

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名： DNA分子モーターの動作原理の解明

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名(研究機関名・職名は研究参加期間終了時点)

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)

主たる共同研究者

品川 日出夫 (バイオアカデミア株式会社 代表取締役)

3. 研究内容及び成果

3 - 1. 研究課題全体の研究内容

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 分子モータータンパク質が存在する。DNA 分子モーターが働くメカニズムを明らかにし、ナノマシンへの応用を研究の目的とした。これまでの研究は主に、生化学的あるいは分子生物学的手法で行われてきたが、1分子イメージング、1分子操作、1分子計測法などの技術を使い、DNA 分子モーターの動きを調べた。DNA 分子モーターには、転写、合成、分解、巻き戻しなど、それぞれ担っている機能が異なるものがある。その中で、相同組み換え後期に形成される Holliday 構造、及び RNA 転写について研究を行った。

移動に伴う DNA の回転運動を指標として光学顕微鏡で直接観察し、生化学的解析からでは測定が困難であった分岐点移動速度の測定を行うことに成功した。また、DNA にリガンドが結合したことによって引き起こされるねじれを高感度に検出する系を開発した。この系を用いて、臭化エチジウム(EtBr)の DNA への結合過程を詳細に解析した。その結果、EtBr は最大 DNA 2 塩基対あたり 1 分子結合することや、結合にはこれまでに報告されていない負の協同性が観察されることが明らかになった。

3 - 2. 各グループの研究成果

チームは従来の生化学的手法、分子生物学的手法を用いて、より詳細に DNA 分子モーターを研究する「DNA 分子モーターグループ」と、1分子イメージング、1分子操作、1分子計測法などの技術を使い、DNA 分子モーターの動きのメカニズムを調べる「1分子解析グループ」をおき、両者が協力して DNA 分子モータータンパク質の機能解析を行った。

1分子解析グループ

(1) RNA ポリメラーゼによる DNA 転写の1分子観察

DNA の転写はまず RNA ポリメラーゼがプロモーター部位を探し出し、転写開始部位の二重らせんを巻き戻すことから始まる。このねじれを計測するため、DNA の片端をガラス上に固定し、もう一方の端に回転運動の観察を行うための目印として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実験系を開発した。この実験系で臭化エチジウム(EtBr)の DNA への結合過程を詳細に解析した結果、EtBr は最大 DNA 2 塩基対あたり1分子結合することが分かり、DNA 1分子レベルでのキネティクス解析が可能であることを確認できた。このシステムを使って RNA ポリメラーゼの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実験を行った。加える基質の種類を変え、休止状態にする位置を変えて観察を行った。その結果、観察されたビーズの回転数に違いが見られた。このシステムは、わずか 2~3 塩基の巻き戻しを検出できることがわかる。

(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 の相同組換えを担う RuvA・RuvB タンパク質複合体の作る十字型の Holliday 構造を、DNA の一端をガラス基板上に固定し、反対側に回転を検出の目印となる磁気ビーズをつけてビーズの動きを顕微鏡下で観察した。

低濃度 ATP では、生化学実験から得られた RuvA・RuvB による分岐点移動反応の速度は1分子解析で求めた速度の約 2.5 倍であった。この結果は DNA につけたビーズが負荷となることで、分岐点移動の速度が遅くなっていることを示唆している。

DNA 分子モーターグループ

本グループはゲノムの正確な複製、染色体の安定的分離・分配などゲノムの安定性維持に関与する DNA モータータンパク質の機能解析に重点を置いた研究を進めた。これらのタンパク質の機能欠損は、突然変異や染色体の異常を亢進し、癌や早老症の遺伝的素因となっており、医学的にも重要な課題である。本グループが発見した、相同的 DNA 組換えの後期過程で Holliday 構造と呼ばれる組換え中間体に作用し、相同な二重鎖間で単鎖 DNA 交換を促進して交叉点の移動を促進する RuvA・RuvB DNA モータータンパク質複合体の構造と機能の関連の解析を中心に行い、1分子解析グループの1分子イメージング解析実験と相補的な研究を進めた。本研究では RuvA・RuvB 複合体モーターのうち ATP 分解活性をもつ RuvB の多数の変異タンパク質を解析して、分子・原子レベルでの Holliday 交叉点移動の反応機構の解明を試みた。その結果、RuvB 6 量体リングで隣合う RuvB が ATPase の活性中心を形成することや、RuvB を構成する3つのドメインの役割を明らかにした。RuvB は生体内で種々の機能に関与する AAA⁺-ATPase ファミリーに属し、RuvB タンパク質の構造と機能の先端的研究成果は、他の AAA⁺-ATPase モータータンパク質の研究に波及的な影響を及ぼしている。

また酵母での組換え修復に欠損を持つ新規の遺伝子を同定し、組換え後期過程でのそれらの役割を解析した。その結果、ゲノム安定性の維持に関与する新規の DNA モータータンパク質 Fbh-1 や SMC5/6 複合体モータータンパク質の構成分子 Rad60 と Rad61 タンパク質を発見し、その生物学的機能を解析しこれらが組換え反応の後期過程に関与することを明らかにした。さらに、組換え修復で機能や反応機構が不明であった大腸菌の DNA モータータンパク質 RecQ や RecN の生体内での機能や発現制御、生化学的機能の解析を行った。前者は癌や老化を防止する機能が知られているウエルナー症候群やブルーム症候群の原因遺伝子 Wrn, Blm のホモログで Holliday 構造を基質としているという仮説が提唱されていた。本研究で RecQ の DNA 基質の構造は Holliday 構造でなく、ギャップ構造を持つ複製フォークである事を明らかにした。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

外部発表件数

論文発表		著作物		招待講演		口頭発表		ポスター発表		特許	
国内	国際	国内	国際	国内	海外	国内	海外	国内	国際	国内	国際
0	15	14	0	8	4	2	26	25	26	2	0

RuvA-RuvB による DNA の回転観察や、臭化エチジウムの結合による DNA のねじれによる回転など重要な結果は論文発表されているが、成果に比し発表量が少ない。ただし質的にレベルの高い論文を出版している。特許化できる成果については、特許申請が2件あるが、他にもここで開発された DNA の高感度ねじれ検出法は出願の価値があるので、試みてもらいたい。

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

DNA にリガンドが結合したことによって引き起こされるねじれを高感度に検出する系の開発は技術的インパクトがあり、今後の応用が期待される。これまでの研究では、DNA の長軸方向の動きのみを検出しているのに対して、本研究で開発された手法は DNA のねじれと動きを同時検出するものであり、その技術は世界的にトップレベルである。今後、このシステムを使うことによって 1 本の DNA と様々なリガンドとの結合を、結合時におこる

DNA のねじれから高感度に検出することができ、DNA の機能解析に強力な武器になると思われる。また、本研究で開発された計測システムはわずか数塩基の転写バブルの大きさの違いを検出できることを示しており、今後の展開を期待している。自ら開発した技術によって Holliday 構造の DNA の分岐点移動反応は、DNA 螺旋に沿うように回転しながら移動することを実証したことは大きな成果である。ただし、その動きが ATP の加水分解とどのようにカップルしているのかといった仕組みの解析は今後の課題として残されている。本研究で確立された技術を有効に活用して、生物学的に意義の深い現象の解明を進めてほしい。

4 - 3 . その他の特記事項

研究代表者の原田慶恵氏は平成20年3月より京都大学 物質 - 細胞統合システム拠点 特任教授に就任