

**京都大学教育研究振興財団助成事業  
成 果 報 告 書**

平成20年10月22日

財団法人京都大学教育研究振興財団  
会 長 辻 井 昭 雄 様

所属部局            生命科学研究所

職 名            教授

氏 名            竹安邦夫

事業区分	平成20年度・短期招へい助成		
招へいした研究者	所属・職名	イギリス ダンディー大学・研究員	
	氏 名	Daniel Ryan	
研究課題名	一分子生化学:高速原子間力顕微鏡法を用いた“酵素-DNA相互作用”の研究		
招へい期間	平成20年8月25日 ~ 平成20年 9月25日		
招へい成果の概要	タイトルは「成果の概要/報告者名」として、A4版2000字程度・和文で作成し、添付して下さい。「成果の概要」以外に添付する資料 <input type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> 有( )		
会計報告	交付を受けた助成金額	450,000円	
	使用した助成金額	450,000円	
	返納すべき助成金額	0円	
	助成金の使途内訳 (使用旅費の内容)	航空運賃(往復)	150,000円
		滞在費	300,000円

## 成果の概要 / 竹安邦夫

### 再構成クロマチンの液中一分子動態観察

真核細胞では、DNA はヒストンに巻きつきながらヌクレオソーム構造を形成し、クロマチンとして存在している。これまで、クロマチンの動態を解析する手段としては、DNA 消化酵素を利用した生化学的な手法やレーザートラップによる一分子解析が用いられてきた。このような手法は、1つの特定のヌクレオソームを扱うには向いているが、数個～数十個のヌクレオソームからなるクロマチンファイバーの高次構造や動態を解析するには不向きであった。本研究では、塩透析によるクロマチン再構成法と、高速原子間力顕微鏡(高速AFM)による一分子動態観察を利用することで、バッファー溶液中という生理的環境下におけるヌクレオソームの動態に迫ることを目指した。

再構成クロマチンを高速 AFM で観察すると、クロマチンの beads-on-a-string 構造を確認することができるだけでなく、DNA 鎖のブラウン運動や DNA 上でのヌクレオソームの細かな運動を観察することができる。

Fig.1 の観察例では、DNA 鎖の折り返しと同時にクロマチンファイバー上におけるヌクレオソームの位置が変化する様子が観察された。DNA の折り返しが起こる時刻 89.5sec ~ 90.5sec の前後で DNA 鎖上での *end*-*a* 間の距離  $L1$  が増加すると共に *a*-*b* 間の距離  $L2$  が減少する。時刻 89.5sec ~ 92.5sec における  $L1$  の増加分と  $L2$  の減少分はともにほぼ 20nm であった。また  $L1+L2$  は 80sec ~ 100sec の間でほぼ一定の値( 215nm)を示したことから、ヌクレオソーム *a* がヌクレオソーム *b* の方向へ約 60bp 移動したと考えられる。

この観察結果は、“熱運動により生じる DNA 鎖の歪みが伝搬することで、ヌクレオソームのスライディングが惹起される” という考えを支持するものであり、クロマチンファイバー中のヌクレオソームの状態が動的なものであることを示している。

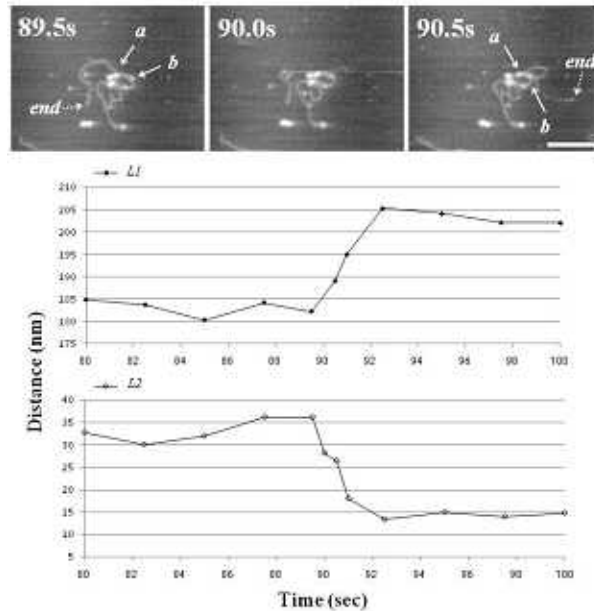


Fig.1 再構成クロマチンの高速 AFM 像[上段]。時刻 80sec ~ 90sec における DNA 末端(*end*)-ヌクレオソーム *a* 間の DNA 鎖上での距離 ( $L1$ ) の時間変化[中段]とヌクレオソーム *a*-*b* 間の DNA 鎖上での距離 ( $L2$ ) の時間変化[下段]。スケールバーは 100nm。

## ・ RSC-DNA 複合体の液中高速原子間力顕微鏡観察

RSC(Remodel the Structure of Chromatin)と名付けられた出芽酵母のリモデリング複合体は, Snf2 ファミリーに属する。このファミリーのタンパク質はヘリカーゼならびにATP分解酵素活性をもち, ループ形成などのDNA構造の変換を介して, DNAと他のタンパク質との相互作用を制御していると推測されている。RSCによるループ構造形成とDNAトランスロケーションの関連性はこれまでも報告されてきたが, レーザートラップなど従来の一分子解析の手法では一分子の構造や動きを可視化できないという欠点があった。

RSCの機能を動きの観点から直接的に検証するために, 本研究では高速AFMを利用し, DNA一分子上におけるRSCリモデリング複合体の分子動態を観察した。ATP依存的な分子動態の観察は, あらかじめATP非存在下で形成したRSC-DNA複合体をATP存在下で観察することで可視化できる。

RSC-DNA複合体のうち, DNA鎖は溶液中で激しくブラウン運動をしている。そのようななかで, 時刻31.0s以降, DNA鎖がそれまでのブラウン運動とは明らかに異なった挙動を示している様子が観察された。30.0sにおいて観察されていた画像右側のDNA鎖(Fig.3, 30.0s矢印)が短くなった分, 31.5sでは画像上方にDNA鎖が現れている(Fig.3, 31.5s矢印)。つまり, 観察初期において, DNA鎖の中央に位置していたRSCが, DNA鎖の端へと一方向的に移動したといえる。ATP非存在条件下での観察では, このようなDNA鎖上におけるRSCの大幅な転位置は観察されなかった。したがって, 時刻30.0~33.0sの間に観察された現象は, RSCのATP依存的なトランスロケーションと考えられる。

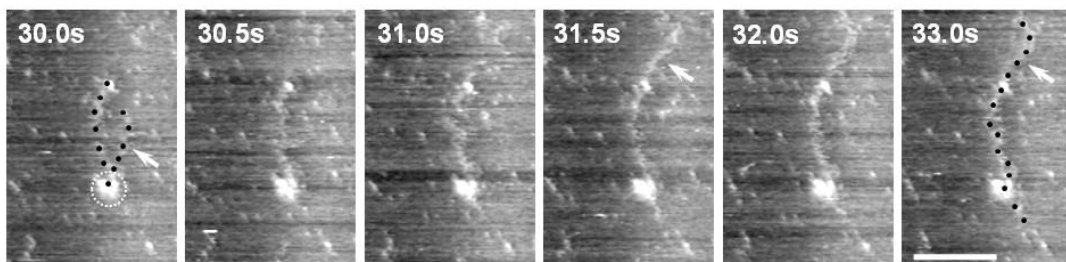


Fig.2 液中高速原子間力顕微鏡による RSC-DNA 複合体の経時観察。スケールバーは 200nm。走査範囲 800 × 650nm, フレームレート 2.0 フレーム/秒で取得した画像の一部を拡大して示している。

先行研究において, RSC が DNA と結合することによって, ループ構造やスーパーコイル構造を形成することが示されていたが, 時間的制約のため, 今回の実験ではそのような複合体構造の動態を観察するには至らなかった。

## ・ 今後の展開

生化学的実験や一分子解析を手掛かりに speculative なモデルが立てられているものの, RSCのような Snf2 タンパク質によって, クロマチンがリモデリングされる分子機構はまだ明確にはなっていない。本研究成果は, クロマチンリモデリングの分子機構を一分子動態の観点から検証するための新たな一歩となるだろう。