

「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)

「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、転写時における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) RNAポリメラーゼによるDNA転写の分子機構に関する研究

DNAの塩基配列に記された遺伝情報は、転写によってmRNAにコピーされ、その後翻訳によってタンパク質のアミノ酸配列に変換される。転写反応を担う酵素であるRNAポリメラーゼは、まずDNA上にあるプロモーターと呼ばれる領域に特異的に結合する(図1.A)。つぎにプロモーター付近のDNAの2重らせん構造を部分的にこじ開けて転写バブルと呼ばれる構造を形成し、mRNAの材料となるヌクレオチドが結合できるようにする。(図1.B)。RNAポリメラーゼがDNAに沿って移動し、転写バブルを移動させながらDNAの塩基配列と相補的なヌクレオチドを次々と連結させることによってmRNAが伸長する(図1.C)。これまでに、我々は大腸菌のRNAポリメラーゼと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解析した結果、RNAポリメラーゼは転写活動中に、10塩基対で1回転するDNAの右巻き2重らせん構造を正確になぞりながら、転写していることがわかった。RNAポリメラーゼがDNA上を1塩基進む場合の移動距離はわずか0.34 nmで、この移動を検出することはほとんど不可能である。しかし、上記の実験から、そのわずかな移動の間にRNAポリメラーゼはDNAを中心軸として、36度も回転することが示唆された。また、転写バブルが形成される際、DNAの二重らせんが十数塩基こじ開けられることによって、RNAポリメラーゼの前後で1~2回転DNAのねじれ運動が起こることが予想される。そこでスライドガラス表面とビーズ間に鋳型DNAを伸展し、そこにRNAポリメラーゼを作用させて、RNAポリメラーゼが転写バブルを形成する過程でおこる回転ねじれ運動を検出する実験系の開発を試みた(図2)。実験には、転写調節因子の研究がよく進められている大腸菌RNAポリメラーゼと1本のポリペプチド鎖からなりプロモーター配列の短いT7 phage RNAポリメラーゼを用いることにした。プロモーター配列を含む短いDNAの両端に特殊な化学修飾を施すことによって、DNAの一端をスライドガラス表面に、他端を回転の目印となるビーズに結合させた。DNA末端の配列に工夫を加えることによって、DNAのねじれ運動がビーズに正確に伝達されるように結合させることができた。現在はこの系にRNAポリメラーゼを加え、ねじれ運動の観察される実験条件を検討している。

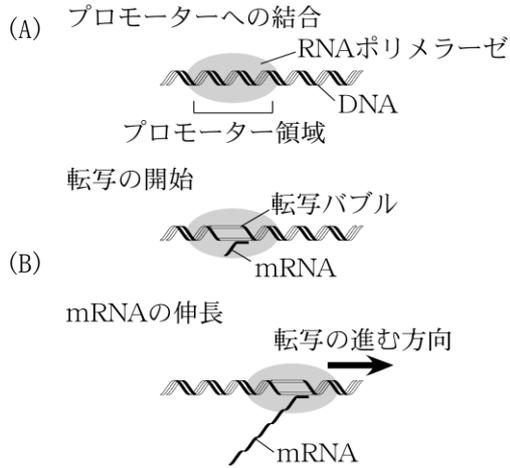


図1. 転写反応の概念図

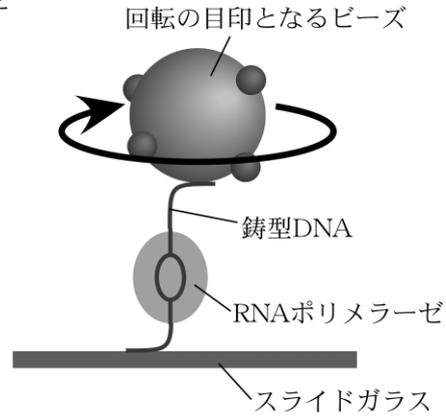


図2. DNAのねじれ運動観察系

(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。相同組み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み換えが進行する（図3）。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は六量体のリング構造を形成し、図4のようにRuvAの両側からはさむようにして、RuvAと相互作用する。分岐点の移動はモータータンパク質であるRuvBのATP加水分解のエネルギーを利用して行われる。そして最後にエンドヌクレアーゼであるRuvCがHolliday構造DNAに結合し、切断することで組換え体が形成される。

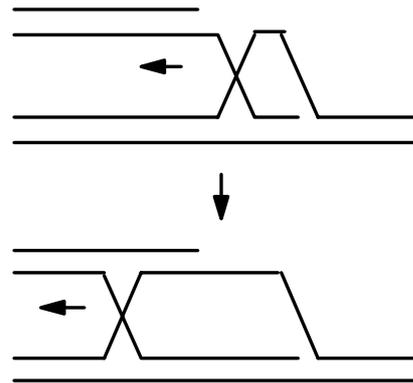


図3. Holliday構造DNAの分岐点移動
矢印のように分岐点が移動することにより、組換えが進行する。

現在、我々はRuvABタンパク質複合体によるHolliday構造DNAの分岐点移動を光学顕微鏡で直接検出することを試みている。RuvABによる分岐点移動が起こるときDNAの回転が起こる。そこで、この回転運動を検出することにした。図5のような観察系を構築するところから始めた。まず、観察に必要な十字型構造のDNAを作製した。そしてその十字型構造DNAの一方をスライドガラス基板に固定し、もう片側に磁気ビーズを付け、磁石で引っ張りあげた。そこにRuvA、RuvBタンパク質を加え、RuvAB-Holliday構造複合体を形成させ、エネルギー源であるATPを加え、ビーズの動きを観察する。図のようにRuvBが上下方向にHolliday構造DNAに結合すると、DNAを上下方向に押し出すようにして、DNAは反時計回りのビーズの回転が観察され、左右方向にRuvBがサンドイッチした場合、ビーズの回転は時

計回りとなる。これまでに、何例かビーズの回転が観察されている。今後、さらにこのビーズの回転を詳細に観察し、これまでの生化学的解析からでは測定が困難であった分岐点移動反応の速度や1分子のATPの加水分解にもなって移動するDNAの長さ、活性化エネルギーの測定を行い、RuvABタンパク質複合体によるHolliday構造DNAの分岐点移動反応のメカニズムを明らかにしていきたい。

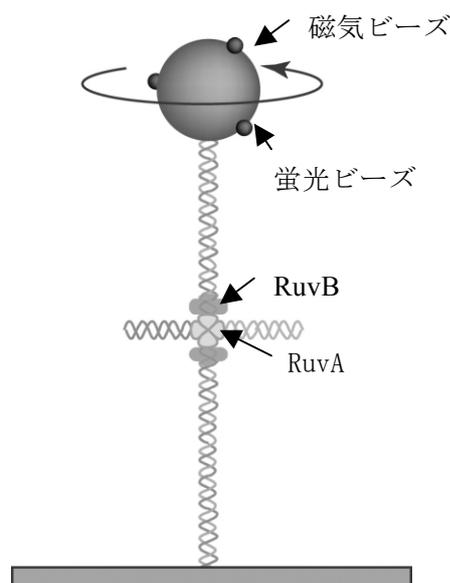


図5. 分岐点移動反応の観察システム
ビーズは。RuvBが上下方向にはさむと反時計回りに、左右方向にはさむと時計回りに回転する。

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（論文発表および特許出願）

(1) 論文発表

- Hishida T, Iwasaki H, Han YW, Ohnishi T, Shinagawa H.
Uncoupling of the ATPase activity from the branch migration activity of RuvAB protein complexes containing both wild-type and ATPase-defective RuvB proteins.
Genes to Cells. 8:721-730, 2003

(2) 特許出願

なし