

核酸結合タンパク質 gp32 の構造変化に対する塩の影響

日大生産工(院) ○安田弥奈

日大生産工 Ngan Thi Kim Pham 吉宗一晃

京都女子大 平川由紀 門間敬子

京都大学 滝田禎亮 保川清

1. まえがき

T4ファージ由来の一本鎖DNA結合タンパク質gp32は、大腸菌のT4バクテリオファージ感染時のDNA複製に必要である。gp32はT4ファージの複製過程で一本鎖DNA(ssDNA)に優先的に結合し、二次構造を不安定化することで、DNAポリメラーゼなどのDNA複製に関わるタンパク質の機能を促進する。¹⁻³⁾ このような特徴を持つことから、gp32は、DNA複製、組換え、および修復において重要な役割を果たす。

gp32は等温PCRの一種であるリコンビナーゼポリメラーゼ増幅(RPA)にも利用され、反応中に形成されるssDNAを安定化させる役割を担う。

RPAは繰り返しの温度変化が必要なポリメラーゼ連鎖反応(PCR)とは異なり、リコンビナーゼの作用によって、37～42℃程度の等温条件で反応が進行する。そのため、PCRで必要とされるサーマルサイクラーがRPAでは不要で、さらに、20分程度で増幅DNA試料が得られるため、PCRに代わる核酸増幅技術として注目されている。

gp32は、コアドメイン、N末端ドメインおよびC末端ドメインで構成される。コアドメインには正電荷の溝が存在し、そこがDNA結合部位となり、6～7ヌクレオチド長のポリヌクレオチドと結合する。さらに、15ヌクレオチド長のポリヌクレオチドと結合する際には、2つのgp32モノマーが結合に関与する。⁴⁻⁵⁾ コアドメインは、芳香族側鎖とssDNAとの間に疎水性相互作用を形成することによって、gp32のssDNA結合特性に寄与している。C末端ドメインは負に帯電しており、コアドメインのDNA結合部位を部分的に覆っており、ssDNAが結合するとC末端ドメインの向きが変化する。⁶⁾ C末端ドメインとN末端ドメインは、gp32分子間での協同的な相互作用に寄与し、ssDNA結合を強化する。⁷⁻¹⁰⁾ gp32は二本鎖DNA(dsDNA)にも弱い結合親和性を示すが協同性はなく、dsDNAに沿って拡散し、ssDNAに迅速に結合することが仮定されている。¹¹⁾

塩はgp32の結合親和性と構造に影響を与える。¹²⁻¹⁶⁾ 塩のイオンは、ssDNAとの結合に関

して、DNA結合部位であるコアドメインの正電荷の溝におけるssDNAとの結合と競合することで、gp32のssDNAへの親和性を減少させる。また、塩のイオンはコアドメインとC末端ドメインとの間のイオン結合を破壊することで、C末端ドメインの立体構造を変化させる。C末端ドメインのssDNAとの結合を抑制する機能は、NaClが0.2 M以上の高塩濃度で減少する。¹¹⁾

当研究室の先行研究により、gp32のDNA結合によって生じる立体構造の変化は、gp32と抗gp32抗体の結合性にも影響を及ぼすことが示唆されている。モデルDNAとしてλDNAを用い、gp32と抗gp32モノクローナル抗体MGP45の結合性を酵素結合免疫吸着測定法(ELISA)によって評価したところ、λDNA濃度が高くなるにつれて吸光度が低下し、gp32とMGP45の結合性が低下していることが分かった。(Fig. 1) このことから、gp32のdsDNA結合による構造変化は、gp32と抗gp32抗体の結合性を低下させると考えられる。また、この結果より、DNA濃度に依存したgp32と抗gp32抗体の結合性の変化から、試料溶液中のDNAを抗体によって間接的に検出できることが示唆された。

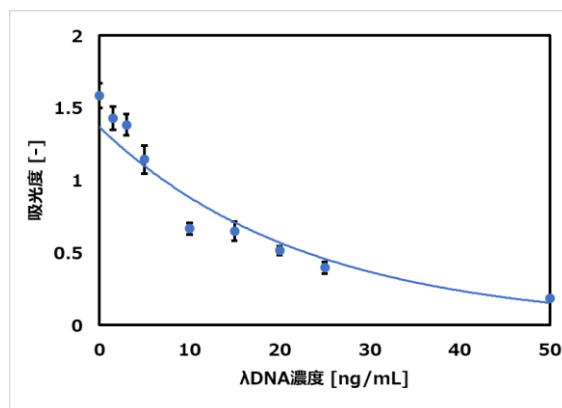


Fig. 1 gp32とMGP45を用いてのELISAによるDNA検出

タンパク質とその抗体によりDNAが検出可能であることによって、イムノクロマトグラフィーへの応用が可能である。本研究では、RPAとイムノクロマトグラフィーを組み合わせ、

Effect of Salt on the Conformational Change of Nucleic Acid-binding Protein Gp32

YASUDA Mina, Ngan Thi Kim PHAM, HIRAKWA Yuki, TAKITA Teisuke,
MONMA Keiko, YASUKAWA Kiyoshi and YOSHIMUNE Kazuaki

高感度、迅速、簡便な新規DNA検出技術の開発を目指している。

gp32は塩によっても立体構造が変化することが知られている。したがって、塩の存在によりgp32と抗gp32抗体の結合性に变化が生じ、抗体によるDNAの検出に影響を及ぼす可能性がある。測定対象となる増幅DNA試料には塩が含まれることが多く、塩の存在がgp32とその抗体の結合性に大きく影響する場合、塩が本DNA測定系の阻害の一因となる可能性が高い。また、先行研究によって、Na⁺濃度が0.2 Mより濃度が高い場合、C末端ドメインの立体構造は変化することが示唆されている。¹¹⁾ したがって、本研究ではNaClを基準の塩として選択した様々な塩を用いて、本DNA測定系に塩が及ぼす影響について調査したので、これを報告する。

2. 実験方法および測定方法

ELISA は、試料溶液中の目的抗原を特異抗体で補足するとともに、酵素反応を利用して検出し、定量する方法である。

本実験では、まず、gp32 を pH7.0 の 10 mM リン酸カリウム緩衝液(KPB)と、0.1 % triton X-100 の混合溶液によって 3.0 µg/mL に希釈し、懸濁し、これを gp32 混合液とした。その後、目的濃度になるように調製した塩水溶液に、終濃度が 0.15 µg/mL になるように gp32 混合液を添加、懸濁した。さらに、λDNA を終濃度が 50 ng/mL となるように添加し、懸濁した試料溶液を ELISA に用い、gp32 と抗 gp32 モノクローナル抗体 MGP45 の結合性を吸光度から評価した。

3. 実験結果および考察

gp32 とモノクローナル抗体MGP45の結合性をELISAで評価したところ、100 mMのNaCl添加により、λDNAが50 ng/mL含まれていても、gp32とMGP45の結合性は向上した。このことから、gp32のdsDNA結合による構造変化はNaClによって抑制されたと考えられる。また、この構造変化の抑制の程度はNaCl濃度に依存して向上した。

さらに、NaClのアニオンを硝酸イオンにしたNaNO₃、カチオンをカリウムイオンとしたKClを使用して、dsDNA結合によるgp32の構造変化の抑制効果をNaClのものと比較した。その結果、gp32とMGP45の結合性の向上は、NaClを用いた場合と同様に塩濃度に依存しており、塩の種類による顕著な違いは観察されな

かった。このことから、gp32のdsDNA結合による構造変化の抑制は、イオンの価数に依存し、イオンの大きさであるイオン半径には依存しないことが示唆された。

4. まとめ

本研究では、gp32と抗gp32抗体を利用したDNA検出方法に対して、塩が及ぼす影響についてを調査した。その結果、調査に用いた塩についてはすべて、gp32のdsDNA結合による構造変化を抑制する可能性が示唆された。また、抑制の程度は、イオンの価数に依存し、イオン半径には依存しないと考えられる。

本DNA測定系において、測定対象となる増幅DNA試料には塩が含まれていることが多い。そのため、今後、塩の影響を受けにくい一本鎖DNA結合タンパク質についても検討していく必要があると考える。

参考文献

- 1) Juma, K., *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun.*, **2021**, *567*, 195-200
- 2) Jose, D., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *43(19)*, 9291-9305
- 3) Mueser, T., *et al.*, *Virol J.*, **2010**, *7*, 359
- 4) Phelps, C., *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **2017**, *114(18)*, E3612-3621
- 5) Shamoo, Y., *et al.*, *Nature*, **1995**, *376(6538)*, 362-366
- 6) Jose, D., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **2015**, *43(19)*, 9276-9290
- 7) Cashen, B., *et al.*, *J Mol Biol.*, **2024**, *436(9)*, 168544
- 8) Cashen, B., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **2023**, *51(16)*, 8587-8605.
- 9) Shokri, L., *et al.*, *Phys Biol.*, **2009**, *6(2)*, 025002
- 10) Shokri, L., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **2008**, *36(17)*, 5668-5677
- 11) Pant, K., *J Mol Biol.*, **2005**, *349(2)*, 317-330
- 12) Schiopu, I., *et al.*, *RSC Adv.*, **2024**, *14(8)*, 5449-5460
- 13) Pant, K., *et al.*, *PLoS One*, **2018**, *13(4)*, e0194357
- 14) Lee, W., *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, **2016**, *44(22)*, 10691-10710
- 15) Rouzina, I., *et al.*, *Biophys J.*, **2005**, *89(3)*, 1941-1956
- 16) Pant, K., *et al.*, *J Mol Biol.*, **2003**, *327(3)*, 571-578