

相同遺伝子組み換えにおける DNA 塩基配列高速検索のメカニズムの解明

黒田敬史

人間の体内では、紫外線や活性酸素などの要因によってDNAが損傷した際に遺伝子の相同組換え修復を行う。その際にRecAという相同組換えタンパクが重要な役割を持っている。相同組換えを行う為には、損傷した塩基配列と同じ塩基配列を持つ相同領域を探し出す必要がある。しかし、塩基配列は非常に膨大であり、ヒトであれば30億塩基対であり、長さにすれば約1 mとなる。この中から数ミクロンの長さの特定の相同領域を探し出すことは非常に難しい。RecAは一本鎖DNA (ssDNA) に結合し、DNA上を滑るように移動しながら相同領域を探しているというモデルが1つには考えられている。そこで本研究ではRecAの挙動を観察し、検索のメカニズムを解明することを目的とする。

静電伸長法により伸長固定した二本鎖DNA (λ DNA) 上にRecA/ssDNA複合体に蛍光色素Qdotを結合させた蛍光プローブを導入し、蛍光観察を行った。

観察した結果蛍光プローブが伸長固定されたDNA上を移動している様子が確認できた。さらに、DNAは負電荷に帯電しているため、溶液中の陽イオンの存在が、上記で見られた伸長固定DNA上の蛍光プローブの相互作用に影響を与える要素であると考えた。そこで、溶液中の陽イオンの種類と濃度について検証した。まず、最初に含まれていた3価陽イオン (spermidine) を2価陽イオン ($MgCl_2$) に変更して観察を行った。結果、spermidineを用いた場合より蛍光プローブが活発に動く様子が見られた。また、 $MgCl_2$ の濃度を1 mMから10 mMに変更して観察を行った結果、伸長固定した λ DNAが凝集し、その上に全体的に蛍光プローブが吸着している様子が確認できた。

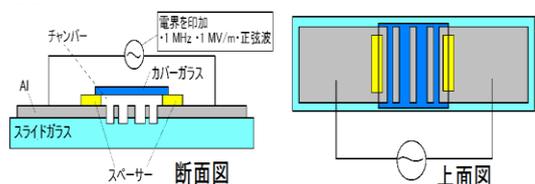


Fig.1 実験装置

チャンバー部分に λ DNA溶液を入れ、電界をかけることによって λ DNAが電極間で直線状に伸長され、固定される。

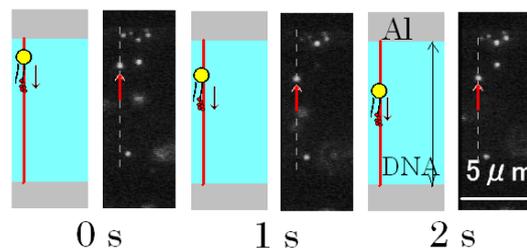


Fig.3 蛍光プローブの移動の様子
灰色の破線で示したのが伸長固定したDNA、赤い矢印で示した点が移動している蛍光プローブ。DNA上を移動している様子が確認できた。

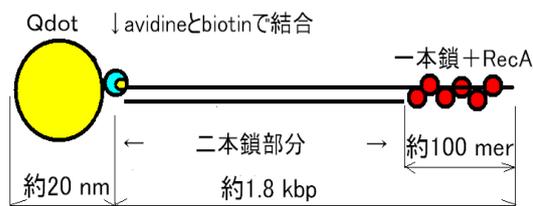


Fig.2 蛍光プローブの構造

蛍光色素QdotによってRecA/ssDNA複合体が可視化され、 λ DNAと相互作用する様子を観察することができる。