

「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

本年度は遺伝子-タンパク質間機能発現の高感度検出のための新しい系の開発を行った。

DNA は 2 本の DNA 鎖が撚り合わさった右巻き 2 重らせん構造をとるが、様々なタンパク質や化学物質の作用によって、らせんのねじれ量が変化する。例えば、DNA 上の遺伝情報が転写される際には、転写開始点付近の約 10 塩基対が解離して約 1 回転分らせんが巻き戻る。DNA の特異的な蛍光染色剤である臭化エチジウムは(EtBr)、塩基対の間に滑り込むようにして結合し、塩基対間の角度を 1 分子あたり約 26 度減少させ、その結果 DNA の 2 重らせんは巻き戻される。これらの構造変化は DNA の密度や電気泳動度の変化から予測さ

れていたが、1本のDNAが構造変化する様子を直接観察した例はなかった。最近、我々は1分子計測技術を用いて、転写開始やEtBrの結合に伴うDNAの巻き戻りを、顕微鏡下で直接観察することに成功した。我々が用いている実験方法の概略を図1Aに示した。2本鎖DNAの一端をスライドガラス表面に固定し、他端を微小なポリスチレンビーズに結合させる。DNAにねじれが生じると末端に結合させたビーズが回転する仕組みである。回転が観察しやすいように、ビーズが2個連結した双子ビーズを用いている。また、DNAのねじれが正確にビーズに伝わるように、

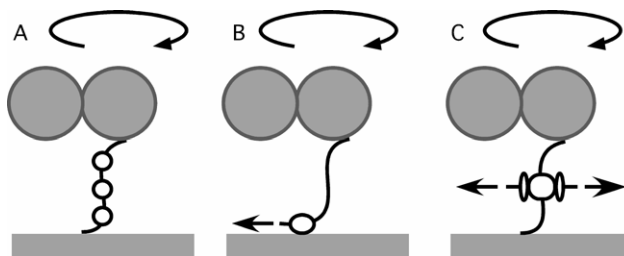


図1. DNAのねじれ運動観察系 (A) EtBrの結合、転写開始、(B) 転写伸長、(C) 分岐点移動。実際のDNAはもっと短い。

ビーズの直径(500nm)よりも短いDNA(150nm)を用いている。スライドガラスにDNAを結合させる方法やDNAの高次構造を工夫することで、RNAポリメラーゼの転写伸長反応や、RuvABによる分岐点移動反応を観察することができる(図1B,C)。

まず、この実験方法を用いて、DNAの巻き戻り量のEtBr濃度依存性を解析し、EtBrの結合定数、結合分子間の協同性係数を求めた。その結果、結合定数は文献値と一致したが、従来法では認められなかった負の協同性が検出された。これまで用いてきたビーズの回転角度の計測法は誤差が大きく、1/2回転程度の精度しかなかった。また、DNA毎の角度変化量にばらつきがあり、折角1分子での計測が可能になっても、信頼できる値を求めるためには数十本のDNAから得たデータを平均化する必要があった。

そこで、「1本のDNAだけを用いて、数十度程度の精度で、再現性よく、ねじれ量を計測する」ことを目的として、計測方法の改良を行った。この際、実験方法の簡便さを損なわずに、特別な装置を使わないという制約を課した。回転角度が正確に測定できない第一の原因として、ビデオ画像の残像の影響が考えられた。通常のビデオ画像は、物体の運動を滑らかに感じさせるために、1/60秒間隔の画像を重ね合わせて1/30秒毎に記録している。しかし、物体の位置を正確に測定するためには残像のない静止画像を用いる必要がある。そこで、汎用のCCDカメラで録画したビデオ映像から、画像処理ソフトを用いて1/60秒毎の静止画を再構成した(図2)。さらにカメラのシャッタースピードを上げることによって、より鮮明な画像を得ることができた。第二の原因として、熱揺らぎによるビーズのxy平面上のブラウン運動が考えられた。ビーズの回転角度を計測するためには、従来はビデオ映像からビーズの重心を求め、回転中心と考えられる点に対する移動角度を計算していた。しかし、xy方向のブラウン運動がビーズの回転半径よりも大きいと、回転角度が正確に計測できない。また、顕微鏡ステージの振動やドリフトも重心の計測に影響してしまうため、汎用の顕微鏡に特別な対策を施す必要があった。そこで本研究では、前述の画像処理ソフトを用いて、回転の目印である双子ビーズの長軸角度を直接求めることによ

って、ブラウン運動や振動、ドリフトの影響をほとんど受けずに、DNA のねじれ角度を正確に求めることに成功した (図 2)。以上の 2 つの工夫によって、1/60 秒毎に 5 度以下の誤差でビーズの回転角度を測定できるようになった。この方法を用いて、EtBr が DNA に結合する様子を観察したところ、DNA のねじれ量の EtBr 濃度依存性が、別々の DNA の間でもよく再現されることが分かった (図 3)。1 本の DNA から得られたデータを用いて、ねじれ量の EtBr 濃度依存性を解析したところ、結合定数は $1.9 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ で、DNA の塩基対数 $\times 0.6$ 分子の EtBr が結合し、負の協同性があることが分かった (図 4)。この観察から、EtBr は 2 塩基対に 1 分子以上結合することができるが、その結果生じる DNA の構造のゆがみが EtBr との結合を不安定にするために、負の協同性が生じると考えることができる。また、EtBr の結合解離が完全に可逆的であることも示すことができた (図 5)。

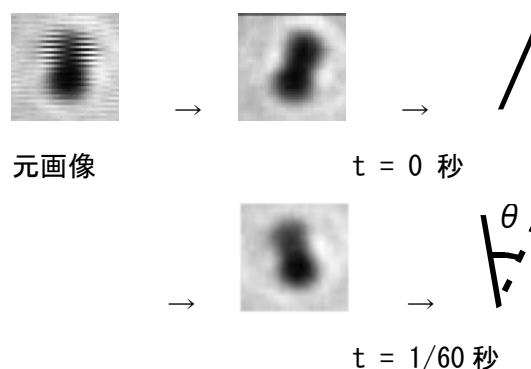


図 2. ビデオ画像から双子ビーズの回転角度 θ を計測する方法。

本年度の研究で、汎用の顕微鏡、CCD カメラ、ノートパソコンがあれば、DNA の構造変化が簡単に計測できるようになった。

DNA の長さやビーズのサイズを小さくすることによって、角度分解能、時間分解能をさらに向上させることも可能である。また本法を用い、1 本の DNA のねじれ運動を計測することで、DNA 結合物質が DNA を構造変化させるメカニズムを解析できる。本法は、ポリメラーゼ、ヘリカーゼ、相同組換え関連タンパク質等が DNA に作用するメカニズムの研究に、大いに役立つものと考えている。

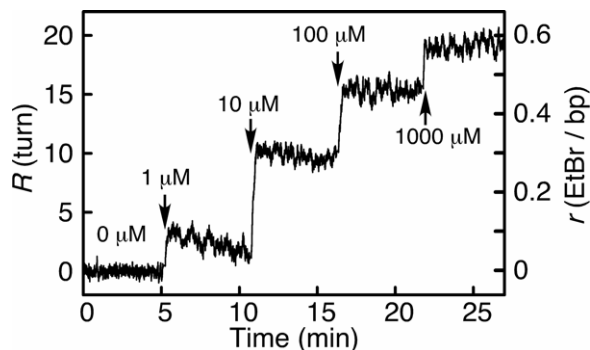


図 3. 1 本の DNA で計測したねじれ量の EtBr 濃度依存的な変化。

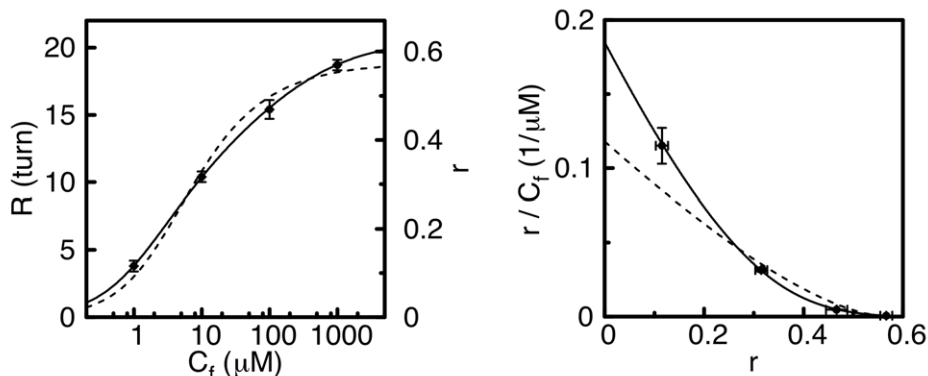


図 4. DNA の巻き戻り量の EtBr 濃度依存性。

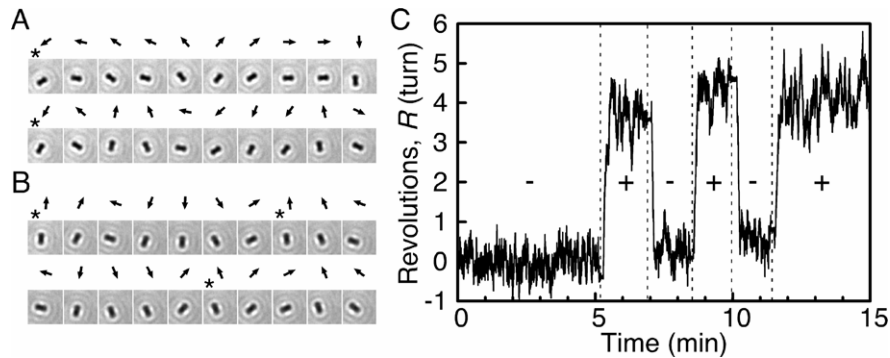


図5. EtBrによるDNAのねじれ変形の可逆性. EtBrの添加(+, A)と除去(-, B)を交互に行ったときのDNAのねじれ量の時間変化(C)。

3. 研究実施体制

(1)「1分子解析」グループ

①研究者名

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)

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

(2)「DNA分子モーター」グループ

①研究者名

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. 研究成果の発表等

(1) 論文発表(原著論文)

- Han, Y-W., Tani, T., Hayashi, M., Hishida, T., Iwasaki, H., Shinagawa, H. and Harada, Y. : Direct observation of DNA rotation during branch migration of Holliday junction DNA by Escherichia coli RuvA-RuvB protein complex, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103 (31), 11544-11548 (2006).
- Nishinaka, T., Doi, Y., Hashimoto, M., Hara, R., Shibata, T., Harada, Y., Kinoshita, K. Jr., Noji, H. and Yashima, E.: Visualization of RecA filaments and DNA by fluorescence microscopy, J. Biochem., 141(2), 147-156 (2007).