トピックス

相同組み換えタンパク質による DNA ねじり運動の実時間計測

新田英之 独立行政法人理化学研究所基幹研究所

1. はじめに

DNA 相同組み換えは遺伝暗号の維持 (DNA 修復) と多様性の調整 (突然変異) にとって必要不可欠な機構である¹⁾。哺乳類における相同組み換えの中心的役割を果たすタンパク質が Rad51 である²⁾。Rad51 は DNA に重合 (polymerization) する際 1 分子あたり DNA を伸長方向に 1 nm 程度伸ばすことがわかっているが、1 nm の精度で DNA の伸長を測定することは困難であり、タンパク質 1 分子が DNA に及ぼす挙動の直接計測は不可能であった。一方で回転方向にはタンパク質 1 分子あたり 30 度～75 度の角度で DNA をねじることが結晶解析などから予測されていた²⁾。つまり、回転方向の挙動を計測することにより、タンパク質 1 分子が DNA に及ぼす挙動の高感度解析が期待できる。

生体試料を分子レベルで操作・計測する技術として、光ピンセット、磁気ピンセット、AFM、流速による操作などがあげられる。DNA の長さや伸長運動の計測は光ピンセットや磁気ピンセットにより可能である。筆者らの研究グループでも、水平方向の磁界を発生する磁気ピンセットを用い、多数の Rad51 タンパク質による DNA 伸長の実時間計測を行ってきた³⁾。一方でねじり方向の計測は磁気ピンセットと蛍光ビーズを組み合わせたシステム⁴⁾や、垂直軸を中心に軸対称な磁界を発生する磁気ピンセットで実現した例⁵⁾があるが、いずれも測定精度は回転数程度であった。

以下、磁気ピンセット Free Rotation Magnetic Tweezers (FRMT) を用いた独自の実験系による筆者らの取り組み⁶⁾を紹介する。

2. FRMT を用いた DNA ねじり運動計測システム

著者らが製作した実験系の概要を図 1 に示す。ガラス基板と微細加工を施した PDMS (シリコン樹脂) を張り合わせることで製作した、幅 2 mm、高さ 100 μm 、長さ 2 cm のマイクロ流路を生化学実験に用いた。実験に用いたミュータント DNA (14.4 kbp) の一端はジ

ゴキシングニン修飾 (約 600 bp) されており、ガラス基板にコートされた抗ジゴキシングニンに特異的に結合する。もう一端はビオチン修飾 (約 820 bp) されており、ストレプトアビジンコートされた直径 2.8 μm の磁気ビーズと特異的に結合する。先端に円錐形の鉄を結合した円柱形のネオジウム永久磁石を流路の上から近づけると、磁気ビーズに垂直方向に力が働き DNA が伸長される。磁石が作る磁界は垂直方向に勾配があるが、垂直軸に対し対称であるため、磁気ビーズには垂直方向に力が働くが、回転方向には自由である。回転方向の運動を正確に測定するため、直径 800 nm のポリスチレンビーズを磁気ビーズに複数付着させた。

この測定系では明視野での観測が可能であることや、磁気ビーズの直径が従来の系よりも大きく、水平方向のブラウン運動の影響が相対的に小さいなどの利点により、5 度の精度での DNA のねじり運動実時間計測を実現した。

図 1 FRMT 実験システムの概要。(a) 手作り倒立顕微鏡上の PDMS 流路と永久磁石。(b) 流路断面図。(c) 流路内で 2 重鎖 DNA 1 分子を磁気ビーズとガラス基板に特異的に結合する。磁気ビーズは垂直方向に力が働くが、回転方向に対しては自由である。(d) Rad51 が DNA に重合する際に起こる磁気ビーズ回転運動の顕微鏡下明視野スナップ写真。(電子ジャーナルではカラー)

Real-time Imaging of DNA Twisting during Rad51 Polymerization

Hideyuki ARATA

Curie Institute, Section of Physical Chemistry/RIKEN, Advanced Science Institute

3. Rad51 による DNA ねじり運動の実時間計測

タンパク質濃度が 75 nM 以下の低濃度で Rad51 1 分子の重合による 65 度のステップ状のねじり運動が確認できた (図 2). Rad51 の重合は 1 分子単位で起こるか⁷⁾, 複数の分子単位で起こるか⁸⁾ という議論に対し, 前者が正しいことを直接証明した. この 1 分子ごとの重合は DNA 修復にとって効率のよい機能であることを確認した. また, タンパク質 1 分子あたり 3.5 塩基対に対応するという構造解析上重要なパラメータも得ることができた. 重合開始の限界濃度 (100~150 nM)⁹⁾ や DNA からの解離現象 (depolymerization)¹⁰⁾ などとも先行研究と一致した現象が確認された.

図 2 相同組み換えタンパク質 Rad51 による DNA ねじり運動. (a) 自作のソフトウェアで解析した回転角度の経時変化で, ステップ状の挙動が観測された. 上から順に, Rad51 の濃度は 10 nM, 75 nM, 50 nM である (注意: 短い時間スケールにおいては, 濃度と回転速度の間に必ずしも相関はない). (b) ステップ幅のヒストグラムから, タンパク質 1 分子あたり平均 65 度 DNA をねじることが確認された. 文献 6 の図を改変. (電子ジャーナルではカラー)

4. おわりに

磁気ピンセット FRMT を用いた独自の実験系を製作することにより, タンパク質 1 分子が DNA に及ぼすねじり運動の実時間計測を 5 度の精度で可能とした. Rad51 タンパク質は DNA に 1 分子ごとに重合し, その際 65 度の角度で DNA をねじることが判明した. この成果は DNA 修復機構における構造と機能を理解する上で重要な情報である. また開発した実験系は種々の DNA 結合タンパク質の 1 分子解析への応用が可能であり, 当分野における強力なツールとなることを願っている.

謝 辞

これらの研究は筆者がキュリー研究所物理化学部門在籍時に, おもに J. L. Viovy 教授や G. Cappello 博士らとの共同研究により遂行された. 共同研究者であるキュリー研究所の A. Dupont, J. Mine-Hattab, L. Disseau, J. L. Viovy, G. Cappello 各氏, ナント大学 A. Renodon-Corniere, 高橋正行各氏, 同僚の P. Pierobon, J. F. Joanny, 故 P.-G. de Gennes 各氏に感謝する.

文 献

- 1) Sung, P., Klein, H. (2006) Nat. Rev. Mol. Cel. Biol. 7, 739-750.
- 2) Ogawa, T. *et al.* (1993) Science **259**, 1896-1899.
- 3) Mine, J. *et al.* (2007) Nucleic Acids Res. **35**, 7171-7187.
- 4) Gore, J. *et al.* (2006) Nature **439**, 100-104.
- 5) Harada, Y. *et al.* (2001) Nature **409**, 113-115.
- 6) Arata, H. *et al.* (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 19239-19244.
- 7) Joo, C. *et al.* (2006) Cell **126**, 515-527.
- 8) Van der Heijden, T. *et al.* (2007) Nucleic Acids Res. **35**, 5646-5657.
- 9) Hilario, J. *et al.* (2009) Proc. Natl. Acad. Sci. USA **106**, 361-368.
- 10) Van Mameren, J. *et al.* (2008) Nature **457**, 745-748.

新田英之

新田英之 (あらた ひでゆき)

独立行政法人理化学研究所特別研究員. 2002 年東京大学工学部電気工学科卒. 08 年同博士課程修了. 工学博士. 04 年以降イギリス王立化学会 (RSC) 論文レフリー. 05-06 年および 08-09 年キュリー研究所 (パリ) 物理化学部門 Research Associate. 06-10 年日本学術振興会特別研究員 (DC2, PD). 10 年ハーバード医学部/マサチューセッツ工科大学ー医療科学技術部門 Postdoctoral Affiliate. 10 年 12 月より現職.
研究内容: ナノバイオ工学, 1 分子生物物理, Lab on a Chip.
連絡先: 〒351-0106 埼玉県和光市広沢 2-1-W408
E-mail: h.arata@riken.jp