LECTURES

生理学実験法講座「1分子生理学」 DNAモーターの1分子機能解析

（財）東京都医学研究機構　東京都臨床医学総合研究所
原田　慶恵

I. はじめに

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．DNA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．これまでの研究は，もっぱら生化学的あるいは分子生物学的手法で行われてきたが，最近はもっと直接的にDNA分子モーターの動作原理にアプローチするために，1分子イメージング，1分子操作，1分子計測法などを使った実験が盛んに行われている．ここでは，DNAモーターの1分子機能解析実験のいくつかを紹介する．

II. RNAポリメラーゼ分子による転写の観察

1990年代はじめにLandickらは，RNAポリメラーゼ分子が転写に伴って，徐々にDNAをたぐり寄せる動きを，DNAの端に付けたビーズのブラウン運動の変化として観察するTethered particle motion（TPM）法を開発した［1］．TPM法では，まず，DNAとRNAポリメラーゼの転写複合体をつくる．試験管内で大腸菌のRNAポリメラーゼ分子と強力なプロモーター（T7A1）を持つ鋳型DNAを混ぜ，溶液にRNA合成に必要な4種類の基質ヌクレオチドのうちATP，GTP，CTPの3種類とApU dinucleotideを加えて転写を開始させる．この鋳型DNAは転写開始位置がAでその次がT（チミン）があるが，それ以降20塩基までTがない．溶液中にUTPがないので，RNAポリメラーゼは20塩基まで転写したところで一旦停止する．この転写複合体を図1のようにRNAポリメラーゼのところでガラス表面に固定する．DNAの片方の端には光学顕微鏡で観察することが可能な大きさ（通常は直径およそ1μm）のプラスチックビーズをつける．ビーズを付けるために，DNAの端にはあらかじめビオチンを付けておく．また，ビーズにはストレプトアビジンを共有結合させておく．ビオチンとストレプトアビジンが“のり”の役目をし，DNAとビーズがくっつく．ここまで準備が整ったら，この試料を顕微鏡下にセットして，DNAの端に付けたビーズの動きを観察する．ビーズはゆらゆらとブラウン運動している．しかし，ブラウン運動の範囲はポリメラーゼの位置からビーズがくっついている鋳型DNAの端までの長さで制限されている．ここで，4種類の基質ヌクレオチドがすべて含まれる溶液を流し込む．すると一旦止まっていた転写複合体の転写反応が再開し，ビーズのブラウン運動が変化していく．ビーズをDNAの下流（RNAポリメラーゼが転写していく方向の端）に付けた場合，RNAポリメラーゼによる転写が進むとRNAポリメラーゼがDNAをたぐり寄せるため，ビーズのブラウン運動の範囲はしだいに小さくなる（図1A）．もし，ビーズをDNAの上流に付けておけばブラウン運動の径は徐々に大きくなる．そしてその運動の範囲の変化から

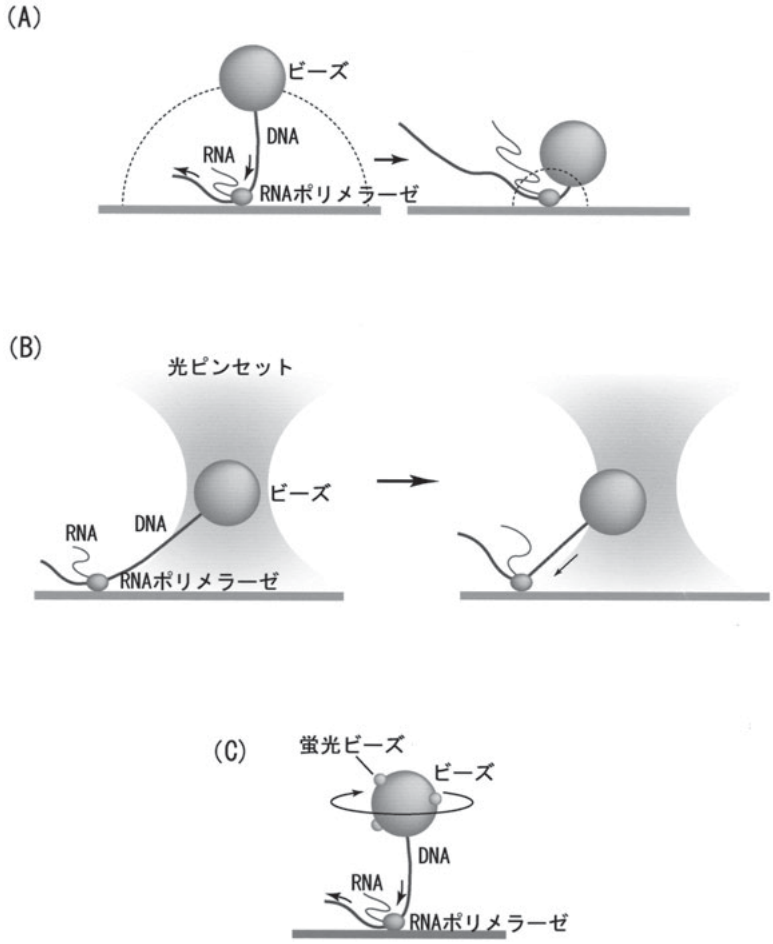

図1．DNAモーターの1分子機能解析実験の模式図I
(A) Tethered particle motion（TPM）法によるRNAポリメラーゼ1分子の転写の観察
(B) 1分子のRNAポリメラーゼが発生する力の測定
(C) RNAポリメラーゼによるDNAの回転の可視化

RNAポリメラーゼの転写速度を知ることができる．以上がTPM法である．この実験で求められたRNAポリメラーゼの転写の平均速度はおよそ10 塩基/秒で，同じ条件下での溶液中の大腸菌のRNAポリメラーゼの転写速度とほぼ同じ値であった．この方法は，複雑な装置を使うことなく，1分子の酵素が働いている様子を直接観察したという点で，非常に画期的である．

III. RNAポリメラーゼ分子の力の測定

TPM法と光ピンセットを組み合わせることによって，GellesとBlockらは大腸菌RNAポリメラーゼ1分子が転写中に発生する力の測定に成功した（図1B）[2, 3]．レーザーなどの非常に強い光を開口数の大きな顕微鏡の対物レンズを通して焦点に集束させると，焦点領域に大きな光強度勾配ができる．周りの溶媒より高い屈折率を持つ透明な粒子は，この勾配から生じる勾配力によって最も明るい点に引き寄せられる．一方粒子には勾配力と反対に光散乱力が働く．これら2つの力が釣り合った領域に粒子が捕捉される．これが光ピンセットである．DNAの下流端に付けたビーズ

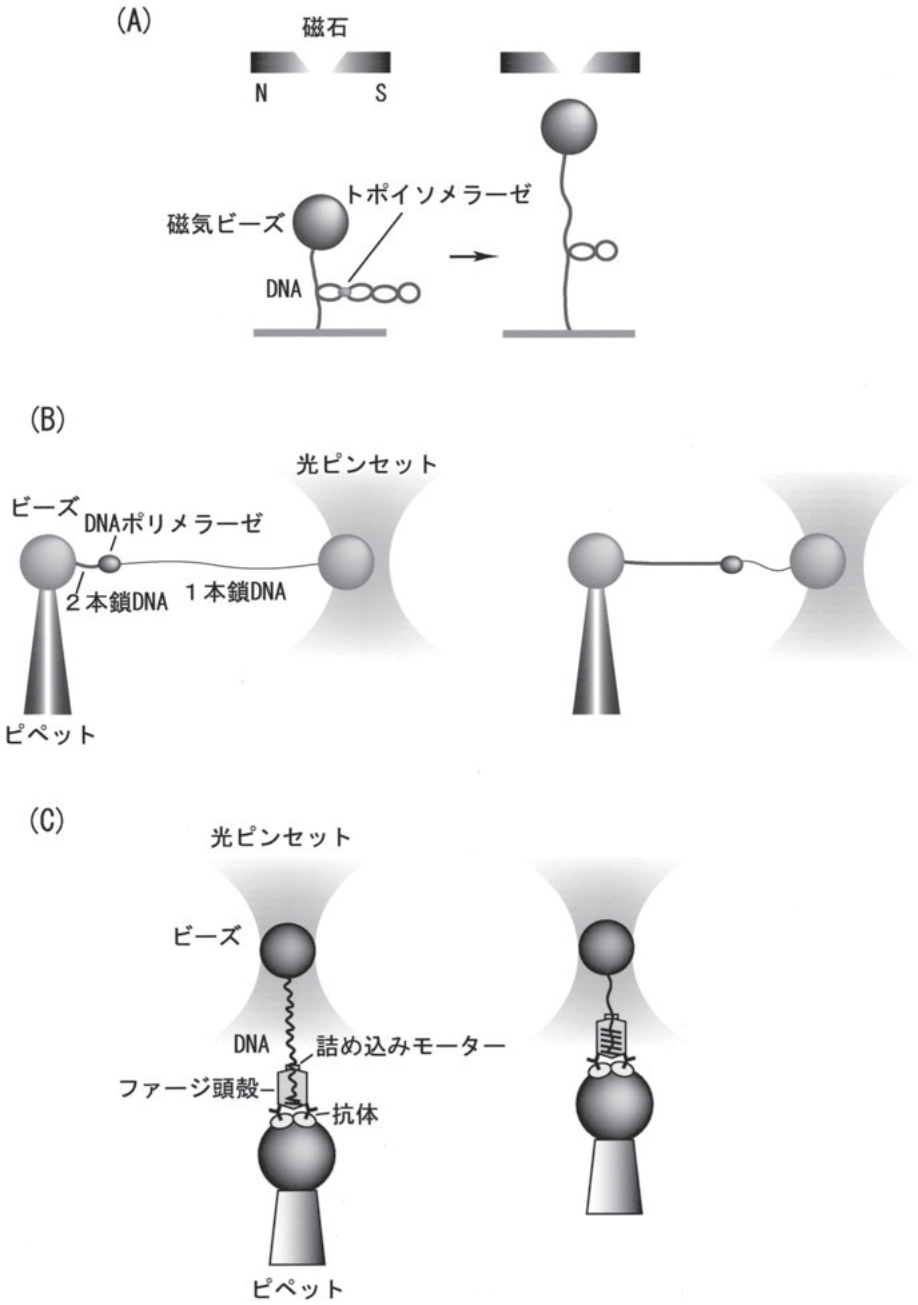

図2．DNAモーターの1分子機能解析実験の模式図II
（A）トポイソメラーゼによるDNAスーパーコイル解消の観察
（B）DNAポリメラーゼ活性の1分子解析
（C）ファージのDNA詰め込みの観察

を光ピンセットで捕まえる．光ピンセットの強さや位置を調節し，ビーズを介してDNAを様々な力で引っ張ることによって，RNAポリメラーゼに様々な負荷を与えて転写速度を測定し，負荷の大きさと転写速度との関係を明らかにした．基質ヌクレオチドがたっぷりある条件下でRNAポリメラーゼは最大25 pNの力でDNAを捕まえていることがわかった．この力は細胞骨格のモーターであるキネシン分子やミオシン分子が出す力と比べて数倍大きい．この値から計算すると，RNAポリメラーゼはRNA合成時にヌクレオチドを加水分解することによって得られる自由エネルギーを，非常に効率よく機械的な仕事に換えていることになる．

IV. RNAポリメラーゼによるDNAの回転の可視化

DNAはおよそ10.4塩基対で1ピッチの右巻き2重らせん構造をしている．そこで我々はRNAポリメラーゼがDNAのらせんをなぞりながら塩基を読みRNAを合成しているのか否かをTPM法を使って調べることにした（図1C）．DNAの端に付けるビーズに，ビーズの回転運動観察のための目印として小さな蛍光ビーズを付けておく．転写を開始させこのビーズの動きを観察した．すると，ビーズは一方向にくるくると回転した．ビーズの回転はRNAポリメラーゼがDNAをねじりながら転写することによっておこる．同じ溶液条件下で測定した転写速度とビーズの回転速度を比較した結果，RNAポリメラーゼはDNAのらせん構造をなぞりながらDNAをRNAに転写していることが明らかになった［4］．DNAの回転を直接見るのは難しいが，ビーズを付けることによってDNAの回転運動が拡大されるので，市販の蛍光顕微鏡を使って簡単に観察できたのである．

V. トポイソメラーゼによるDNAスーパーコイルの解消の観察

Strickらは，DNAの端に付けるビーズを磁気ビーズに代え，光ピンセットの代わりに磁石でDNAをひっぱったり，磁石を回転させることによってDNAをねじったりして大変興味深い実験を行った（図2A）．DNAの片端をガラス基板に固定し，もう一方の端に磁気ビーズをつけて磁石で上方向に引っ張る．磁石を回転させ，DNAをねじっていくとスーパーコイルができる．DNAの長さはスーパーコイルになった分だけ短くなる．数十回ねじって多くのスーパーコイルを作っておいたところにトポイソメラーゼII（トポII）とATPを加えると，トポIIがスーパーコイルを解消し，その分だけDNAは伸びていく．彼らは，DNAの長さ変化をビーズの像の変化から高感度に検出することによって，トポIIが1分子のATPを加水分解する間に，2つのスーパーコイルを解消する様子を観察することに成功した［5］．

VI. 2本鎖DNAと1本鎖DNAを見分ける

TPM法以外にもDNAモーターを調べるのに有効な方法が開発されている．同じ塩基数の1本鎖DNAと2本鎖DNAでは，それらを同じ力で引っ張った時，長さが異なる（6.5 pN以上の力では1本鎖DNAの方が長く伸びる）．Bustamanteらはこの性質を利用して，T7DNAポリメラーゼの活性を測定した（図2B）．まず，プライマーの付いた1本鎖DNAの両端にビーズを付ける．片方のビーズはピペットで，もう1つを光ピンセットで捕らえる．このようにして捕捉したDNA分子に常に一定の力がかかるように光ピンセットの位置を制御する．1本鎖DNAが2本鎖DNAに変わっていくにしたがって，DNAの長さは短くなっていくので，光ピンセットの位置がピペットの位置に近づく．記録された光ピンセットの位置の変化から，1本鎖DNAがDNAポリメラーゼによって2本鎖DNAに変えられる様子がわかる．この方法で彼らは，DNAポリメラーゼ1分子が最大34 pNの力を出すことを明らかにした［6］．

VII. ファージのDNA詰め込みモーター

バクテリオファージϕ29は42 × 54 nmの頭殻に，6.6 μmのDNAを詰め込む．詰め込み反応は，頭殻の入り口にある詰め込みモータータンパク質がATPを加水分解して得たエネルギーで駆動さ

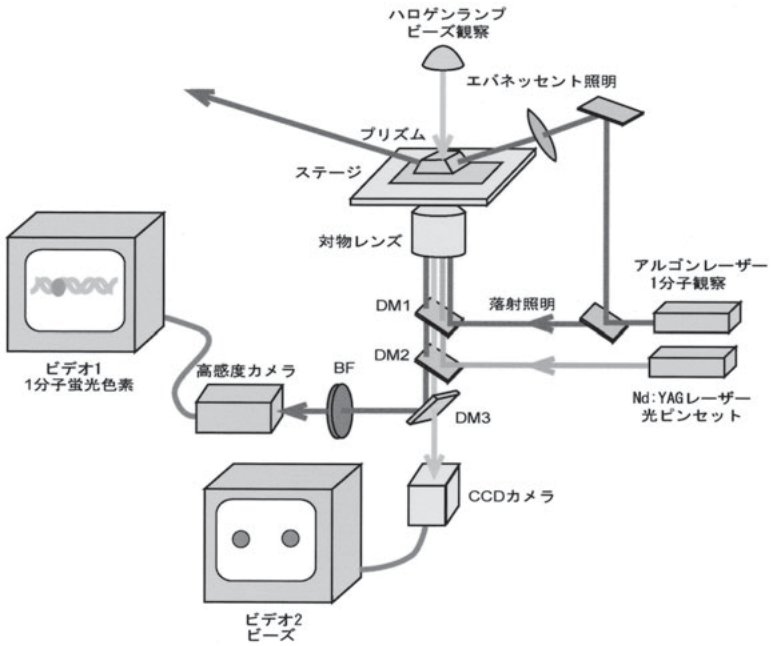

図3．1分子イメージング顕微鏡の概略図
蛍光色素Cy3は514.5 nmのアルゴンレーザーで励起する．蛍光像は高感度カメラで観察する．ビーズはハロゲンランプで照明してCCDカメラで観察しながら1,064 nmのNd：YAGレーザーの光ピンセットで捕捉する．

れる．DNAを結晶に近い密度で詰め込むために，このモータータンパク質分子はエントロピーや静電的反発や曲げのエネルギーに打ち勝たなければいけない．Bustamanteらは上の実験と同様の手法で，ファージが頭殻にDNAを詰め込む様子を観察した．少しだけDNAを詰め込ませたところで，反応を停止させたファージ頭殻―DNA複合体の取り込まれていない方のDNA端をビオチン―ストレプトアビジンを介して，ビーズにくっつけ，光ピンセットで捕らえる．もう一方のファージの頭殻が付いた端を抗体を介してビーズに付け，ピペットで捕らえる（図2C）．ここにATPを含む溶液を加え，詰め込み反応を再開させる．ビーズに常に一定の負荷がかかるように光ピンセットの位置をコントロールする条件や，詰め込むに従って負荷が増していくような条件で詰め込みによる2個のビーズ間の距離の変化を測定した．その結果，5 pNの負荷をかけた条件下でおよそ1.5 μm/minの速度でDNAが詰め込まれた．また，このモーターは平均57 pNの負荷に抗して働くことができることや，DNA詰め込み速度は頭殻がDNAで詰め込まれるに従って詰め込み速度が遅くなることなどが明らかになった［7］．

VIII．DNA-RNAポリメラーゼ相互作用の1分子イメージング

これまで紹介した実験はすべてDNAモーター分子を直接観察するのではなく，ビーズの動きを測ることによってモーター分子の性質を調べるものであった．最後に，蛍光色素で標識したRNAポリメラーゼ分子を直接観察した実験について紹介する．

我々は，従来の蛍光顕微鏡の照明法とは全く異なる，光の全反射によるエバネッセント照明法を導入することで，水溶液中の蛍光色素1分子を明るい輝点として観察できる1分子イメージング顕微鏡を開発した（図3）［8］．励起用のレーザーを斜めに照射する，入射角がある角度以上になる

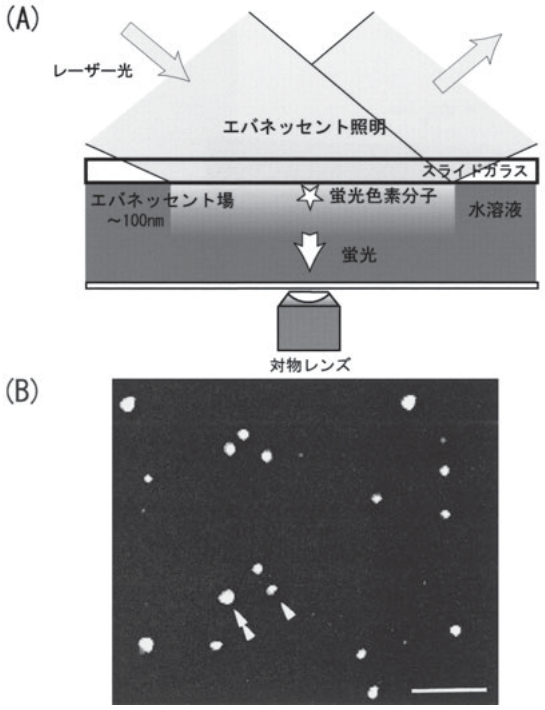

図4．蛍光色素の1分子観察
(A) エバネッセント蛍光顕微鏡法の説明図
屈折率の高いスライドガラスから屈折率の低い水溶液にレーザーを浅い角度で入射すると全反射する．このとき，界面の水溶液側に少しだけ（～100 nm）光がしみだす．これをエバネッセント場という．この光を利用して，蛍光色素の局所励起を行うことができる．
(B) 蛍光色素1分子のイメージング
蛍光色素Cy3で標識したタンパク質分子をエバネッセント蛍光顕微鏡で観察した1/30秒のビデオ像．矢頭1個，2個で示したスポットがそれぞれ蛍光色素1分子，2分子で標識されたタンパク質分子である．色素が発する蛍光を像として捉えるので，星と同じように，スポットの大きさは分子の大きさとは関係がない．バーは5μm.

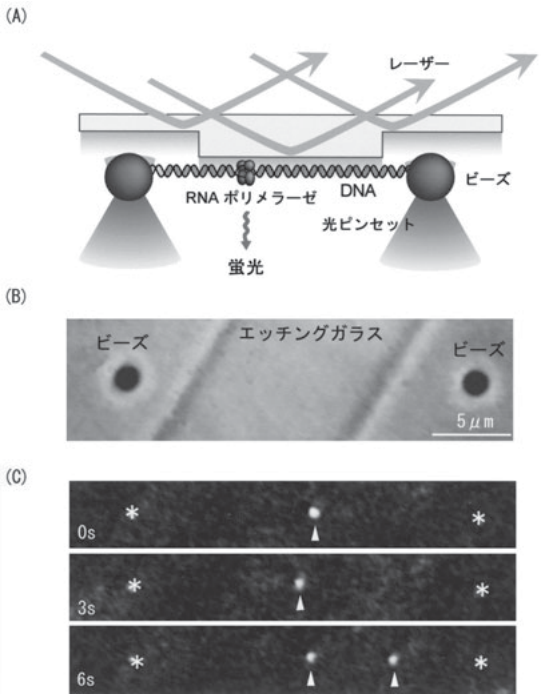

図5．DNA-RNAポリメラーゼ相互作用の1分子イメージング
(A) 実験方法の模式図
(B) 明視野像．光ピンセットで捕捉した2個のビーズが見える．ビーズの間の斜めの帯はエッチングしたスライドガラス．スケールバーは5μm.
(C) (B) と同じ視野の蛍光像．矢頭で示したスポットがDNAに結合したRNAポリメラーゼ分子．DNAは蛍光色素で標識していないので見えない．＊はビーズの位置を示す．数字は秒単位の時間.

と，ガラスと水の屈折率の違いから，レーザーはスライドガラスと水溶液の界面で全反射する．その時，エバネッセント光と呼ばれる光が水溶液側に発生する．エバネッセント光は光強度が1/eになる深さが約150 nmである．したがって，エバネッセント照明ではスライドガラス表面近傍のみが局所励起される（図4）．そのため，水溶液からのラマン散乱や水溶液中の蛍光色素による背景光を抑えることができる．また，照射系と結像系が完全に分離されているので光学部品の発する背景光も最小にできる．この照明法により，ビデオレート（ビデオは1秒間に30フレームなので，ビデオの時間分解能はおよそ33ミリ秒）で1分子のイメージングが可能になった．

RNAポリメラーゼをその機能を損なわないように蛍光色素で標識すれば，1分子イメージング顕微鏡を使って1本のDNAに，個々のRNAポリメラーゼ分子が相互作用する様子を観察できるはずである．DNAは溶液中では縮んでいるので，DNA上のタンパク質分子の動きを観察するのには不都合である．そこでまず，1分子イメージン

グ顕微鏡システムと光ピンセットを組み合わせて，両端をビオチンで標識した1本のDNAをストレプトアビジンビーズで操作し溶液中に伸展させる方法を確立した．DNAに結合したポリメラーゼ分子を可視化するためには捕捉したDNAをエバネッセント領域内で保持しなければならない．エバネッセント領域はガラス表面から100 nm程度の深さなので，直径1 μmのビーズが障害なる．そこで，ガラス表面をエッチングし，ビーズが邪魔にならないように工夫した（図5）．そこに，蛍光色素で標識したRNAポリメラーゼを加える．このようにして，1本のDNA と相互作用している個々の蛍光標識RNAポリメラーゼ分子を観察することができるようになった．観察結果からRNAポリメラーゼのDNAへの非特異的及び特異的結合の結合速度,解離速度定数を求めた．また，RNAポリメラーゼ分子のDNA上を1次元拡散することやDNAを伸展した時よりも，弛緩状態のDNAに結合しやすいことなどが分かった[9]．

IX. おわりに

最近ここで紹介したT7DNAポリメラーゼや原核生物のRNAポリメラーゼ，また，それらとDNAやヌクレオチドとの複合体などのX線結晶構造が高い分解能で解かれて，機能に重要な残基や金属イオンが酵素触媒効率や正確さにどのように寄与しているのかなどが議論されている．構造が明らかになることで，個々の分子が機能するときどのような動きをしていそうか，ということがイメージできるようになる．そしてそのイメージが1分子機能解析の実験へとつながっていく．DNAモーターの構造とDNAに沿って動くメカニズムとの関係の解明に1分子機能解析の研究が貢献し，近い将来それらの分子メカニズムが解明されることが期待される．

文　献

1. Schafer DA, Gelles J, Sheetz MP & Landick R : Transcription by single molecules of RNA polymerase observed by light microscopy. *Nature* 352, 444–448, 1991.
2. Yin H, Wang MD, Svoboda K, Landick R, Block SM & Gelles J : Transcription against an applied force. *Science* 270, 1653–1657, 1995.
3. Wang MD, Schnitzer MJ, Yin H, Landick R, Gelles J & Block SM : Force and velocity measured for single molecules of RNA polymerase. *Science* 282, 902–907, 1998.
4. Harada Y, Ohara O, Takatsuki A, Itoh H, Shimamoto N & Kinosita K Jr : Direct observation of DNA rotation during transcription by *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nature* 409, 113–115, 2001.
5. Strick TR, Croquette V & Bensimon D: Single-molecule analysis of DNA uncoiling by a type II topoisomerase. *Nature* 404, 901–904, 2000.
6. Wuite GJL, Smith SB, Young M, Keller D & Bustamante C : Single-molecule studies of the effect of template tension on T7 DNA polymerase activity. *Nature* 404, 103–106, 2000.
7. Smith DE, Tans SJ, Smith SB, Grimes S, Anderson DL & Bustamante C : The bacteriophage ϕ29 portal motor can package DNA against a large internal force. *Nature* 413, 748–752, 2001.
8. Funatsu T, Harada Y, Tokunaga M, Saito K & Yanagida T : Imaging of single fluorescent molecules and individual ATP turnovers by single myosin molecules in aqueous solution. *Nature* 374, 555–559, 1995.
9. Harada Y, Funatsu T, Murakami K, Nonoyama Y, Ishihama A & Yanagida T : Single molecule imaging of RNA polymerase-DNA interactions in real time. *Biophys. J.* 76, 709–715, 1999.