

# 【施設利用者の研究紹介】 DNA-タンパク質クロスリンク損傷の転写阻害効果

理学研究科 数理分子生命理学専攻 遺伝子化学研究室  
中野 敏彰

DNA-タンパク質クロスリンク (DPC) は、DNA にタンパク質が不可逆的に共有結合したゲノム損傷であり、変異原物質、抗がん剤、放射線などにより誘発される。DPC は、従来の bulky な損傷と比べ非常に嵩高く、superbulky な損傷である。しかしこれまでに、DPC の転写に対する影響は明らかになっていない。そこで、本研究では、試験管内転写反応系を用い、DPC の転写に対する影響を検討した。

## 実験方法

**鋳型 DNA と転写反応**：転写反応の鋳型には、T7 プロモーターを含む 130 bp の DNA を用いた。DPC は、oxanine とタンパク質のクロスリンクを介して転写鎖および非転写鎖に導入した。これらの鋳型と T7 RNA polymerase (RNAP) を用いて転写反応を行い、転写産物を変性 PAGE で分析した。

**転写エラーの解析**：T7 RNAP の転写産物を変性 PAGE で分離した。全長まで伸長された転写産物 (runoff 生成物) をゲルから精製し、RT-PCR で DNA に逆転写した。この DNA をプラスミドにライゲーションし、大腸菌に導入後、得られた単一コロニーを培養しプラスミドを抽出した。プラスミドのシーケンスを行い、runoff 生成物の変異を調べた。

## 結果・考察

T7 RNAP を用いて転写反応を行い、転写産物を変性 PAGE で分析した。転写鎖に DPC を含む鋳型 (TS-DPC) では、DPC 部位で RNA 合成が停止した強い生成物バンドに加え、弱い runoff 転写産物のバンドが認められた。runoff 転写産物の生成量はクロスリンクタンパク質のサイズ増加とともに減少した (Fig. 1A)。bulky な損傷のモデルとして導入した FLU も転写を阻害したが、阻害効果は DPC より弱かった。一方、非転写鎖に DPC を含む鋳型では、損傷部位で RNA 合成が停止したバンドは認められなかった。

TS-DPC で得られた runoff 転写産物の塩基配列を解析した結果、DPC 部位だけでなく、DPC 上流側の損傷のない部位で高頻度

に変異が認められた (Fig. 1B)。DPC 部位以外に変異をもつ転写産物の割合は 40~75% であった。この結果から、TS-DPC は損傷のない部位で転写エラーを誘発することが明らかとなった。DNA-RNAP 複合体の gel shift および footprinting 解析から、TS-DPC では、鋳型に 1~3 分子の T7 RNAP が結合しており、高頻度に変異が認められた領域には、DPC で停止した RNAP と後続の RNAP が停止していることが示された。この結果から、これら二つの RNAP が損傷非依存的に転写エラーを起こしていると考えた。

従来の DNA 損傷は、RNAP の活性部位に達し、直接転写阻害や転写エラーを引き起こす。一方、DPC は RNAP の活性部位に到達する前に、DNA entry site で RNAP の進行を阻害する。DPC により idling 状態になった RNAP は、損傷非依存的に転写エラーを起こす。さらに、後続の RNAP も停止し、同様な機構で転写エラーが起こると考えられる。

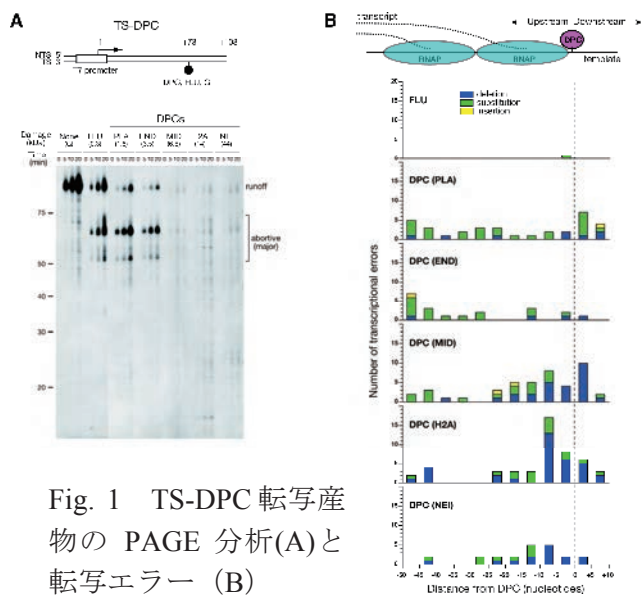


Fig. 1 TS-DPC 転写産物の PAGE 分析(A)と転写エラー (B)