

単一分子計測を用いた DNA-タンパク質間相互作用の解析



羽 瀧 聡 史

1 はじめに

約 20 年前に単一分子を光学的に検出することが初めて可能になり¹⁾, それ以来, 単一分子計測は様々な分野への応用が広がり続けている。微量分析はもちろん, 近年では材料科学の分野などにおいてもその重要性は増すばかりである²⁾³⁾。単一分子計測の利点が最も生かされる分野の一つとしてタンパク質を中心とした生体分子がかかわる現象の解明が挙げられる。本稿では, 単一分子計測の必要性について簡単に解説した上で, 単一分子計測を用いた DNA 上でのタンパク質の動きの解析に関する近年の研究進展について紹介する。

2 なぜ単一分子計測か?

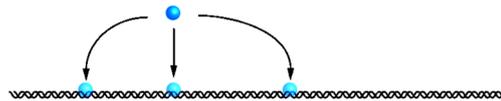
分子を一つずつ観測すると, 集合系の測定では得られない情報を得られるとされているが, 実際にどのようなことがわかるのであろうか? まず, 分子集団に存在する個々の分子を測定すると, 化学的に全く同一で均質に見える分子の集団においても, 観測されるパラメータに必ず分布が生じる。これは, static disorder と呼ばれ, 自由度を多く持つ分子ほど顕著に表れる。このように, 対象とする系が本質的に持つ不均一性は単一分子計測を通してのみ得られる情報である。次に, 分子集団に存在する一つの分子を測定し続けると, 時間とともに観測されるパラメータが変化する。これは dynamic disorder と呼ばれ, 人為的にある現象を同期させられない場合, 単一分子計測を通してのみ得られる情報である。これら二つの disorder に関する知見は単一分子計測を行うことによるのみ得ることができる⁴⁾。

ここまでの議論からも明らかなように, 単一分子計測は, フレキシビリティを持った分子あるいは系に対して適応したときに最もその威力を発揮することになる。DNA とタンパク質の相互作用に関する研究は, 単一分子計測の威力が最大限発揮される系といえる。

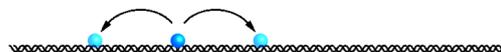
3 DNA 上でのタンパク質の動き

タンパク質が DNA 上の特定のサイトに達するメカニズムは, 生物学の根本的な問題として重要である。これまでに, 図 1 に示すようないくつかのモデルが提案されている⁵⁾⁶⁾。多くの場合, タンパク質は三次元拡散と

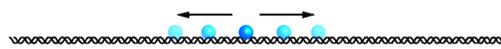
A. 三次元的ランダムな衝突



B. ホッピング



C. スライディング



D. セグメント間移動

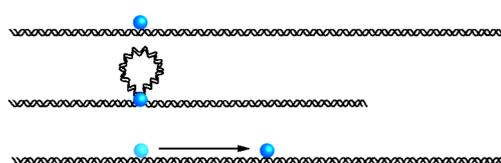


図 1 タンパク質が DNA 上の特定サイトを探すメカニズム

これに続く確率論的衝突 (図 1A) によって得られる速度をはるかに超える速さでターゲットとなるサイトに達する⁷⁾。この現象を説明するために, 図 1B のような, DNA に沿ってタンパク質が解離と結合を繰り返しながら一次的にホッピングするモデルが提案されている。このほかにも, 両者が接触したままタンパク質が一次的に移動するスライディングモデル (図 1C), DNA のループ構造を介したセグメント間移動 (図 1D) などが提案されており, これらの組み合わせで実際には特定サイトに効率よく達すると考えられている。また, 本稿では紹介しないが, ATP 加水分解によって生じるエネルギーによって駆動される能動的移行も重要な要素となる^{8)~10)}。これらのモデルは, これまで実験的に検証することが困難であったが, 単一分子計測技術の発展により, 近年ようやくこれらの現象を直接捕えることが可能になってきた。

4 フローストレッチング法を用いた解析

DNA とタンパク質の相互作用を直接単一分子ごとに測定するための手法は, 大きく二つに分類できる。一つは, タンパク質の動きによって生じた力を計測するタイプの手法であり, 光ピンセットなどがこれに相当する。これらの手法は非常に高い空間分解能を持ち, タンパク質の動きを一塩基対の分解能で計測することも可能になっている¹¹⁾。ただし, これらの手法はスループットが低く, 力の変化として読み出せない現象には適用できないという側面も持つ。一方, 蛍光イメージングをベースとした手法では, 分子の動きを直接可視化することが可能となり, また比較的高いスループットを容易に得ることができる。近年, 蛍光イメージングとフローストレッチ法を組み合わせることによって, タンパク質分子の DNA 上での動きを直接測定できるようになってきている^{12)~14)}。本稿ではこの手法を用いた最近の研究を紹介する。

フローストレッチング法を模式的に図 2 に示す。50 kb 程度の長さの DNA を片方の末端でガラス基板上に固定する。この基板上に溶液をフローすることによって

Single-Molecule Studies on DNA-Protein Interaction.

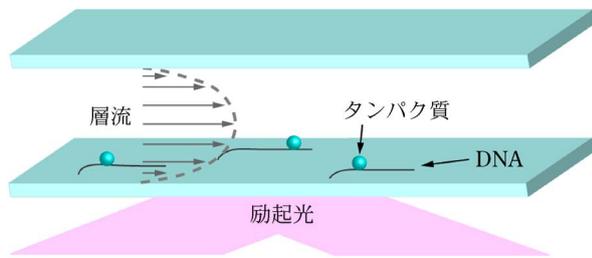


図2 フロースストレッチング法の模式図

生じるドラッグフォースを利用して、DNAを伸ばすことが可能になる。一般的に溶液のフローによってDNAに働く力は1 pN程度なので、タンパク質とDNAの相互作用を妨げることなく、且つDNA自身のブラウン運動を数十ナノメートル程度におさえることができる。このように基盤に固定され引き伸ばされたDNA上で、蛍光ラベル化した単一タンパク質の動きを高感度CCDカメラで計測することによって、分子の動きを直接検出することが可能となる。この手法を用いると、多数のイベントを同時に計測することが可能なため、スループットの高い測定ができる。

この手法を使って、Graneliら¹³⁾はDNA修復タンパク質Rad51が、Wangら¹⁴⁾はLacIリプレッサーが、DNA上をランダムな一次元拡散することを明らかにした。Blaineyら¹²⁾は同様の手法を用いて、DNA修復タンパク質hOgg1について検討し、やはりランダムな一次元拡散として表わされることを明らかにした。彼らはさらに、一分子計測から得られた拡散定数の塩濃度依存性から、この拡散はDNA上でのhOgg1のスライディングによるものであることを明らかにした。また、得られた拡散定数 ($4.8 \times 10^6 \text{ bp}^2\text{s}^{-1}$) は、タンパク質がヘリックスの軸に対して回転しながらスライディングしていることを示唆している。このモデルを用いてスライディングの活性化エネルギーを計算すると $1 k_B T$ 程度になり、この結果はタンパク質がDNA上でほとんどバリアのないスライディングをしていることを示している。これらの結果は、DNA上の特定のサイトを効率よく探すため、これらのタンパク質は非特異的にDNAと相互作用しながら一次的に移動していることを明確に示している。

これらに続く報告も、基本的にはランダムな一次元拡散をベースとしたモデルを支持している^{15)~18)}。Komazin-Meredithら¹⁷⁾は、プロセシビティブクターUL42のDNA上での移行を検討し、DNA上での拡散係数が塩濃度の増加に伴い大きくなることを見いだした。この結果はUL42がDNA上をホッピングすることによって移行していることを示している。一方、Tafviziら¹⁸⁾は、がん抑制の転写因子p53について検討し、DNA上での拡散係数が塩濃度に依存しないことから、このタンパク質がスライディングによってDNA上を動いていることを明らかにした。Bonnetら¹⁶⁾は、制限酵素EcoRVがスライディングと三次元的ランダムな衝突との組み合わせでDNA上を移動していることを明らかにした。これらの研究は、DNAとタンパク質の相互作用に関する本質的に重要な点を明らかにするために、単一分子計測が非常に有効な手法となることを明確に示している。

5 おわりに

本稿で紹介したように、単一分子計測を用いたDNA

とタンパク質の相互作用に関する研究は飛躍的に進んでいるが、今後の課題も多い。現段階では分解能は数十ナノメートルであるが、これを改善することで拡散のモデルをより詳細に検討できるようになると期待される。さらに重要な点としては、これまでの研究はすべて、タンパク質がターゲットとするサイトを持たないDNAを用いて行われている。実際にターゲットとなるサイトを持つDNAを用いることによって、特定のサイトをタンパク質が探し出すメカニズムを確定できることが期待される。生物学的に重要な多くの現象は、複数のタンパク質が相互作用しあう条件で起こる。現段階では比較的単純な系のみを対象としているが、複数のタンパク質がかかわるより複雑な系への応用も期待される。

文 献

- 1) W. E. Moerner, L. Kador: *Phys. Rev. Lett.*, **62**, 2535 (1989).
- 2) M. B. J. Roeflaers, G. De Cremer, H. Uji-i, B. Muls, B. F. Sels, P. A. Jacobs, F. C. De Schryver, D. E. De Vos, J. Hofkens: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 12603 (2007).
- 3) A. Zurner, J. Kirstein, M. Doblinger, C. Brauchle, T. Bein: *Nature*, **450**, 705 (2007).
- 4) J. Zlatanova, K. van Holde: *Mol. Cell*, **24**, 317 (2006).
- 5) D. M. Gowers, G. G. Wilson, S. E. Halford: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 15883 (2005).
- 6) J. Gorman, E. C. Greene: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **15**, 768 (2008).
- 7) A. D. Riggs, S. Bourgeois, M. Cohn: *J. Mol. Biol.*, **53**, 401 (1970).
- 8) R. Seidel, J. van Noort, C. van der Scheer, J. G. P. Bloom, N. H. Dekker, C. F. Dutta, A. Blundell, T. Robinson, K. Firman, C. Dekker: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **11**, 838 (2004).
- 9) P. J. Pease, O. Levy, G. J. Cost, J. Gore, J. L. Ptacin, D. Sherratt, C. Bustamante, N. R. Cozzarelli: *Science*, **307**, 586 (2005).
- 10) M. Spies, I. Amitani, R. J. Baskin, S. C. Kowalczykowski: *Cell*, **131**, 694 (2007).
- 11) E. A. Abbondanzieri, W. J. Greenleaf, J. W. Shaevitz, R. Landick, S. M. Block: *Nature*, **438**, 460 (2005).
- 12) P. C. Blainey, A. M. van Oijent, A. Banerjee, G. L. Verdine, X. S. Xie: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 5752 (2006).
- 13) A. Graneli, C. C. Yeykal, R. B. Robertson, E. C. Greene: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 1221 (2006).
- 14) Y. M. Wang, R. H. Austin, E. C. Cox: *Phys. Rev. Lett.*, **97**, 048302 (2006).
- 15) J. H. Kim, R. G. Larson: *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3848 (2007).
- 16) I. Bonnet, A. Biebricher, P. L. Porte, C. Loverdo, O. Benichou, R. Voituriez, C. Escude, W. Wende, A. Pingoud, P. Desbailles: *Nucleic Acids Res.*, **36**, 4118 (2008).
- 17) G. Komazin-Meredith, R. Mirchev, D. E. Golan, A. M. van Oijen, D. M. Coen: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 10721 (2008).
- 18) A. Tafvizi, F. Huang, J. S. Leith, A. R. Fersht, L. A. Mirny, A. M. van Oijen: *Biophys. J.*, **95**, L1 (2008).



羽淵聡史 (Satoshi HABUCHI)

東京工業大学大学院理工学研究科 (〒152-8552 東京都目黒区大岡山2-12-1-S8-44) 北海道大学大学院理学研究科博士課程修了。博士(理学)。《現在の研究テーマ》単一分子計測を用いた高分子、蛍光タンパク質の機能解析。《主な著書》“Surface-Enhanced Raman Scattering” (分担執筆) (Springer)。《趣味》旅行、絵画鑑賞、ポストンレッドソックス。
E-mail: habuchi.s.aa@m.titech.ac.jp