

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22570156

研究課題名（和文） DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステムを用いた多分子モータ間の協調機構解明

研究課題名（英文） Coordination mechanism of multiple motor proteins: a DNA-protein hybrid nanosystem study

研究代表者

多田 隈 尚史（TADAKUMA HISASHI）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教

研究者番号：10339707

研究成果の概要（和文）： 生体システムでは多数の分子が協調して機能している。しかし、従来は、分子の数や種類、空間配置を自在にコントロールする技術が確立していなかったため、その詳細なメカニズムには未解明の部分が多い。本研究では、DNA の 2 次元構造物(DNA-tile) 上に多数の蛋白質分子を固定した"DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステム"を構築し、複数モータ蛋白質による輸送顆粒の分子間協調メカニズムを探り、そのメカニズムのいったんを明らかにした。

研究成果の概要（英文）： The motor protein kinesin drive vesicle transport in the cell using energy derived from ATP. However, how multiple kinesin are coordinated each other remains elusive. Here we created a hybrid nanomachine (DNA-Tile-kinesin) using DNA-Tile as the skeletal structure and kinesin as the functional module. Single molecule imaging of DNA-Tile-kinesin hybrid allowed us to evaluate the effects of the number of molecules involved in the transport and nanometer changes in the distance between multiple kinesins on motility. Our results show that number of kinesin participating in the transport affect on run length but not on velocity. These results indicate the power of our approach toward the understanding of coordination mechanism of motor proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：1分子計測・操作、ナノマシン、蛋白質、核酸

## 1. 研究開始当初の背景

生体内では、物質の輸送・細胞分裂など、様々な現象に、多種・多数のモータ蛋白質が関わっている。しかし、従来は、分子の数や種類、空間配置を自在にコントロールする技術に乏しかった。我々は、自己集合能を持ち、サ

ブナノメートル単位で長さ調節ができ、かつ配列情報を用いて位置情報を持たせることが可能なDNAを2次元・3次元の構造物の骨組みとして使い、機能を持った蛋白質を自在に配置する事で、この壁を破れるのではないかと考えた。手始めに、2つのキネシンモ

ータ蛋白質の頭部機能ドメインを DNA で接続した 2 種類のハイブリッドナノマシン (DNA-キネシン) を作製したところ、連続歩行する様子が観察できた。この実験系を用いて、頭部間の距離や、頭部間にかかる張力がキネシンの運動活性に与える影響を評価した結果、キネシンの C 末端を介して頭部間に適度な張力がかかる事が、連続歩行に重要である事を示した(宮菌ら、*EMBO J*2010)。本研究では、この実験系を更に発展させ、多種・多数の分子間の協調メカニズムの解明を目指した。

## 2. 研究の目的

近年、進展著しい DNA ナノ構造物 (DNA-tile) の上に蛋白質分子を配置した、DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステムを構築し、多分子のモータ分子間の協調メカニズムを解明する。また、DNA-tile 上にモータ蛋白質以外の物も結合させ、システム化できる可能性を具現化し、転写・翻訳系に応用する為に、固定化用の試料 (RNAP とリボソーム) を構築する。

## 3. 研究の方法

(1) DNA-tile 上に蛋白質分子を配置するために、近年開発された DNA-Origami-tile (Rothemund *Nature* 2006) を用いて長方形 (90x60 nm) の DNA ナノ構造物 (DNA-tile) を作成し、特定の場所に蛋白質結合用の手を導入する。DNA-Origami-tile では、1 本の長い DNA 鎖 (M13 -1 本鎖プラスミド: 7, 249nt) を多数の短い DNA 鎖 (staple 鎖: 32nt, 226 本) で折り畳んでいく手法であり、staple 鎖に結合用の手を導入する事で、任意の場所に蛋白質を結合させる事が可能である (図 1)。蛋白質結合方法としては、①DNA 鎖のハイブリダイゼーションを利用した方法と②共有結合性のタグ蛋白質 (Halo タグ蛋白質/SNAP タグ蛋白質) を利用した方法を用いる。作製した DNA-tile とキネシンを混ぜる事で、DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステム (ナノマシン) を作製する (DNA-tile-キネシン)。そして、作製した DNA-tile-キネシンがレールである微小管上をリアルタイムに運動していく様子を全反射顕微鏡で 1 分子観察する。

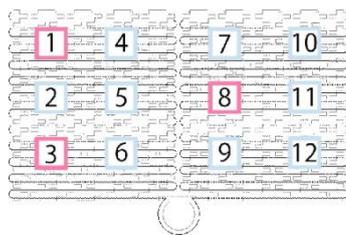


図 1. DNA-tile 上の 12 箇所の結合場所

(2) DNA-tile 上には、モータ蛋白質だけでなく、様々な種類の生体分子を結合させる事が可能である。我々は、多数の分子が協調して、効率的な反応を行っている転写・翻訳系に着目し、DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステムの応用を図った。具体的には、転写や翻訳を司る、RNA ポリメラーゼ (RNAP) やリボソームにタグ蛋白質 (Halo や SNAP タグ蛋白質) を融合させ、DNA-tile 上に結合できるようにする。活性評価には、無細胞翻訳系 "PURE system" を用いた。PURE system は、転写・翻訳に必要な因子のみから構成される反応系であり、因子を自在に出し入れする事で、個々の因子の転写・翻訳に対する影響を評価する事が可能である。この PURE system を用いる事で、作製した RNAP やリボソームの活性評価を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 運動に関わるキネシンの数は連続歩行距離に寄与する

多数の分子間の協調メカニズムの解明するために、DNA-tile 上に 1-9 個のキネシン分子を結合させた DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステム (ナノマシン) を構築した (DNA-tile-kinesin)。まず、DNA-tile の特異的な場所にキネシン分子を結合させる方法を比較した結果、ハイブリダイゼーションを用いる方法よりも、タグ蛋白質 (Halo や SNAP 蛋白質) を用いる方法の方が良好な結果を得た。その結果、目的の場所にキネシン分子を結合させる事に成功した (図 2)。ただし、キネシンが DNA-tile に結合する結合速度定数は、溶液中におけるタグ蛋白質-タグ蛋白質リガンド間結合の値よりも 3 桁ほど低く ( $10^3 - 10^4$  /M/s)、効率的な DNA-tile-kinesin の形成には課題が残った。

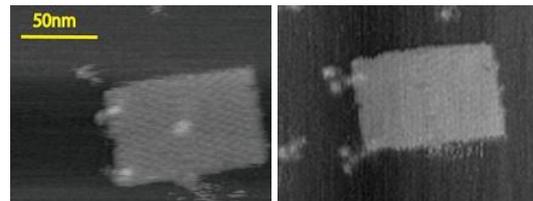


図 2. AFM 像 (長方形 tile に蛋白質が結合 左図; 単量体 3 ヶ所、右図; 2 量体 2 ヶ所)

DNA-tile-kinesin の速度と連続歩行距離を全反射顕微鏡で観察した結果 (図 3)、DNA-tile に結合しているキネシンの数に応じて、DNA-tile-kinesin の連続歩行距離が伸びる事を見出した。一方、速度には変化が見られなかった。従来、輸送小胞などに結合している分子数の変化が連続歩行距離と速度のどちらに寄与するのが明らかでなかつ

たが、分子数を厳密に制御できる DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステムを用いる事で、キネシンにおいては、多数分子が同時に働く事の効果は、主にナノシステム全体をレールから解離しにくくする事に寄与する事が明らかになった。次に、ナノシステム中に機能の低下した分子がいた場合に、システム全体の活性がどのように変化するかを明らかにするために、野生型のキネシンと共に、ATP加水分解活性が低い変異体をモデル分子として DNA-tile の特定の場所に結合させた。その結果、変異体の割合が増えるにつれて、システム全体の活性が低下した。この結果から、現状のハイブリッドナノシステムでは、システム性能を高い状態で維持するためには、システムを構成する全ての分子の活性を高く保つ事が重要である事がわかった。これらの結果は、DNA-tile 上の任意の場所に目的の蛋白質を固定させたハイブリッドナノシステムの構築と、システム全体の活性評価が可能である事を示しており、多分子協調メカニズムを探る手法の基礎が確立した。

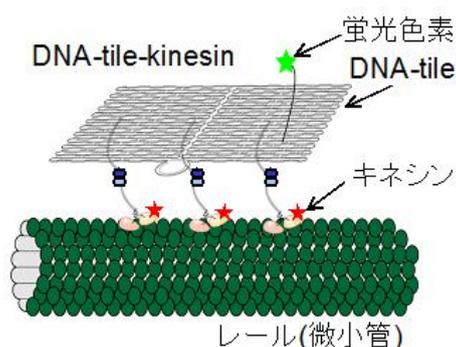


図 3. DNA-tile-kinesin 運動の 1 分子観察

(2) タグ化 RNAP/リボソームの構築  
DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステムを転写・翻訳系に応用するために、タグ蛋白質を融合させた RNAP とリボソームを構築した。更に、タグ化リボソームを用いて、大腸菌 trans-translation 機構の解析を行った。細胞内において翻訳の異常停止は、出来損ないの蛋白質や翻訳が滞った翻訳複合体を生じさせ、細胞に悪影響を与える。大腸菌では、trans-translation 機構が翻訳途中で異常停止した翻訳複合体をリサイクルし、また出来損ないの蛋白質に分解用シグナルを付加させる事で、品質管理の一端を担っている。trans-translation 機構では、まず、tRNA と mRNA の 2 つの機能を併せ持つ transfer-messenger RNA(tmRNA) が、Small protein B(SmpB)や翻訳因子 EF-Tu と共に、異常停止したリボソームに結合し、翻訳を再開させる。続いて、tmRNA の ORF (11 アミノ酸からなる SsrA タグ) を出来損ないのポリペプ

チド鎖に付加した後に、tmRNA の持つ終始コドンを用いて、通常の翻訳終結反応を引き起こし、異常停止リボソームを rescue する。trans-translation 機構の 1 分子解析の第一歩として、まず、ガラスに固定した空のリボソームへの tmRNA/SmpB/EF-Tu 複合体の相互作用を一分子レベルで観察した(図 4)。その結果、tmRNA が解離するまでには単一ではなく複数の経路があることが明らかになった。大腸菌内では、リボソームは 1 個だけで翻訳を行っているのではなく、ポリソーム構造(1本の mRNA に複数リボソームが数珠つなぎになった構造)で翻訳を行っており、個々のリボソームの翻訳活性が別のリボソームの翻訳活性に影響を与えていると考えられている。翻訳の異常停止においても、異常停止や停止解除によって、異常停止しているリボソームに引き続くリボソームの翻訳活性に影響を与えていると考えられる。しかし、従来は、ポリソーム構造を試験管内で再構成する事が難しく、詳細にその分子機構を調べる事が困難であった。一方、DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステムでは、複数のリボソームを任意の場所に空間配置できるので、擬似的なポリソーム構造の再構成が可能であると考えられる。今後、DNA-蛋白質ハイブリッドナノシステムを更に発展させる事で、従来明らかにする事が難しかった、翻訳時における多分子間協調性の機構解明が期待される。

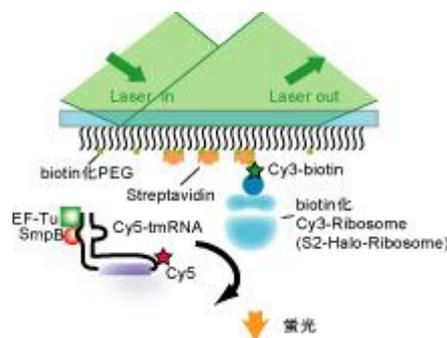


図 4. trans-translation の 1 分子解析

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Zhou ZP, Shimizu Y, Tadakuma H\*, Taguchi H, Ito K, Ueda T "Single molecule imaging of the trans-translation entry process via anchoring of the tagged ribosome" Journal of Biochemistry、査読有、149(5)、2011、609-618
- ② Okabe K, Harada Y, Zhang J, Tadakuma H,

Tani T, Funatsu T\*. "Real time monitoring of endogenous cytoplasmic mRNA using linear antisense 2'-O-methyl RNA probes in living cells." *Nucleic Acids Research*, 査読有、39(4)、2011、e20

〔学会発表〕(計 7 件)

① 多田隈尚史 「設計して調整する分子アクチュエータ: DNA-蛋白質ハイブリッド・ナノマシンの構築」 日本生化学会(招待講演)、2011/9/21、国立京都国際会館

② Miyazono Yuya, Endo Masayuki, Ueda Takuya, Sugiyama Hiroshi, Harada Yoshie, Tadakuma Hisashi "Constructing DNA-kinesin hybrid-nanomachine using the DNA-tile scaffold" 日本生物物理学会、2011/9/16、兵庫県立大学・姫路書写キャンパス(兵庫県)

③ Zhou ZP, Yao C, Shimizu Y, Tadakuma H, Taguchi H, Ito K, Ueda T "Single molecule imaging of the trans-translation entry process via anchoring of the tagged ribosome" BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010/12/8、神戸ポートアイランド(兵庫県)

④ Miyazono Y, Hayashi M, Karagiannis P, Harada Y, Tadakuma H "Strain through the neck linker ensures processive runs: a DNA-kinesin hybrid nanomachine study" 日本生物物理学会、2010/9/21、東北大学川内キャンパス(宮城県)

⑤ Tanaka K, Matsui J, Koyama H, Tamaru D, Tadakuma H, Shimizu Y, Ueda T "転写・翻訳系がカップルした in vitro 無細胞翻訳系再構成の試み" 日本生物物理学会、2010/9/21、東北大学川内キャンパス(宮城県)

⑥ Zhou ZP, Suto Y, Shimizu Y, Tadakuma H, Taguchi H, Ito K, Ueda T "1 分子イメージングによるトランス・トランスレーションにおける SmpB の C 末端の機能解析" 日本生物物理学会、2010/9/20、東北大学川内キャンパス(宮城県)

⑦ Zhou ZP, Shimizu Y, Tadakuma H, Ito K, Taguchi H, Ueda T "Functional analysis of the C-terminus region of SmpB in trans-translation by single-molecule imaging" 日本 RNA 学会、2010/7/28、一橋記念講堂(東京都)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

多田隈 尚史 (TADAKUMA HISASHI)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・助教

研究者番号: 10339707