

「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 分子モーターが働くメカニズムを明らかにし、ナノマシンへの応用を考察するために、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

(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。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

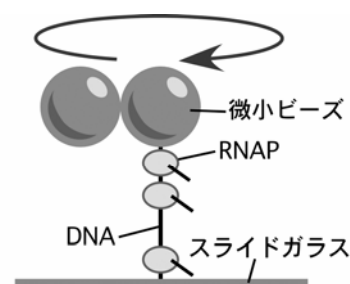


図 1. DNA のねじれ運動観察系

メラゼ(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(転写バブル)を作る。このとき DNA はらせんがゆるむ方向におよそ 1 回転する。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)のダイナミックな構造変化がおこる。最近我々は、片端をスライドガラスに反対の端をビーズに結合させた DNA のねじれ変形をビーズの回転として観察することで、1 本の DNA に生じるねじれ方向の構造変化を光学顕微鏡下で直接観察する系を開発した(図 1)。我々はこの方法を用いて、臭化エチジウム(EtBr)の DNA への可逆的な結合、RNAP による転写バブル形成過程の観察に成功している。本年はこの方法が DNA 1 分子レベルでのキネティクス解析に耐えうることを確認するために、EtBr の DNA への結合過程をさらに詳細に解析した。

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。その際に DNA 2 重らせんの構造にゆがみが生じ、EtBr 1 分子あたり約 27° らせんがゆるむことが生化学的方法や結晶構造の解析から知られている(図 2)。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て溶液中に EtBr を加えたところ、ビーズが時計回りに連続的に一定数回転する様子が観察できた。EtBr の濃度

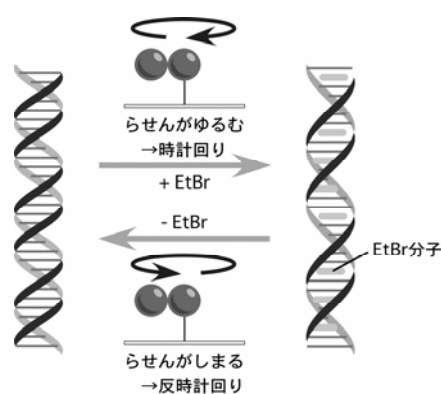


図 2. EtBr の結合解離に伴う DNA のねじれ

を変えて回転数を測定し、DNA への EtBr 分子の最大結合数、結合定数を求めた。過剰量の EtBr を加えるとビーズは約 18 回転した。この値と EtBr 1 分子あたりの回転角度から、DNA 2 塩基対あたり EtBr 1 分子結合することが分かった。結合定数は $2.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と求められた。これらの値は他の実験方法で求められた値と一致する。EtBr の DNA への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も分かった。

以上の結果から、本法を用いることによって DNA への生体分子の結合解離過程を DNA 1 分子レベルで観察でき、結合定数や協同性などの値を求められることが分かった。また、DNA に結合する分子同士の DNA のねじれを介した力学的相互作用も解析可能であることが示された。今後は、RNAP などの DNA 結合タンパク質同士が、DNA のねじれを介して力学的相互作用する様子の解析を行いたいと考えている。

(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。相同組換えの過程では十字型構造をした 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。RuvB は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⁺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 3 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、モータータンパク質である RuvB 6 量体リングが DNA を動かすしくみなど詳細な反応機構は明らかではない。そこで RuvAB 複合体による DNA 相同組換えの機構を詳細に解析することを目的として、これまでに光学顕微鏡下で Holliday 構造 DNA の分岐点移動を直接観察した。RuvAB による分岐点移動時におこることが予想されている DNA の回転を図 4 に示す系で検出した。Holliday 構造 DNA の一端をスライドガラスに固定し、反対側に回転を検出するための目印となるような磁気ビーズをつけて、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。その結果、予想通りビーズの回転が観察された。ATP 濃度を変えて、ビーズの回転を観察した結果、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 1.57 回転/秒、65 μ M であった (図 5)。Holliday 分岐点が DNA 1 ピッチ分 (10.4bp) 進む間にビーズは 2 回転するはずなので、回転速度から見積もった V_{max} は 8.2bp/秒である。

同じ条件下で、生化学実験から得られた RuvAB による分岐点移動反応の速度は、低濃度 ATP においては 1 分子解析で求めた速度とほぼ一致した。このことから、DNA の回転がビーズの回転に正しく伝えられていることが示唆され

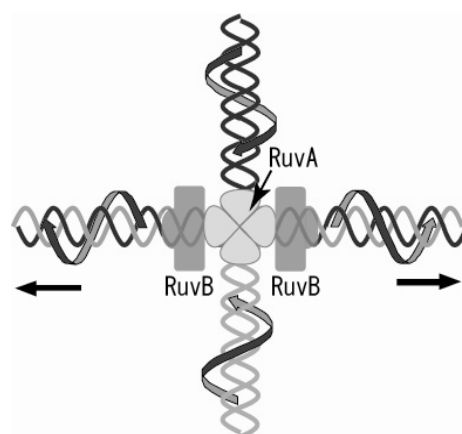


図 3. RuvAB タンパク質複合体による Holliday 構造の移動

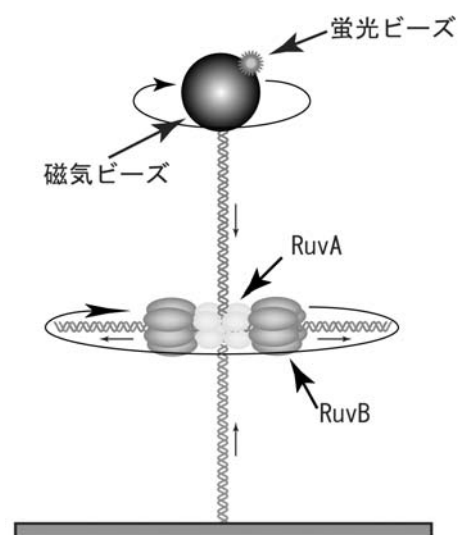


図 4. 分岐点移動反応の観察システム

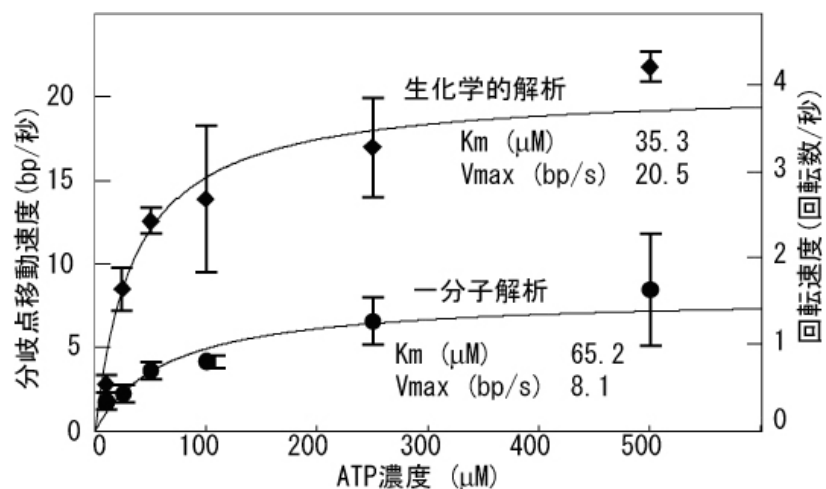


図 5. 一分子解析と生化学的解析の結果の比較

る。しかし、生化学実験で得られた V_{max} は 20.5bp/秒で、1 分子解析の結果の約 2.5 倍であった。この結果は DNA につけたビーズが抵抗となることで、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。

今後は、蛍光標識 ATP を用いて、ATP 加水分解反応を可視化し、ATP が 1 分子分解される間に移動する分岐点の距離、向い合った RuvB の ATP 加水分解のタイミングの共役などを調べていく予定である。また、蛍光標識 RuvB を作製し、RuvB が DNA 上で 6 量体リング構造を形成していく過程を可視化し、そのメカニズムを明らかにしていきたい。

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（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：RNA ポリメラーゼによる DNA 転写の分子機構に関する研究
Holliday 構造 DNA の分岐点移動反応の顕微鏡による直接観察

「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（原著論文）発表

- Takayuki Ohnishi, Takashi Hishida, Yoshie Harada, Hiroshi Iwasaki and Hideo Shinagawa
Structure-function analysis of the three domains of RuvB DNA motor protein.
J. Biol. Chem. 280, 30504-30510, 2005
- Yasuhiro Sasuga, Tomomi Tani, Masahito Hayashi, Hisashi Yamakawa, Osamu Ohara and Yoshie Harada
Development of a microscopic platform for real-time monitoring of biomolecular interactions.
Genome Research, 16, 132-139, 2006
- 貴家康尋, 原田慶恵
分子イメージングによる分子間相互作用解析法の開発
バイオテクノロジージャーナル 羊土社 Vol.5 No.3, 303-305, 2005