

3PA129

Study on the correlation of structure and mobility of DNAs with coordinated use of DNA-melting-simulation and TGGE
T. Hasegawa, O.M. Biyani, K. Nishigaki
(Faculty of Engineering, Saitama University)

We have already reported that by combining the two sources of information, that from computer simulation of DNA-melting and that obtained from TGGE, we can extract the knowledge on the structure-mobility relationship of DNAs (This conference, Hasegawa and Nishigaki (1998)).

We have further advanced this study using DNAs of 500 bp extracted from the genomic DNA of *E. coli*. In prior to TGGE experiments, we theoretically selected DNA fragments which melt in a simple mode from an edge first ('edge-melt') or from the mid-region first ('mid-melt') by use of a DNA melting simulation program (*Poland-H*) together with a sequence-retrieving program (*segret-H*). Then, the DNAs were collected by specific PCR using appropriate primers and subjected to TGGE (Temperature Gradient Gel Electrophoresis). Eventually, the fact that the initial melting of double stranded DNAs, especially for the edge-melt type, induces a highly sensitive retardation in gel electrophoresis was observed. More detailed relationships between structure and mobility were obtained.

One intriguing phenomenon observed is that some of the DNAs showed an unusual behavior in TGGE at the post-dissociation region, called 'bounce'. We have a tentative explanation about this that re-structuring in the denatured single-stranded DNA is occurring during the strand-dissociation process, which would be demonstrated. Above mentioned will be dealt in detail.

T. Hasegawa, O.M. Biyani, K. Nishigaki : Study on the correlation of structure and mobility of DNAs with coordinated use of DNA-melting-simulation and TGGE

3PA131

DNA-制限酵素間の、イオン相互作用変化の活性に与える影響
○座古 保、神谷 典穂、喜多山 篤、
上田 宏、長棟 輝行 (東大・工・化学生命)

制限酵素における、DNAとのイオン相互作用の影響を調べるために、蛋白質-DNA相互作用部位にある Asp 残基を、Ala, Lys に置換し、活性に与える影響を調べた。具体的には、制限酵素 EcoRI の Asp59 を、Kunkel 法により Ala (D59A), Lys (D59K) に変えた改変体を作成し、 λ DNA 切断活性、oligo DNA に対する切断活性、結合活性を調べた。

λ DNA 切断活性については、D59A は野生型の約半分、D59K は約 25% であった。oligo DNA に対する切断活性は FRET 現象を用いて測定した。12bp の oligo DNA のそれぞれの 5' 末端にそれぞれ FITC, RITC を結合させ、制限酵素による切断時に観察される、490 nm の励起光に対する、515 nm での蛍光の増大により基質切断速度を評価した。それによると、Km 値はどちらの改変体も野生型とほとんど変わらず、kcat 値は D59A は野生型と同程度、D59K は約半分であった。

oligo DNA に対する結合活性は SPR センサーを用いて測定した。上記の oligo DNA と同配列のものをセンサーチップに固定化し、蛋白質溶液を流したときのシグナル変化により結合定数を評価した。それによると、KA 値は D59A は野生型の約 2 倍、D59K は約 4 倍であった。この実験結果は、酸性アミノ酸を中性、又は塩基性のアミノ酸に置換したことにより、制限酵素 EcoRI が DNA から解離しにくくなったことを示唆している。これは、DNA が負に帯電していることを考え合わせると、合理的な結果である。現在は、他の酸性アミノ酸の改変体が同様の結果を示すかどうかを調べている。

Tamotsu Zako, Noriho Kamiya, Atsushi Kitayama, Hiroshi Ueda, Teruyuki Nagamune: The influence of changes in ionic interaction between endonuclease and DNA on the cleavage and binding activity

3PA130

制癌剤 Chromomycin A₃-Mg²⁺ 錯体と DNA の相互作用
○岡田良成、外山聡、竹内英夫 (東北大院・薬)

Chromomycin A₃ (CHR) は *Streptomyces griseus* が産生する抗癌性抗生物質である。CHR は、Mg²⁺ と錯体を形成すると二本鎖 DNA に結合し、転写を阻害する。CHR-Mg²⁺ 錯体には、CHR:Mg²⁺ = 1:1 (complex 1) と CHR:Mg²⁺ = 2:1 (complex 2) の二種類が存在する。NMR により、complex 2 は副溝側から入り込み、CHR の水酸基がグアニンのアミノ基や N(3) 位と水素結合すると報告されている。しかし、complex 1 については、CD スペクトルから、complex 2 とは作用様式が異なることが示唆されているにすぎない。本研究では紫外共鳴ラマン (UVRR) 分光法を用いて、2 種の CHR-Mg²⁺ 錯体の DNA との相互作用様式を調べた。

仔牛胸腺 DNA に complex 2 が結合すると、1577 cm⁻¹ のバンドの強度増大と 1490 cm⁻¹ バンドの低波数シフトおよび強度減少が観測された。このスペクトル変化を解析するため、グアニン誘導体を水素結合能が異なる溶媒に溶かし、UVRR スペクトルの溶媒効果を調べた。その結果、複合体形成に伴う 1577 cm⁻¹ バンドの変化は、グアニン N(3) 位の水素結合が強くなることに、1490 cm⁻¹ バンドの変化は、グアニン C(6)=O 位の水素結合が弱くなることに由来することが解った。一方、complex 1 が DNA に結合すると、1490 cm⁻¹ バンドは、complex 2 結合時と同様の変化を示したが、1577 cm⁻¹ バンドの変化は観測されなかった。以上のことから、complex 2 は副溝側、主溝側の両方から DNA と相互作用するが、complex 1 は主溝側からのみ相互作用すると思われる。complex 2 の結合様式が NMR の結果と異なるのは、用いた DNA の塩基配列や DNA と CHR の濃度比の違いによると考えられるため、これらについて現在検討中である。

Y. Okada, A. Toyama, H. Takeuchi: Interactions of Mg²⁺ Complexes of Antitumor Antibiotic Chromomycin A₃ with DNA

3PA132

DNA 分子等温増幅法における増幅機構の進化
○山本裕二、小宮昇一、伏見謙 (埼玉大・工)

転写酵素と逆転写酵素を組み合わせた DNA 分子の等温増幅法である 3SR (Self-Sustained Sequence Replication) の継代植継ぎ実験により、自然淘汰型進化リアクターをエミュレートした。

この DNA 進化リアクターに、プロモータプライマーと逆転写プライマーとの領域間に 60mer の 4塩基ランダム配列を導入した DNA プールを投入した。この実験で進化してきた DNA 分子の配列決定した結果、3SR 増幅機構とは異なった増幅機構で増幅していることが判った。その増幅機構は、逆転写プライマーのみで、両鎖にプロモータを含む二本鎖 DNA を増幅する CATCH (Cooperative Amplification of Templates by Cross-Hybridization) 増幅機構 (以上、前回に発表済) と、同様に逆転写プライマーのみで、プロモータを含むヘアピン一本鎖 DNA を増幅する RNA-Z 様増幅機構であった。

このような進化の分子機構を解明する研究を行った。

この進化してきた 2 つの増幅機構を示す DNA は、ホモロジーが非常に高い DNA であり、リアクター中の逆転写 DNA 鎖の濃度によって、その増幅機構を変えたと考えられる。逆転写 DNA 鎖の濃度が高いときは、その DNA 同士のホモダイマーのスタガードハイブリッドによるホモダイマーを生じ、低いときは、セルフアニーリングする。すると次に、逆転写酵素による DNA 伸長反応によって、ホモダイマーでは、両鎖にプロモータを含む二本鎖 DNA を作り、セルフアニーリングでは、プロモータを含むヘアピン DNA を作る と解釈できる。

2 つの逆転写プライマーを用いた CATCH 増幅機構を用いた継代植継ぎ実験を行った。この実験で進化してきた配列は、2 種類の RNA-Z 様増幅機構を示すものと、1 種類の CATCH 増幅機構を示すものであった。RNA-Z 様の配列は、初期に投入した CATCH のテンプレート DNA の一部と、それぞれの逆転写プライマーの配列をプロモータ上流にもつものであった。CATCH 増幅機構の配列は、この RNA-Z 様増幅機構の配列から増幅機構に進化してきたと解釈できるものであった。

Y. Yamamoto, S. Komiya, Y. Husimi: Evolution of amplification mechanism in DNA molecules using isothermal amplification.