

「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」

平成14年度採択研究代表者

原田 慶恵

( (財) 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 副参事研究員)

## 「DNA分子モーターの動作原理の解明」

### 1. 研究実施の概要

生体内には、ヌクレオチドを加水分解して得たエネルギーを使って、DNAに沿って動きながら働くDNA分子モーターが存在する。DNA分子モーターの機能のメカニズムを明らかにし、ナノテクノロジーへの応用を考察する。

現在、以下の2つの項目について研究を行っている。

#### (1) RNAポリメラーゼによるDNA転写の分子機構に関する研究

転写開始に伴ってRNAポリメラーゼが鋳型DNAの二重らせんを巻き戻す運動を観察するための実験系の開発を行った。スライドガラス上に固定したDNAの端に目印となる微小ビーズを結合させることによって、DNAのねじれ運動をリアルタイムで計測できるようになった。今後は、実際に転写開始時の転写バブル形成に伴う、DNA二重らせんの巻き戻し反応をビーズの回転運動として検出する。さらに、転写時におこるRNAポリメラーゼによるDNAの回転運動を高感度に検出し、転写の素反応の検出を試みる。

#### (2) Holliday構造DNAの分岐点移動反応の顕微鏡による直接観察

DNAの相同組換えの中間体である、Holliday構造DNAのRuvABタンパク質複合体による分岐点移動時のDNAの回転運動を、DNAの片端に付けたビーズの回転運動として光学顕微鏡で直接観察できる系を構築した。DNAの回転数と分岐点移動距離の関係を明らかにする。さらに、蛍光標識ATPを使って、1分子のATP加水分解で、分岐点が移動する距離との関係を明らかにする。

### 2. 研究実施内容

#### 研究目的

生物はその遺伝情報をDNAという長いひも状分子に保存している。その情報発現、伝達は生き物にとって最も重要な機能である。それらの機能を担うタンパク質の多くは、ヌクレオチドを加水分解したとき得られるエネルギーを使って、DNA分子に沿って動きながら機能する分子モーターである。これらのDNAモーターは、タンパク質分子のレールに沿って動く筋収縮や細胞運動を担っている運動タンパク質分子モーターとは異なるメカニズムで機能していると考えられる。DNA分子モーターには、転写、合成、分解、巻き戻しなど

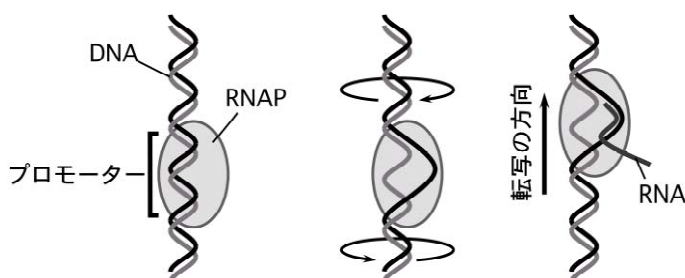
様々な働きをするものがある。働きの違いで、それぞれのDNA分子モーターの機能のメカニズムも多様であろう。さらに、相同遺伝子組み換えのように、異なる機能を持つ複数のDNA分子モーターが複合体を形成し、複雑な機能をするものもある。しかし、現在それらの分子メカニズムはほとんど明らかになっていない。そこで本研究は、我々の研究室で有している1分子イメージング、1分子操作、1分子計測法技術を使い、DNA分子モーターの動きのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 方法

### 1. DNA-タンパク質相互作用の分子機構の解明

#### (1) RNAポリメラーゼによるDNA転写の分子機構に関する研究

生体内でDNAに蓄積されている遺伝情報は、転写によってRNAに写しとられる。RNAがDNAから引き継いだ遺伝情報はタンパク質のアミノ酸配列に翻訳されることによって、はじめて生体内で機能が発現される。DNA上の転写が開始される位置は、プロモーターと呼ばれる配列によって指定されている。転写を行う酵素であるRNAポリメラーゼ（以下RNAP）は、DNA上のプロモーター配列に結合すると、付近の塩基対を局所的に約10塩基解離させ、RNA合成の鋳型となる1本鎖部分を作る。DNAは1ピッチがおよそ10塩基対の右巻き二重らせん構造をとっているが、塩基対の解離に伴い約1回転らせんが解かれる。RNAPはDNAの塩基対が解離した部分を下流に移動させ



1. プロモーターへの結合 2. らせんの巻き戻し 3. RNAの合成

図1. 転写反応の概念図

RNAを1塩基ずつ伸ばさせながらDNAに沿って動く（図1）。このように、転写が行われる際には、RNAP、DNA、RNAの複合体（以下RNAP複合体）がダイナミックに構造変化することによって、複雑な反応過程を実現している。

転写の一連の過程におけるRNAP複合体の構造は、近年、X線回折法を用いた結晶構造の研究によって詳細に解析されるようになった。しかし、こうした研究で示された構造は、ダイナミックに構造変化するRNAP複合体のいくつかの安定状態をとらえた、いわばスナップショットである。我々は1個のRNAP複合体が安定した構造間を遷移する「動き」をリアルタイムで観察することによって、複雑な転写反応を可能にしているRNAP複合体のダイナミックな振る舞いを解明できるのではないかと考えた。本研究ではその足掛かりとして、RNAPが転写を開始する際に生じるDNAのねじれ運動を、顕微鏡下で高精度に観察する実験系の開発を行うことにした。

これまでに、我々は大腸菌のRNAPとDNAの転写複合体をガラス基板上に固定し、DNAの片端に付けたビーズの動きを観察する方法で、RNAPが転写活動中にDNAをその右巻き2重らせん構造に沿ってねじる運動を可視化することに成功している。そこでこの方法を改良し、

DNA 2重らせんのねじれ構造変化を光学顕微鏡下で直接観察する実験系の開発を行った。片端をスライドガラスに、もう一方の端をビーズに結合させたDNAを用いて、DNAに特異的に結合する化合物の結合解離過程、および、RNAPによる転写バブル形成過程の観察を行った（図2）。臭化エチジウム（EtBr）はDNAの蛍光染色に用いられる変異原性のある化合物である。EtBrはDNAの隣り合う塩基対の間に挿入される形で結合する。その際DNA 2重らせんの構造にゆがみが生じ、らせんが1塩基対あたり約13°の割合でゆるむことが生化学的な方法や結晶構造の解析から知られている。全長が457塩基対のDNAをスライドガラスとビーズの間に結合させ、溶液中に過剰量のEtBrを加えたところ、ビーズが時計回りに連続的に約18回転する様子が観察できた（図3）。この回転はDNAが1塩基対あたり約14°の割合でゆるみが生じたことに相当し、他の方法で予測された値と良く一致する。このことから、本法を用いて1本のDNA

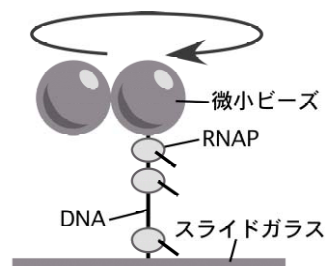


図2. DNAのねじれ運動観察系

に生じるねじれ変形の大きさを精度良く直接測定できることが確認できた。また、この反応は可逆的であり、溶液中からEtBrを洗い流すことによって、ビーズが反時計回りに巻き戻る様子も観察された。次にT7ファージ由来のRNAポリメラーゼ（T7 RNAP）を用いて、転写バブルが形成される過程を観察する実験を行った。T7 RNAPは1本のポリペプチドからなる単純な構造でありながら、転写の開始、伸長、終結という、他の生物の複雑な構造のRNAポリメラーゼにも共通する基本的な機能を備えている。実験ではT7 RNAPが特異的に認識するプロモーター配列を8個含むDNA

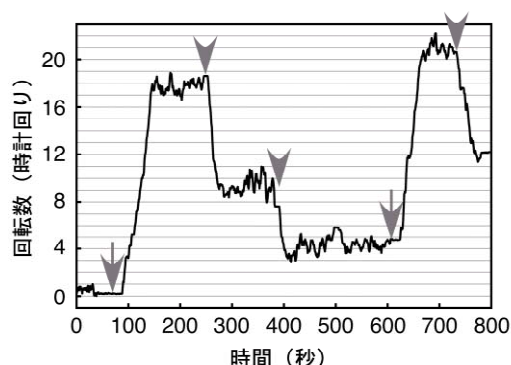


図3. 臭化エチジウムの結合に伴うDNAねじれ量変化

をスライドガラスとビーズの間に結合させた。溶液中にT7 RNAPとRNA合成の基質となるNTPとを加えたところ、ビーズが時計回りに8回転する様子が観察できた（図4）。この結果はT7 RNAPがDNA上の8カ所でそれぞれ1回転ずつDNAを巻き戻したことを示していると考えられる。現在は1個の転写バブルがどのようなDNAの動きを伴って形成されるのかを解明するために、より高精度にねじれ変形を測定できる方法を検討している。

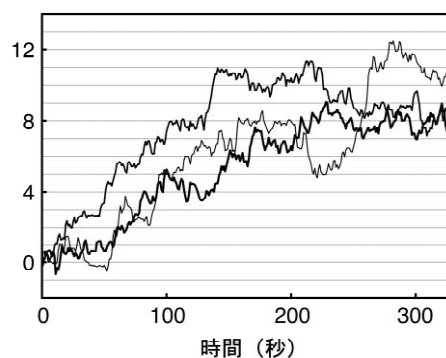


図4. T7RNAポリメラーゼによる転写バブル形成過程

## (2) Holliday構造DNAの分岐点移動反応の顕微鏡による直接観察 (担当者 韓龍雲)

DNAの相同組換えは生命の進化において重要な役割を果たすだけでなく、損傷を受けたDNAの修復においても重要な役割を果たす。相同組換えの過程において十字型構造をしたHolliday構造DNAが形成され、この十字型分岐点の移動により組換えが進行する。分岐点移動反応にはRuvABタンパク質複合体が関与する。RuvAはHolliday構造に特異的に結合するタンパク質である。また、RuvAはRuvBと複合体を形成する。RuvBがモータータンパク質としての活性を担い、そのアミノ酸配列の類似性からAAA<sup>+</sup>ファミリーに属するタンパク質である。RuvBは六量体のリング構造を形成し、図5のようにRuvAの両側から挟むようにしてRuvAと相互作用する。分岐点の移動はRuvBのATP加水分解エネルギーを利用して行われる。しかしながら、RuvABによる分岐点移動の速度やATP 1分子の加水分解によって移動するDNAの長さなどの詳細な反応機構に関しては未知な部分が多い。したがって、このようなRuvABタンパク質複合体によるDNA相同組換えの機構を明らかにすることを目的として、光学顕微鏡下でHolliday構造DNAの分岐点移動を直接観察することにした。RuvABによる分岐点移動時に起こることが予想されているDNAの回転を、図6に示す系で検出することにした。Holliday構造DNAの片側をスライドガラスに固定し、反対側に目印となるような蛍光磁気ビーズを付

け、RuvAB、マグネシウムイオン、ATPを加え、ビーズの動きを顕微鏡下で観察、記録した。予想通り回転するビーズが観察された。今回の観察結果よりHolliday構造DNAの分岐点移動反応はDNAが自身のらせんに沿うように回転しながら移動することが示唆された。またATP濃度を変えて、ビーズの回転を観察したところ、ATP濃度依存的に回転速度の上昇が見られ、 $V_{max}$ 、 $K_m$ はそれぞれ1.45回転/秒、53  $\mu\text{M}$ であった(図7)。以前、プラスミドDNA存在下でATP水解活性を求めた時の $K_m$ が約30  $\mu\text{M}$ であり、今回得られた $K_m$ とほぼ一致した。今後は、ビーズの1回転がDNAの1回転に対応するかを確認するために、生化学実験からRuvABによる分岐点移動反応の速度を求めて、ビーズの回転速度と比較する予定である。また、ATP加水分解速度を求めることにより、1分子のATPを分解する間に分岐点移動がどれくらい行われるかを決定し、その詳細なメカニズムを明らかにしていきたい。

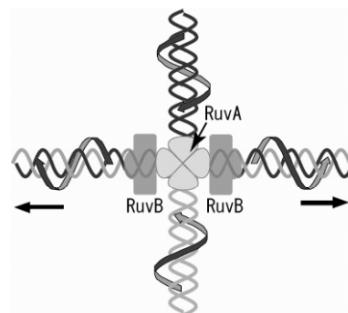


図5. RuvAB蛋白質複合体によるHolliday構造の移動

RuvB六量体リングがDNAを左右方向に押し出すことでHolliday構造の交差点が移動していく。この時、DNAは矢印のように回転する。

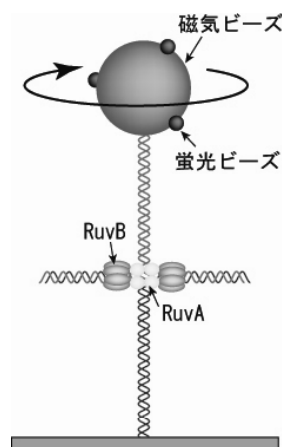


図6. 分岐点移動反応の観察システム  
左右方向にRuvBが結合するとビーズは時計回りに回転する。上下方向の場合、ビーズは反時計回りに回転する。

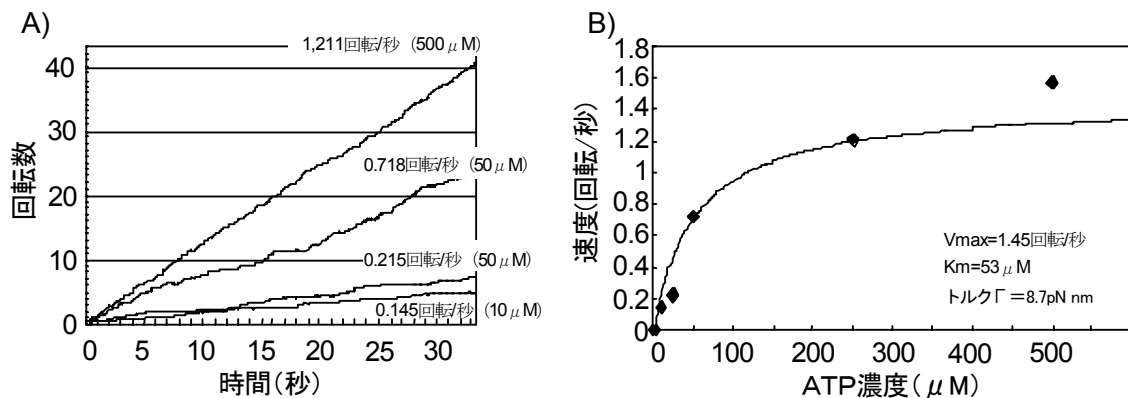


図7. 回転ビーズの解析結果 (A) Time Course (B)回転速度とATP濃度との関係

### 3. 研究実施体制

#### 1 分子解析グループ

- ① 研究分担グループ長：原田 慶恵（財団法人 東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所、副参事研究員）
- ② 研究項目：1分子解析法による組み換え反応におけるRuvABおよびRecQ動作原理の解明

#### DNA分子モーターグループ

- ① 研究分担グループ長：品川 日出夫（大阪大学 微生物病研究所、教授）
- ② 研究項目：組み換え関連タンパク質の生化学的、分子生物学的研究

### 4. 主な研究成果の発表

#### (1) 論文発表

- Takashi Hishida, Yong-Woon Han, Satoko Fujimoto, Hiroshi Iwasaki and Hideo Shinagawa  
Direct evidence that a conserved arginine in RuvB AAA+ ATPase acts as an allosteric effector for the ATPase activity of the adjacent subunit in a hexamer.  
Proc Natl Acad Sci U S A. 101, 9573-9577, 2004
- Takashi Hishida, Yong-Woon Han, Tatsuya Shibata, Yoshino Kubota, Yoshizumi Ishino, Hiroshi Iwasaki and Hideo Shinagawa  
Role of the Escherichia coli RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks.  
Genes Dev. 18, 1886-1897, 2004
- Yoshie Harada  
Studies on Biomolecules Using Single Molecule Imaging and Manipulation Techniques.

Sci. Tech. Adv. Mat. 5, 709-713, 2004

- Tatsuya Shibata, Takasi Hishida, Yoshino Kubota, Yong-Woon Han, Hiroshi Iwasaki and Hideo Shinagawa

Functional overlap between RecA and MgsA (RarA) in the rescue of stalled replication forks in *Escherichia coli*.

Genes Cells. 10. 181-191, 2005

- Tomomi Tani, Yoshikazu Miyamoto, Fujimori Kazuhiro, Takahisa Taguchi, Toshio Yanagida, Sako Yasushi and Yoshie Harada

Trafficking of ligand-receptor complex on the growth cones as an essential step for the uptake of nerve growth factor at the distal end of axon: a single-molecule analysis.

J. Neurosci. 25, 2181-2191, 2005

- Takanori Hirano, Satoshi Shibata, Kouhei Ohnishi, Tomomi Tani and Shin-Ichi Aizawa

N-terminal signal region of FliK is dispensable for length control of the flagellar hook.

Mol. Microbiol., 56, 346-360, 2005