

ジエステル結合を切断するが、ピリミジンヌクレオチドの近くを優先的に切断する傾向がある。その際、 $Mg^{2+}$ 、 $Ca^{2+}$ を活性化因子として要求する。

## 2

## 方法

### 準備するもの

10 × DNase 反応バッファー：Tris-HCl (pH 7.9) 200 mM,  $MgCl_2$  30 mM,  $CaCl_2$  50 mM, NaCl (またはKCl) 1 M, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, Bovine serum albumin 500  $\mu g/ml$ 。本稿に示した反応液の組成は、われわれが大腸菌の転写因子の解析の場合に用いているもので、 $CaCl_2$ 以外は *in vitro* 転写反応と同じ条件である。 $CaCl_2$  は DNase 反応直前に加えてもよい。研究対象によって、塩濃度等は変動しうるので、条件の検討を行うよい。  
DNase：われわれは Sigma または Worthington の DNase を使用している。凍結乾燥品を 0.15 M NaCl に溶かし、5 mg/ml に調製したものを数本に分注して -20°で保存する。これを 0.15M NaCl で希釈して 1mg/ml として 1カ月程度の間に使用する。実際に反応に使用するときは、使用直前に精製水で 10 ~ 20  $\mu g/ml$  に希釈して用いる。これは実験ごとに調製する。  
反応停止液：酢酸 Na (pH 5.2) 1.5 M, EDTA 20 mM, tRNA 100  $\mu g/ml$   
TE 飽和フェノール (pH 8.0)  
100% エタノール  
70% エタノール  
電気泳動試料用バッファー：尿素 8 M, Tris-borate (pH 8.3) 50 mM, EDTA 1 mM, bromophenol blue 0.025%, xylene cyanol 0.025%  
DNA 抽出バッファー：Ammonium acetate 0.5 M, Magnesium acetate 10 mM, EDTA 1 mM, SDS 0.1%

### 実験操作

#### 1 ) DNA断片の調製

一方の鎖の 5'または 3'末端を  $^{32}P$  で標識した DNA 断片を用意する。DNA 末端標識については通常のプロトコールどおりであるが、本稿では 5'末端ラベルした DNA の調製法を記する。

- 予想されるタンパク質結合領域を含む数百塩基対の DNA 断片を 10 pmol 程度用意する (メモ)。
- 100  $\mu l$  の 0.2M Tris-HCl (pH 7.9) に溶かし、0.5U の BAP を加えて 60°で 20 分間脱リン酸反応をする。十分に行うため、再度 0.5U の BAP を加えて 60°で 20 分間反応させる。
- 100  $\mu l$  のフェノールを加えて反応を停止させ、遠心

12krpm × 5 分の後、上清をエタノール沈殿する。

- DNA ペレットを rinses および乾燥後、酵素に付随の 10 × バッファー 5  $\mu l$  と DNA 断片量の約 2 倍強のモル数の [  $-^{32}P$  ] ATP ( $\sim 3000$  Ci/mmol) を加え、 $H_2O$  で 50  $\mu l$  に合わせる。
- 10 ~ 20 U の polynucleotide kinase を加え、37°で 30 分間反応させる。
- 0.5  $\mu l$  の反応液をミニポリアクリルアミドゲル電気泳動し、DNA 断片と未反応の [  $-^{32}P$  ] ATP とをオートラジオグラムで検出することにより、リン酸化の程度をチェックする。
- 50  $\mu l$  のフェノールで反応を停止させ、エタノール沈殿する。
- DNA ペレットを rinses および乾燥後、片端ラベルになるよう適當な制限酵素で切断する。
- ■ と同様にして切断の程度をチェックした後、2  $\mu l$  の 0.5M EDTA を加えて反応を停止させて、ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて分離する。
- オートラジオグラムにより、必要な断片をゲルから切り出す。
- ゲル片をチップ等で軽く砕き、400  $\mu l$  程度の抽出バッファーを加えて一晩攪拌する。
- EtOH 沈殿を 2 ~ 3 回繰り返して濃縮精製後、100  $\mu l$  程度の TE バッファーに溶解させる。電気泳動等により濃度検定をしておくとよい。

### MEMO

電気泳動の分離能にもよるが、タンパク質結合部位は標識末端から 200 塩基以内くらいにした方が良好な結果が得られやすい。われわれはクローニングしたプラスミド DNA を適當な制限酵素で処理し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動する。ゲルを蛍光薄層プレート上に置き、UV ハンディランプを用いて目的の断片を切り出している。

#### 2 ) タンパク質試料の調製

精製したタンパク質標品を用いるのがよいが、場合によっては未精製タンパク質でもきれいなフットプリントが得られる。ただし、この場合の結果の解釈については十分注意する必要がある。いずれの場合も使用直前に適當なバッファーに希釈して用いる (メモ)。

### MEMO

リン酸バッファーを用いると、反応混合液中の  $Ca^{2+}$  と反応して不溶性のリン酸カルシウムが析出するのでトリスバッファー等がよい。

### 3 ) DNA-タンパク質複合体の形成とDNase 反応

❶以下に示す反応混合液をサンプル数分用意する。反応は1.5ml エッペンドルフチューブ内で行う。

#### 反応混合液(メモ)

[ <sup>32</sup> P] DNA断片	1 nM
10 × DNase 反応バッファー	10 µl
DNA結合タンパク質	~ 100 nM
H <sub>2</sub> O	to 100 µl

- ❷ 37℃で5分～30分ほどインキュベートしてDNA-タンパク質複合体を形成させる(メモ)。
- ❸ 25℃にチューブを移し、5分間ブレインキュベーションする。
- ❹ 10～60ngのDNaseを加え、30～60秒間反応を行う(メモ)。
- ❺ 100 µlのフェノールを加えてボルテックスして反応を停止させる。
- ❻ 25 µlの反応停止液を加える(メモ)。
- ❼ 遠心12krpm × 5分の後、上清をエタノール沈殿する。
- ❽ 70%エタノールでリーンして乾燥後、10 µlの電気泳動試料用緩衝液に溶かす。
- ❾ 試料液の一部(2～5 µl)を90℃で1～2分加熱後、シーケンスゲルを用いて電気泳動する(メモ)。
- ❿ その際、同じDNAをMaxam-Gilbertシーケンス法により化学処理したものを、マーカーとして同時に電気泳動する。
- ⓫ 電気泳動後は常法に従い、ゲルのオートラジオグラフィーを行う。

実際のラクトースプロモーターにおける大腸菌転写調節因子CRP-cAMPと、RNAポリメラーゼとの相互作用についてのDNase フットプリントингの解析結果を図1に示したので参考されたい<sup>4)</sup>。

#### MEMO

加えるDNA結合タンパク質の量は、種類および標品によるが、CRPやRNAポリメラーゼの場合、DNAの数十倍のモル数を使用して良好な結果を得ている。一般にDNA結合タンパク質はDNAに非特異的親和性ももっているため、特異的相互作用部位の決定には、条件の検討が必要である。また、緩衝液にDNA-タンパク質複合体の安定化のため、終濃度5%のグリセロールを加えることもある。通常5分程度で特異的複合体が形成されるが、DNAとの複合体の形成条件はタンパク質によって変動するので、インキュベーションの時間も検討すべきである。DNaseによる部分消化反応は、DNA1分子当たり1

カ所程度のDNA鎖の切断が好ましい。反応液のpHや塩濃度、あるいはDNAやタンパク質濃度等によりDNaseの量や反応時間の最適値は変動するので、最終的に各反応チューブのDNAの切断が同程度になり、きれいなラダーが得られるよう詳細な条件の検討が必要である。また、よい反応の再現性を得るため、あらかじめタイムテープ等を用意しておき、各チューブ間の時間誤差を極力おさえるとよい。

反応停止を確実にするため、最初にフェノールを加える。8M尿素/8%アクリルアミドゲルで0.35 mm程度のスペーサー、スクエアコームを用いている。

## おわりに

以上、標準的なDNase フットプリントング法について述べたが、種々の応用形のフットプリントング法があり、研究対象、実験系に応じて使い分けられている。例えば、DNase以外にもジメチル硫酸(DMS)やヒドロキシリラジカルなど、DNA-タンパク質複合体の構造を壊さない程度にDNAをランダムに切断する方法がフットプリントング法に適用できる。DMSはG塩基特異的なフットプリントングしか得られないとはいえ、in vivo フットプリントングが可能という特徴がある。また、ヒドロキシリラジカルはDNaseに比べ分解能のよいフットプリントングを得ることが可能であり、DNA-タンパク質相互作用のより詳細な解析に適用できる。さらに、DNase反応産物の検出法にプライマー伸張法を用いることで、超らせんDNAとタンパク質相互作用の解析も可能となる。なお、赤外蛍光シーケンサー(LICOR DNAシーケンサー4000等)を利用することにより、RI標識しなくても高感度で検出できるようになってきている<sup>5)</sup>。今後ともゲルシフト法やin vitro 転写反応等との併用を含め、DNA-タンパク質相互作用の研究法としてのフットプリントング法の、より有効な利用法が期待できよう。

## 文献

- 1) Galas, D. J. & Schmitz, A.: Nucl. Acids Res., 5: 3157, 1978
- 2) 饗場弘二、花村明美：“核酸 - 遺伝子の複製と発現(新生化学実験講座2、日本生化学会編)”, p226, 東京化学同人, 1993
- 3) Maxam, A. & Gilbert, W.: Methods Enzymol., 65: 499, 1980
- 4) Tagami, H. & Aiba, H.: Nucl. Acids Res., 23: 599, 1995
- 5) 町田雅之：“脱アイソトープ実戦プロトコール2 - キット簡単編”, p98, 秀潤社, 1998