解析に利用される地図作製において強力な道具として使用できることを示している。しかしながら、検出される配列は制限酵素の認識配列に限定され、さらに配列の長さも数ベースに限定される。そこで、我々は、オプティカルマッピングにおいて任意の塩基配列・塩基長を検出するために、相同組換えタンパク質 *RecA* を利用することにした。

RecA タンパク質は相同組換えにおいて重要な役割を果たすタンパク質である。*RecA* タンパク質は一本鎖 DNA と二本鎖 DNA が相同配列を持った領域で対合する反応を触媒する⁶⁾。この反応において *RecA* はまず ATP の存在下で一本鎖 DNA 周りにらせん状に重合することで一本鎖 DNA/*RecA* 複合体を形成する。この複合体中で、*RecA* は *RecA*:ヌクレオチド=1:3 の量比で一本鎖 DNA に結合する。次に、この一本鎖 DNA/*RecA* 複合体は二本鎖 DNA と相互作用し、一本鎖 DNA と二本鎖 DNA から相同性を検索する。最終的に、複合体は相補領域において対合する。検出したい配列を持った一本鎖 DNA を準備すれば、上述した *RecA* の相同領域認識機能を利用して、任意の配列を検出できるはずである。本研究では、*RecA* の相同領域認識機能をオプティカルマッピングに利用

するための基盤技術の開発をおこなったのでここに報告する。

2. DNA の静電伸長固定

オプティカルマッピングにおいては、検出したい塩基配列は、DNA に沿った蛍光プローブの位置として認識される。しかしながら、DNA 分子は水溶液中ではランダムコイル状に縮まって存在するため、DNA 分子に沿って蛍光プローブの位置を正確に決定することが難しい。そこで、正確なプローブの位置を決定するためには、DNA 分子を直線状に伸長する必要がある。本研究では、我々の研究室で過去に開発された図 1 に示されるようなマイクロ電極システムを使用し、DNA 分子を静電伸長固定した⁷⁾。このシステムにおいて、DNA 分子は静電配向により直線状に引き延ばされる。それから、DNA の一端が誘電泳動により電極端へ引き寄せられ、アルミ電極の表面に固定される。電極間の間隔は DNA の長さよりも短く作成してあるので、もう片方の端も隣り合った電極上へ固定される。電極間のガラスは、エッチングにより掘り下げてある。こうすることにより、静電伸長固定された DNA がガラス表面へ吸着することを防ぎ、同時に、タンパク質と DNA の相互作用を可能にする^{8,7)}。電極間の距離は 12-14 μm 、高さはおおよそ 2 μm であった。

図 1(b)にマイクロ電極システムを用いて、静電伸長固定さ

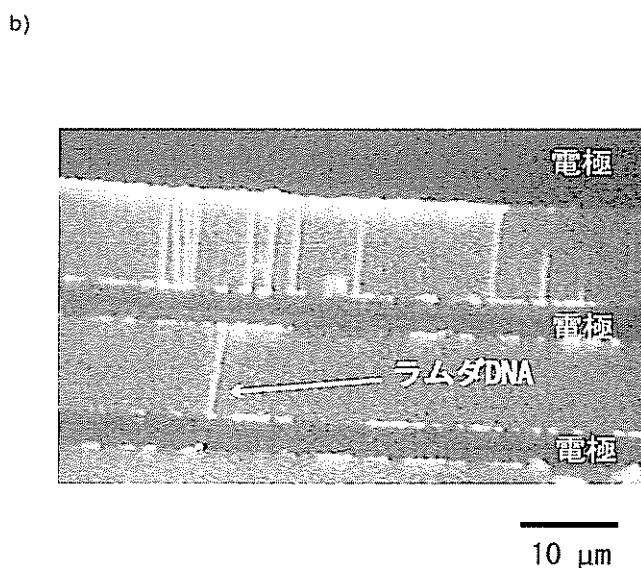
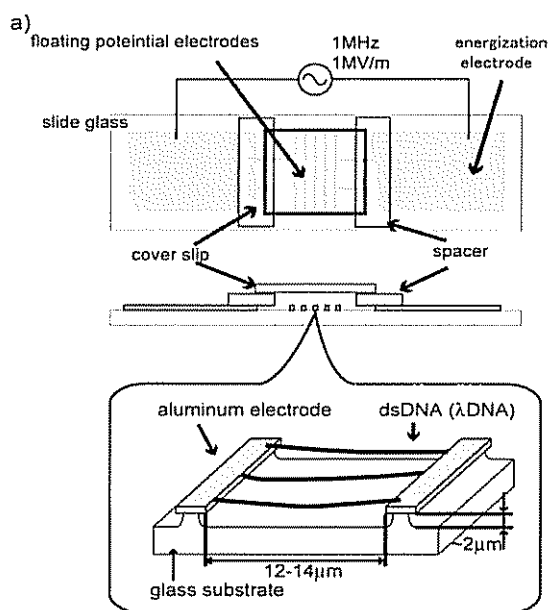


図 1 DNA の静電伸長固定

Fig 1 Electrostatic immobilization of DNA.

れた DNA の様子を示した 0.1 ng/μL のラムダ DNA, 5 μM YO-PRO-1, 1% 2-メルカプトエタノールを含んだ水溶液をスぺーサーとカバーガラスで構成されたチャンバーへ展開した後、電極を 1MHz, 1MV/m の交流電界により励起した。図 1(b)では十数本の DNA が電極間を橋渡ししているのが分かる。これら、伸長固定されたラムダ DNA を以下の実験において使用した。

3. プロープの蛍光染色

オプティカルマッピングを行うためには、プローブとなる分子、ここでは一本鎖 DNA/RecA 複合体を蛍光染色する必要がある。一本鎖 DNA や RecA を直接蛍光色素で標識する方法も考えられるが、RecA の機能を阻害せずに、かつ、通常の落射型蛍光顕微鏡で容易に観察できるほど明るく染色することは難しい。そこで、我々は一端に一本鎖領域を持った二重鎖 DNA を作成した(図 2)。このプローブの二本鎖領域は YO-PRO-1 や YOYO-1 などのインターカレーターにより容易に明るく蛍光標識することができ、一方で、一本鎖領域は RecA と反応することができる(図 2(a))。以下に、この二本鎖 DNA (DNA プロープ)の作成方法を記す(図 2(b))。ラムダ DNA (100 ng) を制限酵素 *Hind* III (100 units)により消化した後、Exonuclease III により 23°C で 1 分間消化した。反応を 20 mM の EDTA により停止させた後、Exonuclease III を 65°C, 20 分により不活化した。Exonuclease III は二本鎖 DNA を末端より 3'

→5'方向に消化し、一本鎖からなる 5'突出末端を作り出す。一本鎖領域の長さを見積もるために、一本鎖部分を選択的に分解する消化酵素 Mung Bean Nuclease により一本鎖領域を消化した。残った二本鎖領域の大きさを電気泳動により決定することで分解された一本鎖領域の大きさを見積もると、一本鎖領域の大きさはおよそ 100 塩基であった。つづいて、制限酵素 *Nru* I により 5'突出末端と反対側に平滑末端を作り出した。最後に、電気泳動により分離されたおよそ 18kbp のバンドを切り出し・精製することで目的の DNA プロープを得た。結果として得られた DNA プロープは、片端に 5'突出末端を持ち、反対側に平滑末端を持つ。二本鎖領域の長さはおおよそ 18 k 塩基対、一本鎖領域の長さはおおよそ 100 塩基であった。一本鎖領域の配列は Exonuclease III の反応の進行度と *Hind* III の制限部位で決まり、ラムダ DNA の中心付近(およそ 23030 bp から 23130 bp)と相補的である。

4. 蛍光顕微鏡下での DNA プロープの観察

4. 1 DNA プロープの拡散運動

DNA プロープ(0.1 ng/μL)と RecA(6 μM)を 23°C, 5 分インキュベートし、RecA を DNA プロープの一本鎖領域へ重合させた。インキュベートはバッファー A 中で行った(バッファー A: 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM ATP, 10 mM phosphocreatine, 37.5 μg/mL creatine phosphokinase, 0.1 mg/mL BSA, 5 mM DTT, 1 mM MgCl₂)。それから、1 mM のスぺルミジンを加え、サンプルをチャンバーへ展開した(図 3(a))。DNA プロープは YO-PRO-1 あるいは YOYO-1 により染色した。チャンバーに

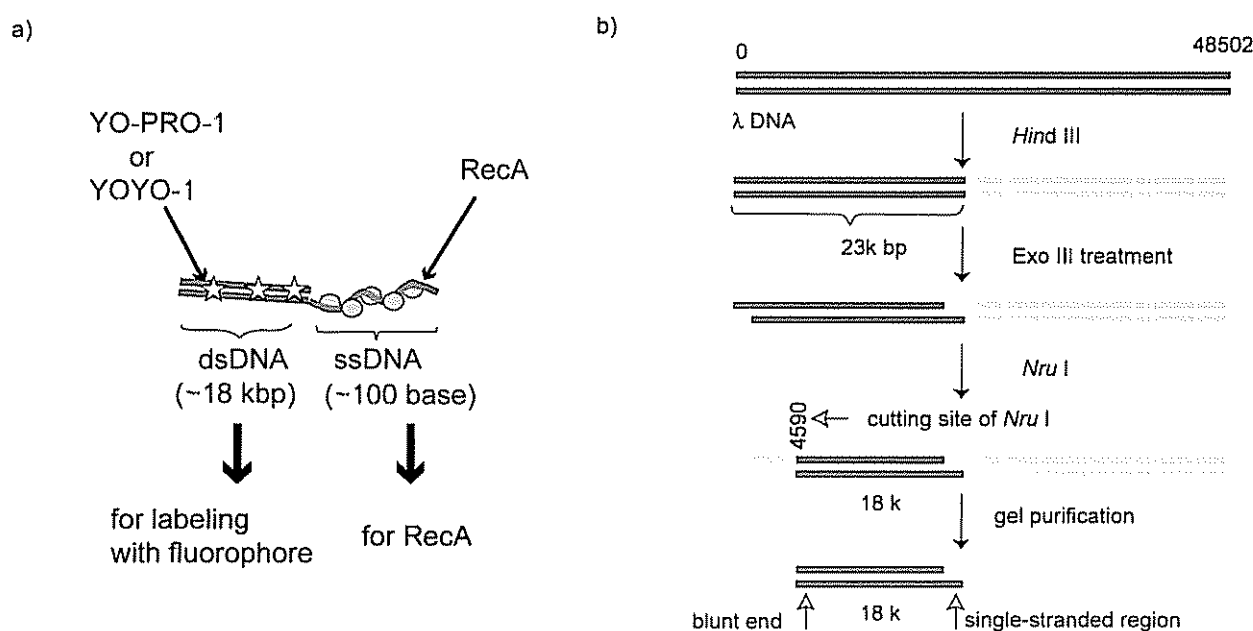
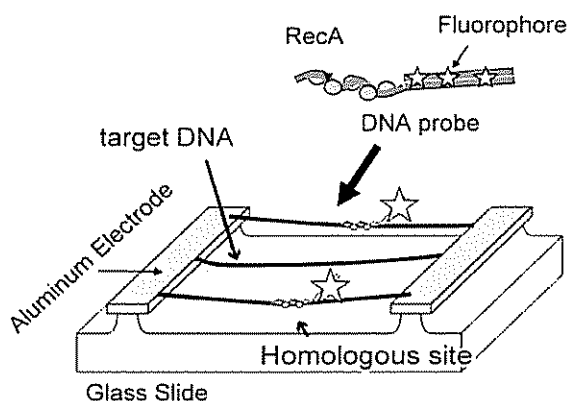


図2 DNA プロープ
Fig.2 DNA probe

は、あらかじめターゲットとなる DNA、つまりラムダ DNA を静電伸長固定させておいた。観察は倒立顕微鏡(IX71), SIT カメラを用い、23℃で行った。

すると、ラムダ DNA 上に結合している DNA プローブが観察され、一部の DNA プローブはラムダ DNA 上を前後に拡散するようにすべりながら運動していた (図 3(b))。また、ラムダ DNA 上で運動しているプローブの割合、つまり、ラムダ DNA に結合していた DNA プローブに対する運動していた DNA プローブの割合、つまり、動いていたプローブ数/ DNA 上のプローブ数は RecA が溶液中に存在することにより増加した(表 1, 図 4)。RecA がどのようにして相同領域を検索するかは未だに分かっていないが、図 3 及び図 4 の結果は一本鎖 DNA/RecA 複合体がターゲットとなる DNA 上を運動することにより相同領域を見つけ出すことを示唆している。したがって、この DNA プローブの運動が相同領域を検索している最中だとすれば、運動に続いて相同領域へ停止する反応が見られるはずである。ところが、これらの運動は、数分観察していても停止する様子は見られなかった。停止しない原因として考えられるのは、DNA プローブを染色するのに使用している YO-PRO-1 や YOYO-1 などの蛍光色素である。これら蛍光色素はターゲットとなるラムダ DNA にもインターカレートし、結合する。したがって、蛍光色素が相同領域への対合反応を阻害している可能性は十分考えられる。生化学的なアッセイによりこれら色素の影響を検討することが必要と考えられる。

a)



4. 2 DNA プローブの結合位置

上述したように、ラムダ DNA 上を運動している DNA プローブが観察される一方で、観察視野に入った時点ですでに停止している DNA プローブも多数見られた。これら停止していた DNA プローブは、観察視野に入る前に、インターカレートに阻害されることなく、運動が停止したものだとすれば、その停止位置は DNA プローブの一本鎖領域の配列を反映した位置であると考えられる。そこで、ラムダ DNA 上のどの位置に DNA プローブが結合しているかを確認するため、DNA プローブの数をラムダ DNA 上に沿って数え、ヒストグラムにした(図 5)。図 5 の横軸は DNA に沿った DNA プローブの位置を%で表している。ヒストグラムは 3 つのピークを持っていた。50%付近のピークは DNA プローブの一本鎖領域とラムダ DNA の相同性を反映していると思われる。今後、ラムダ DNA の別の場所、例えば 30%の領域と相同性を持つ DNA プローブを作成し、50%のピークが相同性を反映した別の場所に移動するかを確認する予定である。

残り二つのピーク(20%と 80%)は非特異的な結合により生じると考えている。もし、DNA プローブが検出しようとしている目的配列(相同部位)の近くから相互作用を開始した場合には、拡散運動により相同部位にまでたどり着ける。したがって、ヒストグラムにおいて相同部位のまわりに山と谷ができることになる。しかし、DNA プローブが相同部位から離れた位置から拡散を開始した場合には、プローブは相同部位ま

b)

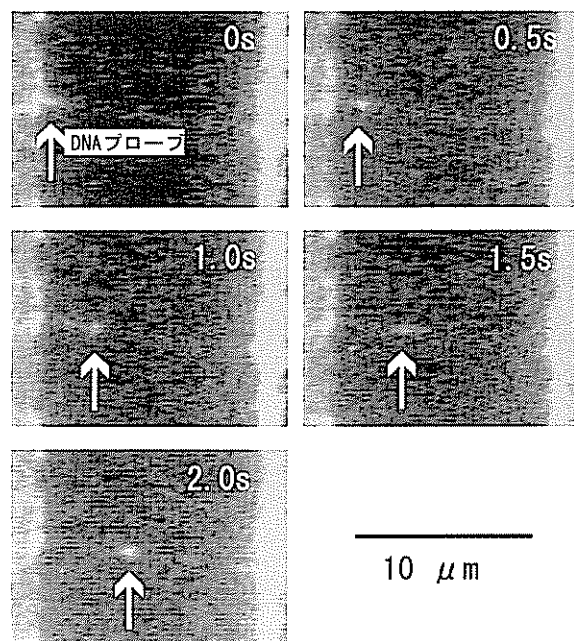


図 3 DNA プローブのラムダ DNA 上での運動

Fig 3 sliding motions of DNA probe along lambda DNA

表1 運動していた DNA プローブの割合

Table 1 Fraction of DNA probe moving along lambda DNA

	個数		割合 (%)
	停止	運動	
-Mg	364	2	0.55
+Mg	57	2	3.4
+Mg, +spermidine	183	3	1.6
+Mg, +spermidine, +RecA	25	41	62
+Mg, RecA,	23	21	48

*100%=DNA 上のプローブ = 停止していたプローブ
+運動していたプローブ

でたどり着けず、途中のどこかで止まるため、図5のように10%, 80%の位置に多数のDNAプローブが見られることになる。ラムダDNAの末端に近い場所から相互作用を開始したDNAプローブは、アルミ電極に吸着してしまうため、末端付近のプローブの数は少なくなると考えられる。以上の非特異結合は使用している蛍光色素などの多価カチオンにより引き起こされうる。今後、ナトリウムイオンなどの一価のカチオン等により、非特異結合の力を弱めることが必要であると考えている。

i. 結論

本研究では、DNAの静電伸長固定技術とRecAの配列検索機能を組み合わせ、任意の配列・任意の配列長を検出するオプティカルマッピングの基盤技術の開発を行った。蛍光プローブとして、一端に一本鎖領域を持つ二本鎖DNA(DNAプローブ)を作成し、DNAプローブが、ターゲットとして用いたラムダDNA上に結合、さらにはRecA依存的に拡散運動する様子を観察することができた。その運動は観察視野内で相同部立へ停止することはなかったが、すでに停止しているDNAプローブの位置のヒストグラムを作成すると、相同性を反映した位置に、ピークがあらわれた。ヒストグラムは非特異的な結合に起因すると思われるピークも持っていたが、今後、この非特異的な結合の力を弱めることで、RecAを利用したオプティカルマッピングが可能になると考えられる。

黒澤修研究員(東京大学/アドバンス)には本研究に対して有

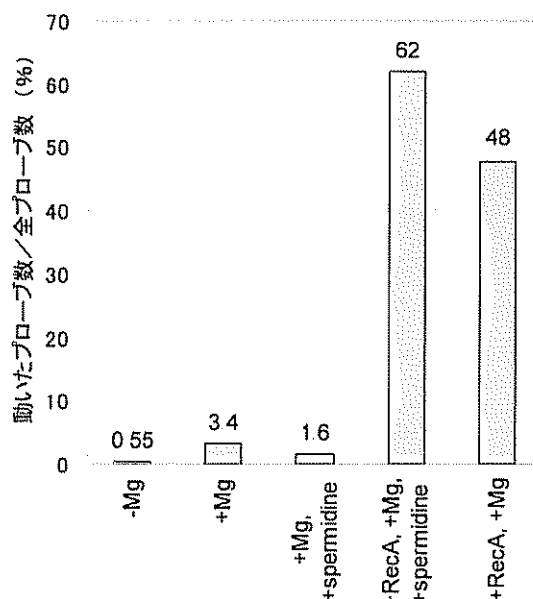


図4 運動していた DNA プローブの割合

Fig.4 Fraction of DNA probe moving along lambda DNA.

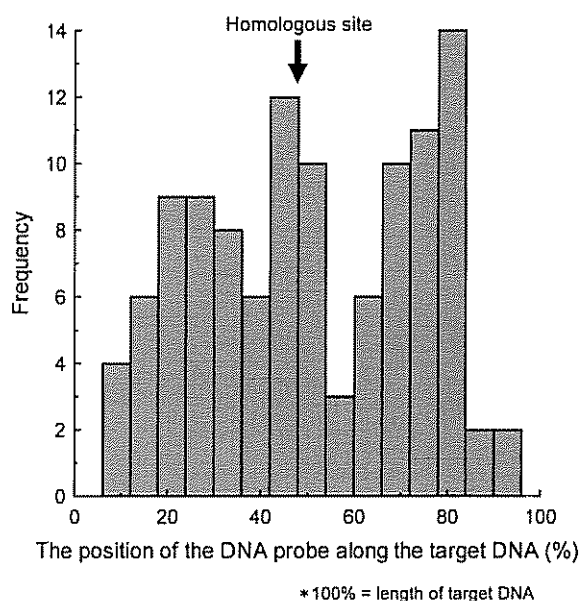


図5 DNA プローブの結合位置

Fig.5 The binding position of the DNA probe.

益なご助言をいただきました。ここに謝意を表します。また、本研究は生研機構新事業創出研究開発事業「遺伝子の分子レベル操作技術の開発」の助成を受けて行われたものです。ここに謝意を表します

参考文献

- 1) E. D. Green: Nat Rev Genet, 2 (2001) 573
- 2) The International Human Genome Mapping Consortium:

- Nature, **409** (2000) 934
- 3) W. Cai, J. Jing, B. Irvin, L. Ohler, E. Rose, H. Shizuya, U. J. Kim, M. Simon, T. Anantharaman, B. Mishra, D. C. Schwartz: Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **95** (1998) 3390
 - 4) H. Oana, M. Ueda, M. Washizu: Biochem Biophys Res Commun., **265** (1999) 140
 - 5) H. Kabata, W. Okada and M. Washizu: Jpn J. Appl. Phys., **39** (2000) 7164
 - 6) T. Shibata, T. Nishinaka, T. Mikawa, H. Aihara, H. Kurumizaka, S. Yokoyama and Y. Ito: Proc. Natl. Acad. Sci. U S A., **98** (2001) 8425
 - 7) T. Yamamoto, O. Kurosawa, H. kabata, N. Shimamoto and M. Washizu: IEEE Trans. Ind. Applicant., **36** (2000) 1010