

戦略的創造研究推進事業
ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ

研究領域「ソフトナノマシン等の高次機能構造
体の構築と利用」

研究課題「DNA 分子モーターの動作原理の解
明」

研究終了報告書

研究期間 平成14年11月～平成20年3月

研究代表者：原田慶恵
(京都大学 物質-細胞統合システム
拠点、教授)

1 研究実施の概要

生体内には、ヌクレオチドを加水分解して得たエネルギーを使って、DNA に沿って動きながら働く DNA 分子モータータンパク質が存在する。DNA 分子モーターが働くメカニズムを明らかにし、ナノマシンへの応用を考察することを研究の目的とした。

DNA 分子モーターには、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。おそらくそれぞれの機能の違いによって働くメカニズムも多様である。これまでの研究は主に、生化学的あるいは分子生物学的手法で行われてきたが、それらの手法のみでは DNA モーター分子がヌクレオチドを加水分解して得た化学エネルギーを、DNA 上を移動する力学エネルギーに変換するメカニズムや、そのエネルギー効率など、DNA 分子モーターの動作原理を明らかにすることはできない。そこで我々は、チーム内に従来の生化学的手法、分子生物学的手法を用いて、より詳細に DNA 分子モーターを研究する「DNA 分子モーターグループ」と、1分子イメージング、1分子操作、1分子計測法などの技術を使い、DNA 分子モーターの動きのメカニズムを調べる「1分子解析グループ」をおき、両者が協力して DNA 分子モータータンパク質の機能解析を行うことにした。

「1分子解析グループ」

本グループは、DNA の情報を RNA に転写する RNA ポリメラーゼと、「DNA 分子モーターグループ」の研究対象である組換え中間体に作用し、相同な二重鎖間で単鎖 DNA 交換を促進して交叉点の移動を促進する RuvA・RuvB DNA モータータンパク質複合体の1分子解析を行った。

(1)RNA ポリメラーゼによる DNA 転写の分子機構に関する研究

DNA の転写はまず RNA ポリメラーゼがプロモーター部位を探し出し、転写開始部位の二重らせんを巻き戻すことから始まる。この二重らせんの巻き戻し反応を詳しく解析するために、らせんの巻き戻しに伴う、DNA のねじれ回転運動を観察するための実験系の開発を行った。DNA の片端をガラス上に固定し、もう一方の端に回転運動の観察を行うための目印として微小ビーズを結合させることによって、DNA のねじれ運動をリアルタイムで計測できるようになった。まずこの方法が、DNA 1分子レベルでのキネティクス解析に耐えうることを確認するために、臭化エチジウム(EtBr)の DNA への結合過程を詳細に解析した。

EtBr は DNA の蛍光染色に用いられる変異原性のある化合物である。EtBr は DNA の隣り合う塩基対の間に挿入される形で結合する。その際に DNA 二重らせんの構造にゆがみが生じ、EtBr 1分子あたり約 26°らせんがゆるむことが生化学的な方法や結晶構造の解析から知られている。全長が 458 塩基対の DNA をスライドガラスとビーズの間に結合させて溶液中に EtBr を加えたところ、ビーズが時計回りに連続的に一定数回転する様子が観察できた。EtBr の濃度を変えて回転数を測定し、DNA への EtBr 分子の最大結合数、結合定数を求めた。過剰量の EtBr を加えるとビーズは約 18 回転した。こ

の値と EtBr 1分子あたりの回転角度から、EtBr は最大 DNA 2塩基対あたり1分子結合することが分かった。また、結合定数は $2.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と求められた。これらの値は他の実験方法で求められた値と一致する。EtBr の DNA への結合にはこれまでに報告されていない負の協同性が観察されることも分かった。以上の結果から、本法を用いることによって DNA への生体分子の結合解離過程を DNA 1分子レベルで観察でき、結合定数や協同性などの値を求められることが分かった。そこで次に RNA ポリメラーゼの転写開始時の転写バブル形成に伴う、DNA 二重らせんの巻き戻し反応をビーズの回転運動として検出する実験を行った。転写開始時、RNAP は DNA 上のプロモーター配列に結合し、約 10 塩基対を一本鎖にほどく。このほどかれた領域は、転写バブルと呼ばれる。mRNA の基質である4種類の NTPs を加えると、RNAP は mRNA の合成を始めると共に、プロモーター領域の下流へと移動する。空いたプロモーター領域には、新たな RNAP が結合し、転写バブルを形成、mRNA を合成しながら、下流へと移動する。この転写バブルの形成を可視化するために、8つのプロモーター配列を含む DNA を作製した。加える基質を3種類以下に制限することで、mRNA の合成は途中で休止させることが出来る。この時、プロモーター領域は休止状態の RNAP によって占領されているため、新たな RNAP はプロモーター領域に結合することが出来ない。この条件下で RNAP を加えたところ、各プロモーター領域での転写バブルの形成を反映していると考えられる、約8回の一方方向のビーズの回転が観察された。また、転写初期の短い mRNA が合成されている状態と、安定した転写状態に入る 10 ヌクレオチド以上の mRNA が合成された状態で、転写バブルの大きさが数塩基異なるという報告がある。そこで、加える基質の種類を変え、休止状態の位置を変えた結果、ビーズの回転数に違いが見られた。我々のシステムが、転写バブルの大きさのわずかな塩基の変化を検出できることを示している。

(2) Holliday 構造 DNA の分岐点移動反応の顕微鏡による直接観察

DNA の相同組換えは生命の進化において重要な役割を果たすだけでなく、損傷を受けた DNA の修復においても重要な役割を果たす。相同組換えの過程では十字型構造をした Holliday 構造 DNA が形成され、この十字型分岐点の移動により組換えが進行する。分岐点移動反応には RuvA・RuvB タンパク質複合体が関与する。RuvA は Holliday 構造に特異的に結合するタンパク質である。RuvB はモータータンパク質としての活性を担い、そのアミノ酸配列の類似性から AAA⁺ファミリーに属するタンパク質である。RuvB は六量体のリング構造を形成し、RuvA の両側から挟むようにして RuvA と相互作用する。分岐点の移動は RuvB の ATP 加水分解エネルギーを利用して行われる。しかし、モータータンパク質である RuvB 6量体リングが DNA を動かすしくみなど詳細な反応機構は明らかではない。そこで RuvA・RuvB タンパク質複合体による DNA 相同組換えの機構を詳細に解析することを目的として、RuvA・RuvB による分岐点移動時におこることが予想されている DNA の回転運動を光学顕微鏡下で観察する方法を開発した。Holliday 構造 DNA の一端をガラス基板上に固定し、反対側に回転を検出するための目印となるような磁気ビーズをつけて、RuvA・RuvB、マグネシウムイオン、ATP を加え、

ビーズの動きを顕微鏡下で観察、記録した。その結果、予想通りビーズの回転が観察された。ATP 濃度を変えて、ビーズの回転を観察した結果、ATP 濃度依存的に回転速度の上昇が見られた。Holliday 分岐点が DNA 1ピッチ分 (10.4bp) 進む間にビーズは 2 回転するはずなので、回転速度から見積もった V_{max} は 8.2bp/秒である。同じ条件下で、生化学実験から得られた RuvA・RuvB による分岐点移動反応の速度は、低濃度 ATP においては 1分子解析で求めた速度とほぼ一致した。このことから、DNA の回転がビーズの回転に正しく伝えられていることが示唆される。しかし、生化学実験で得られた V_{max} は 20.5bp/秒で、1分子解析の結果の約 2.5 倍であった。この結果は DNA につけたビーズが抵抗となることで、分岐点移動の速度が遅くなっていることを示唆している。

「DNA 分子モーターグループ」

本グループはゲノムの正確な複製、染色体の安定的分離・分配などゲノムの安定性維持に關与する DNA モータータンパク質の機能解析に重点を置いた研究を進めた。これらのタンパク質の機能の欠損は、突然変異や染色体の異常を亢進し、癌や早老症の遺伝的素因となっているので、医学的にも重要な課題である。本グループは品川らが発見した相同的 DNA 組換えの後期過程で Holliday 構造と呼ばれる組換え中間体に作用し、相同な二重鎖間で単鎖 DNA 交換を促進して交叉点の移動を促進する RuvA・RuvB DNA モータータンパク質複合体の構造と機能の相関の解析を中心に行い、1分子解析グループの 1分子イメージング解析実験と相補的な研究を進めた。本研究では RuvA・RuvB 複合体モーターのうち ATP 分解活性をもつモータータンパク質本体の RuvB タンパク質の多数のミュータントタンパク質を解析して、分子・原子レベルでの Holliday 交叉点移動の反応機構を解明を試みた。その結果、RuvB タンパク質は RuvB 6 量体リングで隣合う RuvB タンパク質が ATPase の活性中心を形成することや、RuvB タンパク質を構成する 3つのドメインの役割を明らかにすることができた。RuvB タンパク質は生体内で種々の機能に關与する AAA^+ -ATPase ファミリーに属し、RuvB タンパク質の構造と機能の先端的研究成果は、他の AAA^+ -ATPase モータータンパク質の研究に波及的な影響を及ぼしている。

組換えの後期過程で、大腸菌の RuvA・RuvB タンパク質のように分岐点移動を促進するタンパク質は真核生物では知られていないので、本グループは酵母を研究材料として組換え修復に欠損を持つ新規の遺伝子を同定し、組換え後期過程での役割を解析した。その研究の成果として、ゲノム安定性の維持に關与する新規の DNA モータータンパク質 Fbh-1 や SMC5/6 複合体モータータンパク質の構成分子 Rad60 と Rad61 タンパク質を発見し、その生物学的機能を解析しこれらが組換え反応の後期過程に關与することを明らかにした。

さらに、組換え修復で機能や反応機構が不明であった大腸菌の DNA モータータンパク質 RecQ や RecN タンパク質の生体内での機能や発現制御、生化学的機能の解析を行った。前者は癌や老化を防止する機能が知られているウエルナー症候群やブルーム

症候群の原因遺伝子 W_{rn}, B_{lm} のホモログで Holliday 構造を基質としているという仮説が提唱されていた。本研究で RecQ の DNA 基質の構造は Holliday 構造でなく、ギャップ構造を持つ複製フォークである事を明らかにした。

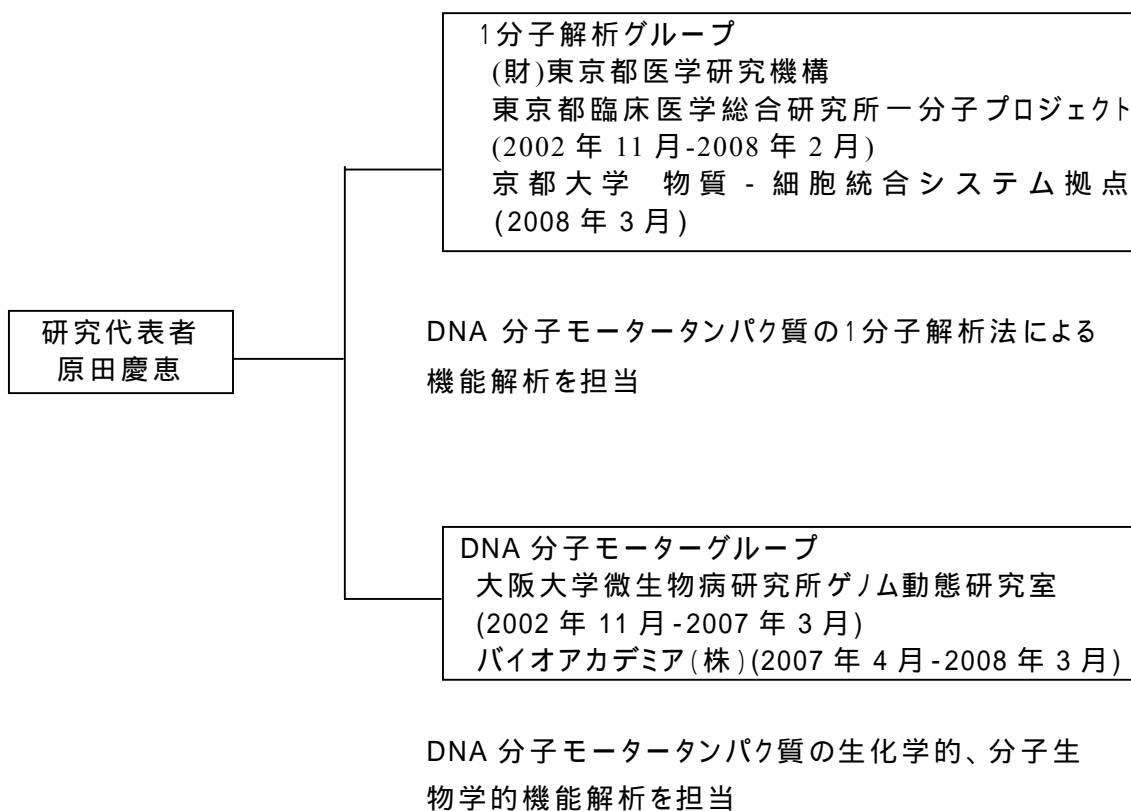
2 研究構想及び実施体制

(1) 研究構想

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。これらの DNA モータータンパク質は、筋収縮や細胞運動を担っているタンパク質分子のレールに沿って動く、運動タンパク質分子モーターとは異なるメカニズムで機能していると考えられる。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。おそらくそれぞれの機能の違いによって働くメカニズムも多様である。これまでの研究は主に、生化学的あるいは分子生物学的手法で行われてきたが、それらの手法のみでは DNA モーター分子がヌクレオチドを加水分解して得た化学エネルギーを、DNA 上を移動する力学エネルギーに変換するメカニズムや、そのエネルギー効率など、DNA 分子モーターの動作原理を明らかにすることはできない。そこで我々は、チーム内に従来生化学的手法、分子生物学的手法を用いて、より詳細に DNA 分子モーターを研究する「DNA 分子モーターグループ」と、1分子イメージング、1分子操作、1分子計測法などの技術を使い、DNA 分子モーターの動きのメカニズムを調べる「1分子解析グループ」をおき、両者が協力して DNA 分子モータータンパク質の機能解析を行うことにした。

1分子解析グループは、DNA の情報を RNA に転写する RNA ポリメラーゼと、「DNA 分子モーターグループ」の研究対象である組換え中間体に作用し、相同な二重鎖間で単鎖 DNA 交換を促進して交叉点の移動を促進する RuvA・RuvB DNA モータータンパク質複合体の1分子解析を行うこととした。DNA 分子モーターグループはゲノムの正確な複製、染色体の安定的分離・分配などゲノムの安定性維持に關与する DNA モータータンパク質の機能解析に重点を置いて研究を進めることとした。更に真核生物で未同定の組換え反応の後期に働く Holliday 構造特異的モータータンパク質を同定して、機能を解析することも目標とした。その過程でデータベースで発見した大腸菌からヒト迄高度に保存されている RuvB と構造が似ている DNA モータータンパク質 Mgs1 の機能の解明を目標として追加した。RecQ DNA ヘリカーゼは癌や老化に關連の深い W_{rn} や B_{lm} DNA ヘリカーゼのホモログであり、Holliday 構造特異的モータータンパク質であるという論文が発表されたので、RecQ ヘリカーゼの基質が Holliday 構造であるかどうかを検証することと、生体内での機能を解析することが新たな目標として追加された。

(2)実施体制



3 研究実施内容及び成果

3.1 DNA 分子モータータンパク質の1分子解析法による機能解析 ((財)東京都医学研究機構 1分子解析グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1. RNA ポリメラーゼによる DNA 転写の分子機構に関する研究

生体内で DNA に蓄積されている遺伝情報は、転写によって RNA に写しとられる。RNA が DNA から引き継いだ遺伝情報はタンパク質のアミノ酸配列に翻訳されることによって、はじめて生体内で機能が発現される。DNA 上の転写が開始される位置は、プロモーターと呼ばれる配列によって指定されている。転写を行う酵素である RNA ポリメラーゼは、DNA 上のプロモーター配列に結合すると、付近の塩基対を局所的に約 10 塩基解離させ、RNA 合成の鋳型となる 1 本鎖部分を作る。DNA は 1 ピッチがおよそ 10 塩基対の右巻き二重らせん構造をとっているため、塩基対の解離に伴い約 1 回転らせんが解かれることになる。RNA ポリメラーゼは DNA の塩基対が解離した部分を下流に移動させ RNA を 1 塩基ずつ伸長させながら DNA に沿って動く (図 1)。このように、転写が行われる際には、RNA ポリメラーゼ、DNA、RNA の複合体 (以下 RNA ポリメラーゼ複合体)

がダイナミックに構造変化することによって、複雑な反応過程を実現している。

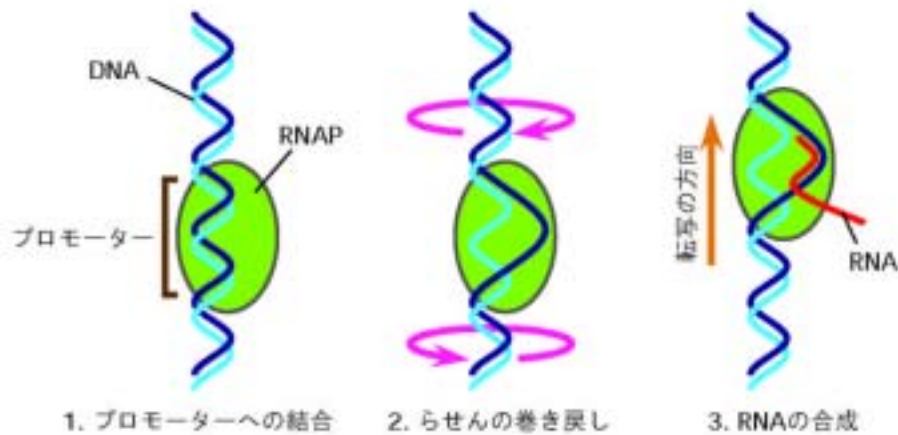


図 1. 転写反応の概念図

転写の一連の過程における RNA ポリメラーゼ複合体の構造は、近年、X 線回折法を用いた結晶構造の研究によって詳細に解析されるようになった。しかし、こうした研究で示された構造は、ダイナミックに構造変化する RNA ポリメラーゼ複合体のいくつかの安定状態をとらえた、いわばスナップショットである。我々は1個の RNA ポリメラーゼ複合体が安定した構造間を遷移する「動き」をリアルタイムで観察することによって、複雑な転写反応を可能にしている RNA ポリメラーゼ複合体のダイナミックな振る舞いを解明できるのではないかと考えた。本研究ではまず、RNA ポリメラーゼが転写を開始する際に生じる DNA のねじれ運動を、顕微鏡下で高精度に観察する実験系の開発を行うことにした。

これまでに、我々は大腸菌の RNA ポリメラーゼと DNA の転写複合体をガラス基板上に固定し、DNA の片端に付けたビーズの動きを観察する方法で、RNA ポリメラーゼが転写活動中に DNA をその右巻き2重らせん構造に沿ってねじる運動を可視化することに成功している。そこでこの方法を改良し、DNA 2重らせんのねじれ構造変化を光学顕微鏡下で直接観察する実験系の開発を行った。片端を三個のジゴキシゲニン(DIG)で、もう一方の端を三個のビオチン(biotin)で標識した 485 塩基対 (155nm) の二本鎖 DNA を試料として準備した。DIG 標識端を抗 DIG 抗体を結合させたガラス基板上に結合させ、ビオチン標識端には、直径 0.5 μ m の双子ラテックスビーズに結合させた。光学顕微鏡下で双子ビーズの動きを観察する。DNA のねじれ回転運動はビーズの回転運動として伝わり、容易に

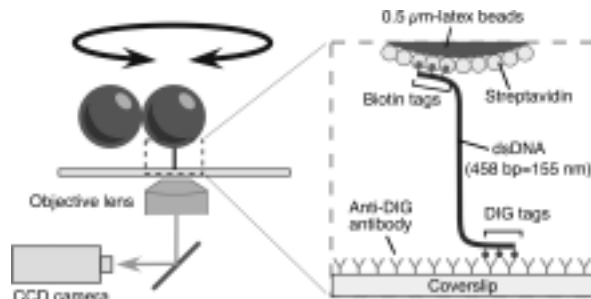


図 2. DNA ねじれ回転運動の観察システム

観察することができる(図 2)。このシステムを用いて、DNA に特異的に結合する化合物の結合解離過程の観察を行った。

臭化エチジウム(EtBr)は DNA の蛍光染色に用いられる変異原性のある化合物である。EtBr は DNA の隣り合う塩基対の間に挿入される形で結合する。その際 DNA の二重らせんの構造にゆがみが生じ、らせんが1塩基対あたり約 26° の割合でゆるむことが生化学的な方法や結晶構造の解析から知られている(図 3)。全長が 458 塩基対の DNA をガラス基板とビーズの間に結合させ、溶液中に EtBr を加えたところ、ビーズが時計回りに連続的に回転する様子が観察できた。

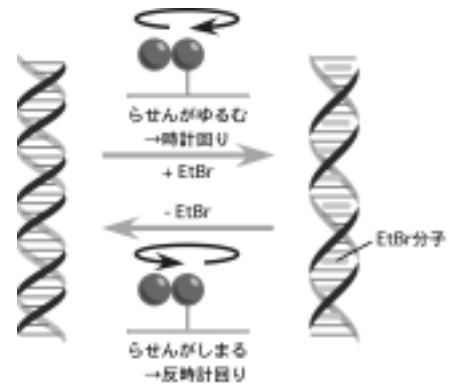


図 3. 臭化エチジウムの結合解離と DNA の回転

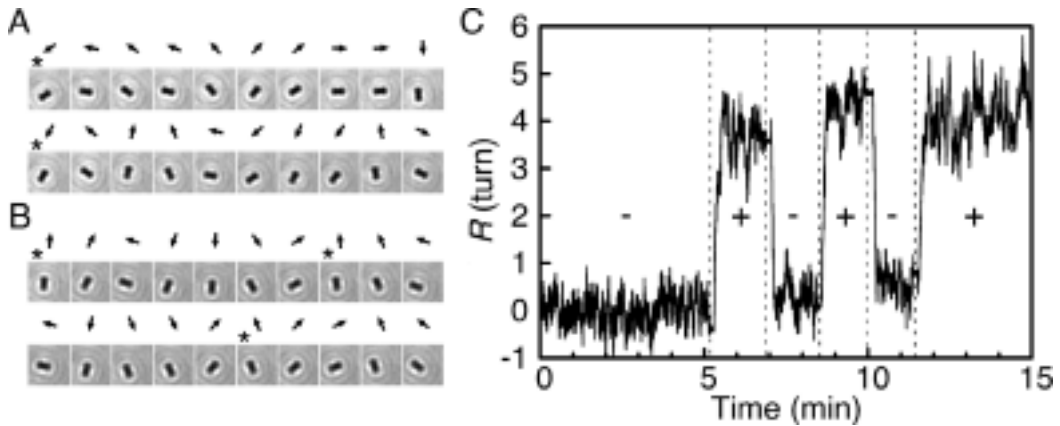


図 4. 臭化エチジウムによって引き起こされるビーズの可逆的回転 A. 1 μ M の EtBr 加えた時のビーズの回転の 300m 秒ごとの連続写真 B. EtBr を除去した場合のビーズの回転の連続写真 C. EtBr の添加(1 μ M)と除去を繰り返した時のビーズの回転の時間変化正の値が時計回りを示す。

この回転は可逆的で、EtBr を溶液中から取り除くと、反時計回りに回転した(図 4)。加える EtBr 濃度を変えると、濃度に応じて回転数が増加した(図 5)。過剰量の EtBr 濃度存在下ではビーズは約 18 回

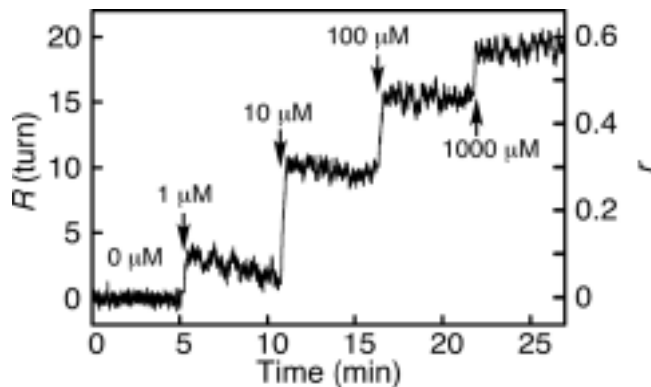


図 5. EtBr の濃度を段階的に増やしたときのビーズの回転数の時間変化

転した。この値と EtBr 1分子あたりの回転角度(26°)から、EtBr は最大 DNA 2塩基対あたり1分子結合することが分かった。結合定数は $2.6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ と求められ、他の実験方法でこれまでに求められた値と一致する。また、EtBr の DNA への結合にはこれまでに報告されていない負の協同性が観察されることも

分かった。EtBr の DNA への結合が溶液中の塩濃度に依存することがこれまでの実験で示唆されている。そこで、溶液中の KCl 濃度を変化させてビーズの回転を観察した。その結果、溶液中の KCl 濃度を下げると回転数が増加することがわかった(図 6)。EtBr の DNA への結合は溶液中の塩濃度の大きく依存することが明らかになった。以上のように、本方法

を用いることによって DNA のねじれ構造の変化を簡単に DNA 1分子レベルで観察できること。すなわち今回開発した方法は、結合することによって、DNA のらせん構造に変化を起こすリガンドの結合、解離過程を詳細に解析するのに有効なシステムである。

そこで、次にこのシステムを用いて、T7 ファージ由来の RNA ポリメラーゼ(T7 RNA ポリメラーゼ)が転写開始時に転写バブルを形成する過程を観察する実験を行った。T7 RNA ポリメラーゼは1本のポリペプチドからなる単純な構造でありながら、転写の開始、伸長、終結という、他の生物の複雑な構造の RNA ポリメラーゼにも共通する基本的な機能を備えている。実験では T7 RNA ポリメラーゼが特異的に認識するプロモーター配列を8個含む DNA を作製しガラス基板とビーズの間に結合させた。加える基質を4種類のヌクレオチドのうち、3種類以下に制限することで、RNA の合成は途中で休止させることができる(図 7)。この時、プロモーター領域は休止状態の RNA ポリメラーゼによって占領されているため、新たな RNA ポリメラーゼはプロモーター領域に結合することができない。この

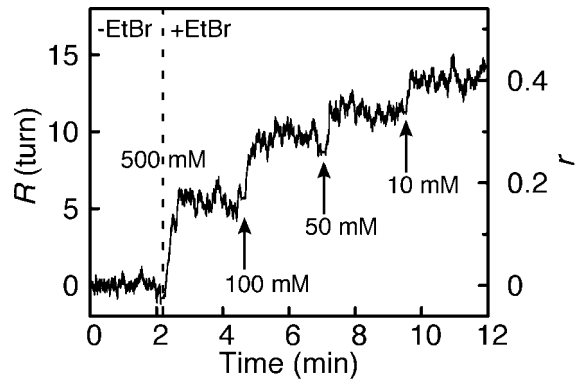


図 6. 溶液に含まれる KCl の濃度変化に伴うビーズの回転数の変化

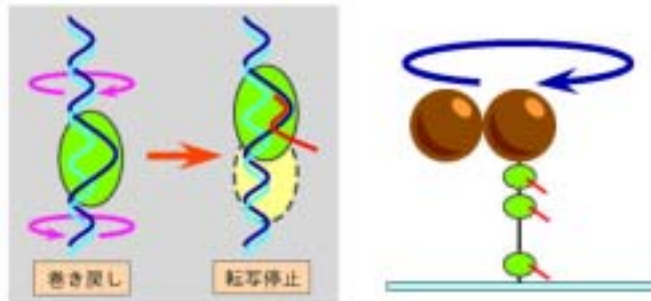


図 7. RNA ポリメラーゼによる転写バブル形成時の DNA の巻き戻しの観察

条件下で RNA ポリメラーゼを加えたところ、各プロモーター領域での転写バブルの形成を反映していると考えられる、約 8 回転の一方方向のピーズの回転が観察された。これまでの研究で、転写初期の短い RNA が合成されている状態と、安定した転写状態に入る 10 ヌクレオチド以上の RNA が合成された状態で、転写バブルの大きさが異なるという報告がある。そこで、加える基質の種類を変え、休止状態の位置を変えて、ピーズの回転数を詳細に解析した。その結果、生化学的実験から報告されている転写バブルの大きさの変化を反映するピーズの回転数の差を検出することができた(図 8)。このことは、我々のシステムはわずかに塩基の転写バブルの大きさの違いを検出できることを示している。

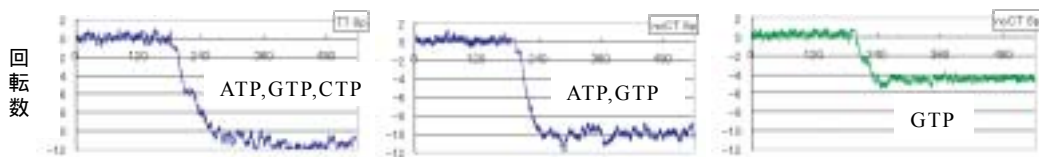


図 8. 溶液に加える基質の種類と回転数の違い

2. Holliday 構造 DNA の分岐点移動反応の顕微鏡による直接観察

DNA の相同組換えは生命の進化において重要な役割を果たすだけでなく、損傷を受けた DNA の修復においても重要な役割を果たす。相同組換えの過程において十字型構造をした Holliday 構造 DNA が形成され、この十字型分岐点の移動により組換えが進行する。分岐点移動反応には RuvA・RuvB タンパク質複合体が関与する。RuvA は Holliday 構造に特異的に結合するタンパク質である。また、RuvA は RuvB と複合体を形成する。RuvB がモータータンパク質としての活性を担い、そのアミノ酸配列の類似性から AAA⁺ファミリーに属するタンパク質である。RuvB は六量体のリング構造を形成し、図 9 のように RuvA の両側から挟むようにして RuvA と相互作用する。分岐点の移動は RuvB の ATP 加水分解エネルギーを利用して行われる。しかしながら、RuvA・RuvB による分岐点移動の速度や ATP 1 分子の加水分解によって移動する DNA の長さなどの詳細な反応機構に関しては未知な部分が多い。したがって、このような RuvA・RuvB タンパク質複合体による DNA 相同組換えの機構を明ら

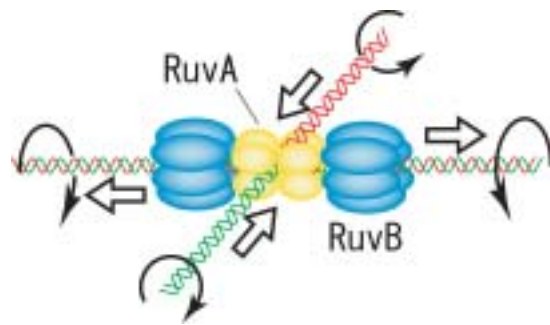


図 9. RuvA・RuvB タンパク質複合体による Holliday 構造の移動

RuvB 六量体リングが DNA を左右方向に押し出すことで Holliday 構造の交差点が移動していく。この時、DNA は矢印のように回転する

かにすることを目的として、光学顕微鏡下で Holliday 構造 DNA の分岐点移動を直接観察することにした。RuvA・RuvB による分岐点移動時に起こることが予想されている DNA の回転を、図 10 に示す系で検出することにした。Holliday 構造 DNA の片側をガラス基板上に固定し、反対側に目印となるような蛍光磁気ビーズを付け、RuvA・RuvB、マグネシウムイオン、ATP を加え、ビーズの動きを顕微鏡下で観察、記録した。予想通り回転するビーズが観察された。今回の観察結果より Holliday 構造 DNA の分岐点移動反応は DNA が自身のらせんに沿うように回転しながら移動することが示唆された。ATP 濃度を変えて、ビーズの回転を観察した結果、ATP 濃度依存的に回転速度の上昇が見られ、 V_{max} 、 K_m はそれぞれ 1.57 回転/秒、 $65\mu\text{M}$ であった(図 11)。Holliday 分岐点が DNA 1ピッチ分(10.4bp)進む間にビーズは 2 回転するはずなので、回転速度から見積もった V_{max} は 8.2bp/秒である。同じ条件下で、生化学実験から得られた RuvA・RuvB による分岐点移動反応の速度は、低濃度 ATP においては 1分子解析で求めた速度とほぼ一致した。このことから、DNA の回転がビーズの回転に正しく伝えられていることが示唆される。しかし、生化学実験で得られた V_{max} は 20.5bp/秒で、1分子解析の結果の約 2.5 倍であった。この結果は DNA につけたビーズが抵抗となることで、分岐点移動の速度が遅くなっていることを示唆している。

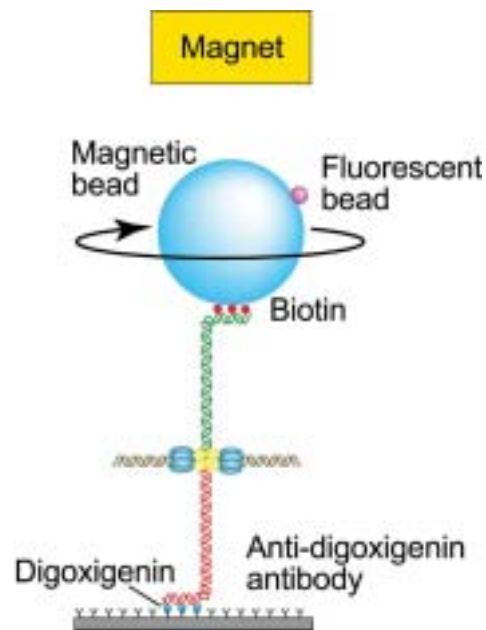


図 10. 分岐点移動反応の観察システム
左右方向に RuvB が結合するとビーズは時計回りに回転する。上下方向の場合、ビーズは反時計回りに回転する。

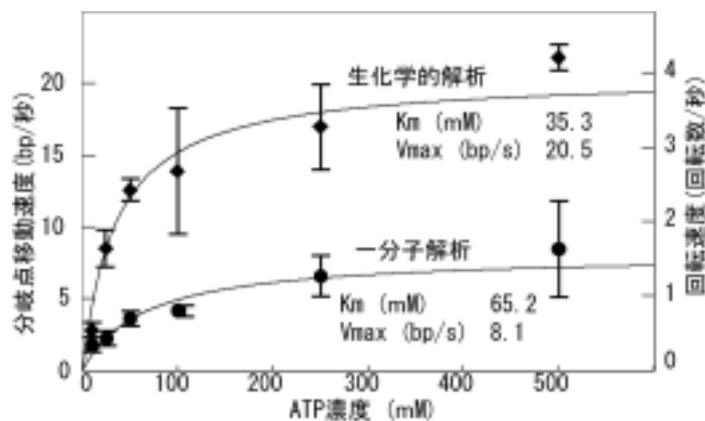


図 11. 様々な ATP 濃度でのビーズの回転速度

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究の成果は、1本の DNA に生ずるねじれを計測する方法を確立したことである。DNA に結合することによって DNA 二重らせんのピッチを変える化合物やタンパク質が多く知られている。らせんのピッチの変化によって DNA はねじれるので、ねじれを計測することは、それらの結合、解離を検出するのに有効な手段である。我々は、DNA の片端をガラス基板上に、反対の端を双子ピーズに結合させ、このピーズの回転を光学顕微鏡と安価な CCD カメラを使って観察するという単純な方法を採用した。DNA のねじれブラウン運動によるノイズをできるだけ少なくするために短い DNA を用いることがポイントである。残念ながら時間分解能は悪いので、速い結合、解離をリアルタイムで検出することはできないが、水溶液中での計測なので、1本の DNA について溶液条件を変えて計測を続けることができるのが強みである。今回我々の開発した方法は、あらゆる化合物やタンパク質の DNA への結合、解離の解析に応用することができる。

また、DNA と相互作用して機能する DNA モータータンパク質がその機能に伴って DNA を回転させることはよく知られている。RNA ポリメラーゼは我々が初めて DNA を回転させる様子を可視化した DNA モータータンパク質であるが、今回は、二例目として、RuvA・RuvB による Holliday 分岐点移動に伴って起こる DNA の回転運動を観察したことも、非常に意義深いと確信している。これをきっかけに今後様々な DNA モータータンパク質によって引き起こされる DNA の回転運動の観察が行われ、より詳細な DNA 分子モータータンパク質の分子メカニズムの解明に向けて大きく前進していくことが期待される。

さらに、RNA ポリメラーゼが転写開始後、安定な転写複合体を形成していくまでに起こるわずが 2~3 塩基の転写バブルの大きさの違いを検出できたことは、もちろん予想はしていたが、我々自身も感動した成果であった。これまでに RNA ポリメラーゼによる1塩基ごとの転写を可視化したという報告はあるが、非常に複雑で高価なシステムを駆使して実験を行うために、だれでも手軽に実験を行うことはできない。しかし、今回の我々の方法は、とてもシンプルで、手軽な装置を使って、誰でも DNA モーター分子のわずかな動きを高感度観察をできるという点で画期的である。今後、我々のシステムを使った DNA モータータンパク質の研究を普及していきたい。

3.2 DNA 分子モータータンパク質の生化学的、分子生物学的機能解析

(大阪大学、バイオアカデミア株式会社 DNA 分子モーターグループ)

(1)研究実施内容及び成果

1) RuvA-RuvB DNA モータータンパク質の反応機構の解析 (図1を参照)

RuvA・RuvB モータータンパク質の反応機構を詳細に解析するために、品川等は *ruvA*, *ruvB* 遺伝子にランダムに変異を導入し、DNA 修復欠損のドミナントネガティブ表現型をもとに多数のミュータントを得ていた。更に RuvA・RuvB の結晶構造を解明した後は、構造情報をもとに部位特異的変異を導入したミュータントやタンパク質の特定の領域のみ発現するミュータントを追加した。これ等のミュータントコレクションの中から、構造と機能の相関に有益な情報が得られそうなミュータントを選び、ミュータントタンパク質を精製して、RuvA・RuvB の持つ種々の機能 (ATP 結合、水解、DNA 結合、DNA branch-migration、タンパク質間相互作用、アロステリック効果など) を生化学的方法で解析した。

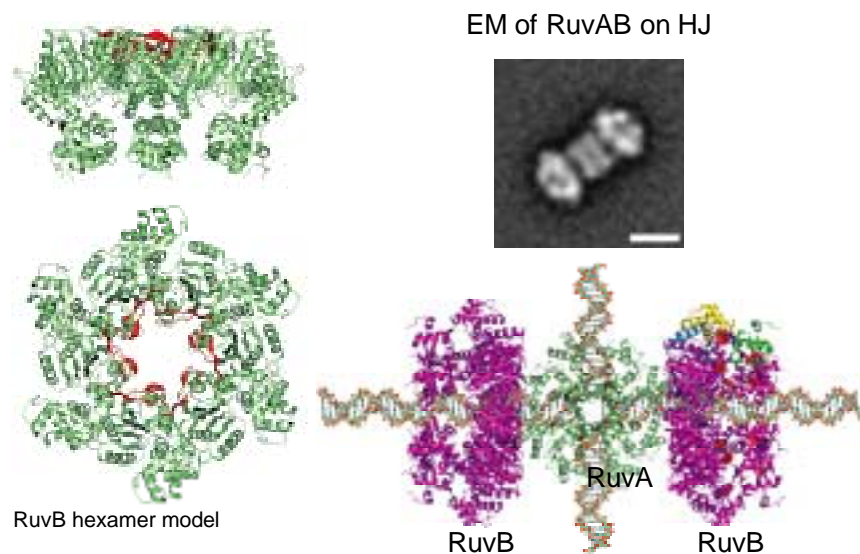


図1. RuvA・RuvB 複合体モータータンパク質の構造解析の結果に基づくモデル。 左上は RuvB 6量体リング構造を横から見た図。左下は6量体を上から見た図。右上は Holliday 分岐点 DNA に結合した RuvA・RuvB 複合体の電子顕微鏡写真。右下は結晶解析と電子顕微鏡解析の結果に基づいて構築された RuvA, RuvB, Holliday junction DNA 複合体のモデル。RuvA 4量体が十字架構造の Holliday junction を上下から挟むように結合し、junction の両側に RuvB 6量体リングを形成させる。相同な二重鎖 DNA は上下から入り junction で相補的な単鎖 DNA を交換して、別々のパートナーと二重鎖を形成して、両側に RuvB 6量体の中を通過して出て行く。RuvB モータータンパクが ATP 水解のエネルギーを利用して、二重鎖 DNA を動かす。

RuvB タンパク質の Arg174 は AAA⁺-ATPase で保存されており、これを Ala

に変えたミュータントは全く ATPase 活性を持たない。Walker A モチーフの Lys を Ala に変えた RuvB のミュータントも全く活性がない。しかし2つのミュータントタンパク質を1:1の比率で混合すると活性が有為に回復する。結晶構造解析から此の2つのアミノ酸は一つの分子中では離れているが、6量体リング中では接近した位置に存在するので、この Arg-finger(突出しているので、こう呼ばれている)は隣の分子中の Walker motif と ATPase の活性中心を形成している事が明らかになった。しかし Holliday ジャンクションの移動をさせる活性は全く回復されなかった。AAA⁺-ATPase に属するモータータンパク質は RuvB の此の構造を共有しているので、同様の ATPase 活性中心を形成しているものと考えられる。

RuvB タンパク質は結晶解析から3つの構造的ドメイン(N末、M中央、C末)より形成されている事が判明したので、ドメインの種々の組み合わせをもつ欠失タンパクをコードするミュータント遺伝子作製し、発現させてミュータントタンパク質を精製して、種々の生化学的性質を解析した(図2)。Nドメインは RuvB 同士の結合と RuvA との結合に関与し、ATP との結合と ATPase 活性には N と C の両ドメインを必要とした。Cドメインは DNA との結合に関与し、特にその中の Arg318 が直接関与している事が示された。しかし3つのドメイン間のアロステリック効果が ATP や DNA とのダイナミックな変化に必要であった。

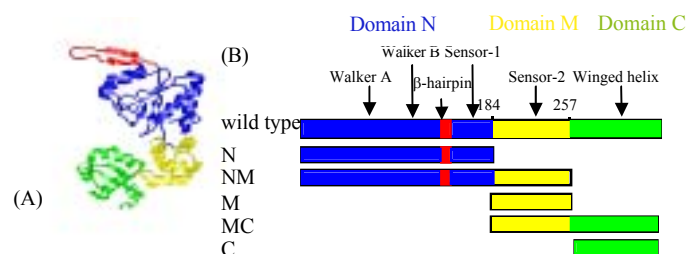


図2. RuvB タンパク質の3つのドメインの機能解析

中央の M ドメイン、緑が C 末ドメイン。N ドメイン中の赤で示したヘアピンで RuvB は RuvA と結合している。右図は RuvB タンパク質の機能的に重要なモチーフと作製した種々のドメイン発現系を示した。

branch-migration で DNA は回転しながら RuvB リングの中を移動されていくことが1分子解析で証明された。しかし RuvB リングが回転して DNA 二重鎖を押し出していくモデルと RuvB リングは RuvA に固定されていて、リング内の RuvB が ATP、ADP、フリーフォームと変化することに依る、構造変化によって、DNA との相互作用が変わって DNA を回転させながら移動させるモデルの2つが考えられる。この問題の解決を RuvB の RuvA との結合に欠損のあるミュータントタンパク質を利用して、残る半年間の研究期間で解明して本研究を終了させたい。

2) RecQ ヘリケースの機能解析

大腸菌の RecQ DNA ヘリケースは癌や老化の防止に関与するヒトの Wrn, Blm DNA ヘリケースのプロトタイプである。Wrn ヘリケースが Holliday junction を移動させるという論文がでたので、RecQ ヘリケースの *in vivo* 及び *in vitro* での機能を解析した。種々のジャンクション構造をもつ DNA を作成して、精製した RecQ を用いて、結合活性や ATPase 活性促進能を測定した。その結果 RecQ は Holliday junction よりむしろ lagging 鎖にギャップを持つ複製フォーク構造と最も強く結合し、ATPase 活性の促進効果も最も強いことを証明した。recQ ミュタントは RecA 依存的な SOS シグナルを発生するのに関与することもあきらかにした。これらのデータより品川等は RecQ ヘリケースは複製障害が起こった場合に lagging に生じたギャップに結合して、ヘリケース活性で DNA 剥がして、RecA タンパク質を呼び込んで、SOS シグナルを派発生させ、組換え修復を開始させるというモデル(図3)を提唱した論文が受理された(EMBO J, 2004)

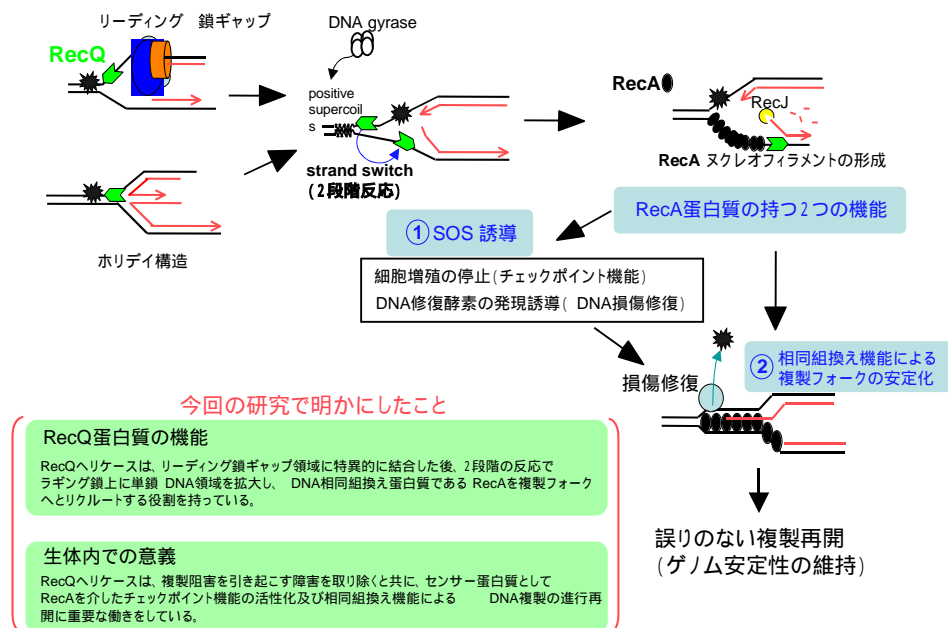


図3 . RecQ ヘリケースの機能。

3) Mgs1 DNA モータータンパク質の機能機能解析

Mgs1 は以前 RuvB とホモロジーが高いタンパク質をデータベースで検索して見つかった AAA⁺-ATPase ファミリーに属する真核生物のモータータンパク質である。その後大腸菌の全 DNA 配列が決定されて Mgs1 のホモログも大腸菌に存在していたので、Mgs1 は RuvB のホモログでないことが解った。しかし大腸

菌からヒトを含む真核生物にホモログは広く存在し、ホモロジーも高いので、重要な機能を持っているのに違いないと考え、此の Mgs の機能を大腸菌と酵母で解析した。MgsA 大腸菌 MgsA タンパク質と酵母 Mgs1 タンパク質を精製して、DNA モータータンパク質の可能性を考え、ATPase 活性、DNA に対する作用等を調べた。その結果どちらのタンパク質も単鎖 DNA 依存性の ATPase 活性と相補的な単鎖 DNA をアニールする活性を持つ事が解った。In vivo でのミュータントを用いた機能解析で、大腸菌では recA 変異株では生存に必須で、酵母では rad6-rad18 経路の欠損株では生存に必須の機能を果たしている事が解った。Mgs 変異株はゲノム不安定化が起こるので、複製過程でのホーク阻害を解消する機能に関与していること及び PCNA の SUMO 化の制御に関与していることが示唆されたが、その詳細な機能と生物学的意義の解明は今後の研究を待たねばならない。

4) DNA ヘリケースとユビキチンリガーゼ活性を持つ Fbh-1 の機能解析

真核生物で相同組換えの後期過程を解明するために、新規の相同組換えに関与する遺伝子のミュータントを単離し、原因遺伝子を同定した。Fbh-1 タンパク質は DNA ヘリケースと SCF ユビキチンリガーゼ E3 に特徴的な F-box モチーフを持つユニークなタンパク質である。fbh-1 遺伝子のホモログはヒトを含む高等動物でよく保存されている。分裂酵母での研究により、この DNA モータータンパク質は相同組換えにおいて Rad51 経路の後期過程で働くことを明らかにし、分裂酵母では RecQ ヘリケースのミュータントでは生育に必須であり、高等動物では2つの遺伝子の欠損が相加的な効果をもたらすことを明らかにした。しかし Fbh-1 が RuvB のような機能を持つかどうかは未だ検証されていない。

5) 染色体の構造維持に必須の DNA モータータンパク質 SMC5/6 複合体の新規サブユニットの発見と機能解析

相同組換えの新規な遺伝子を分離同定する過程で、染色体の構造維持に関与する SMC5/6 (Structural Maintenance of Chromosome 5 and 6) の新規の構成要素として Rad60 及び Rad62 (Nse4) を発見した。SMC5/6 は ATPase モチーフを持つ DNA モータータンパク質であり、組換え修復に関係することが知られていた。品川等は、この複合体が相同組換えの後期過程で機能し、G2-M 期のチェックポイントのシグナル発生に関与することを明らかにした。またこの複合体の欠損は染色体の切断を起すことも証明した。本研究によって SMC5/6 が組換え中間体の分離に関与する可能性が示唆された。

6) 超好熱古細菌の新規 DNA モータータンパク質の同定と機能解析

古細菌の DNA 複製、組換え、修復は原核生物より真核生物に近いことが明

らかになってきた。古細菌で機能的に RuvA・RuvB 複合体と似た機能のタンパク質を同定できれば、真核生物の RuvA・RuvB の機能的ホモログを同定出来る可能性を考えた。そのため石野(九大)と共同で超好熱古細菌 *Pyrococcus furiosus* のコスミドライブラリーを大腸菌で発現させて、その抽出液を高温処理すると、大腸菌由来のタンパク質は不活化されて、超好熱古細菌由来のタンパク質のみ活性を維持する。抽出液から Holliday junction DNA に特異的に結合するタンパク質を同定して、対応する遺伝子をクローニングし、多量発現系を構築して、精製して生化学的機能を解析した。このような作戦で分岐構造 DNA 特異的 DNA モータータンパク質 Hjm と Hef を同定して機能を解析した。Hjm は合成 Holliday junction DNA を試験管内で ATP 依存的に解離させる RuvA・RuvB 様の活性をしめしたが、この遺伝子を大腸菌 *recQ* 変異株に導入したら、相補したので、RuvB のホモログでなく、RecQ ヘリケースの機能的ホモログであると結論した。

同様な経緯で同定された Hef タンパク質は N 端側に DNA ヘリケースドメインを持ち、C 端側に XPF エンドヌクレアーゼドメインを持っていた(図4)。実際に夫々のドメインのみを持つ変異体タンパク質を発現させて精製すると、前者はフォーク構造および Holliday junction DNA 特異的ヘリケース活性を持ち、後者はフォーク構造特異的エンドヌクレアーゼ活性を示した。全長の Hef タンパク質は ATP 依存的にエンドヌクレアーゼ活性の上昇が見られた。これ等の結果を総合すると、Hef は複製が障害されたフォークに作用して、ヘリケース活性とエンドヌクレアーゼ活性を協調させて、二重鎖切断と組換え機能による修復によって、複製の再開をもたらす機能を有すると考えられる。その後 Hef のヒトの構造的ホモログがファンコーニ貧血症の原因遺伝子である事が判明し、注目されている。

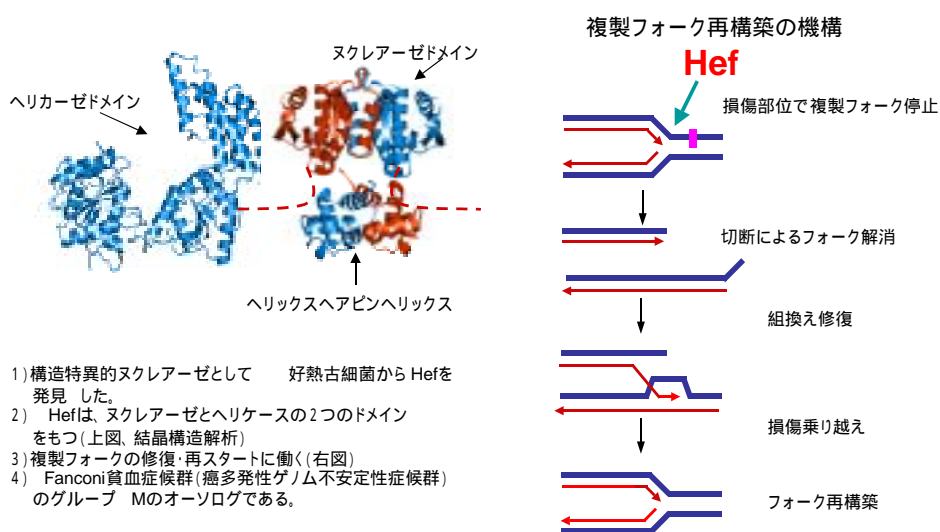


図4. 超好熱古細菌の Hef DNA ヘリケースの機能

最近ヒトの相同組換えに関与する DNA モータータンパク質 Rad54 が Holliday junction の branch-migration 活性があるという論文がでたので、*P. furiosus* の pfRad54 タンパク質の多量生産系を構築して精製し、ATPase 活性や DNA の構造特異的認識の様式をしらべた。pfRad54 は ATPase 活性をもち、二重鎖 DNA を持つ DNA によってその活性は促進されるが、Holliday junction やその他の分岐構造特異性や branch-migration 活性は観察されなかった。pfRad54 の組換え関連タンパク質との相互作用を調べたところ、Rad51 の 2 つのホモログ RadA、RadB 及び RPA と結合することを明らかにした。これらのタンパク質と組換え反応でどのように協調して行くか解明する事が今後の大きな課題である。

(2)研究成果の今後期待される効果

本研究によって、RuvA・RuvB 複合体 DNA モータータンパク質の作動原理の解明はほぼ完成の域に達しようとしている。遺伝学から始まり生化学、構造生物学と発展してきた研究が一分子解析によって、分子の動きを観察するレベル迄達した。RuvB タンパク質は DNA だけでなくタンパク質を正しくフォールディングさせるシャペロンタンパク質など多様な機能に関与する多くの AAA⁺-ATPase の仲間であり、本研究で得られた成果はこれらのファミリーのモータータンパクの作動原理を解明するためのモデルとして大変有用である。また本研究を通じて新に発見された DNA モータータンパク質はゲノム安定性の維持に重要な役割を果たしていることが明らかにされたので、今後の研究の種が播かれたと言えよう。ゲノムの安定性の維持における欠損は癌や老化を招き、このような研究は医学的にも重要な課題である。

4 研究参加者

1分子解析グループ(DNA 分子モータータンパク質の 1 分子解析法による機能解析の研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
原田慶恵	京都大学 物質 - 細胞統合システム拠点	教授	研究全体の統括	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
谷知己	(財)東京都医学 研究機構 東京 都臨床医学総合研究所	研究員	1 分子測定	平成 14 年 11 月 ~ 平成 17 年 2 月
貴家康尋	(財)東京都医学 研究機構 東京	常勤流動 研究員	1 分子測定	平成 14 年 11 月 ~

	研究機構 東京都臨床医学総合研究所	研究員		平成 16 年 5 月
	同上	CREST 研究員	同上	平成 16 年 6 月 ~ 平成 19 年 10 月
林真人	(財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所	常勤流動研究員	1 分子測定	平成 14 年 11 月 ~ 平成 17 年 3 月
	同上	CREST 研究員	同上	平成 17 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
	同上	非常勤研究員	同上	平成 18 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月
八木千春	(財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所	技術員	研究補助	平成 14 年 11 月 ~ 平成 15 年 8 月
打矢かよ子	(財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所	事務員	研究事務	平成 14 年 11 月 ~ 平成 20 年 3 月
韓龍雲	日本学術振興会	特別研究員	1 分子測定	平成 15 年 1 月 ~ 平成 17 年 12 月
	(財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所	CREST 研究員	同上	平成 18 年 1 月 ~ 平成 18 年 3 月
寺田佳代子	(財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所	CREST 研究補助員	試料調製	平成 15 年 10 月 ~ 平成 16 年 3 月
	同上	CREST 技術員	同上	平成 16 年 4 月 ~ 平成 19 年 6 月
横田浩章	(財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所	研究員	1 分子測定	平成 17 年 4 月 ~ 平成 20 年 3 月

加藤悠子	(財)東京都医学 研究機構 東京 都臨床医学総 合研究所	非常勤研 究員	1分子測定	平成18年4月～ 平成20年3月
野村真未	東京大学大学 院新領域創成 科学研究科	大学院生	1分子測定	平成18年4月～ 平成20年3月
岡部弘基	(財)東京都医学 研究機構 東京 都臨床医学総 合研究所	研究員	1分子測定	平成19年4月～ 平成20年3月
中条裕子	東京大学大学 院新領域創成 科学研究科	大学院生	1分子測定	平成19年4月～ 平成20年3月
大江良洋	東京大学大学 院新領域創成 科学研究科	大学院生	1分子測定	平成19年4月～ 平成20年3月
小林徹	東京大学大学 院新領域創成 科学研究科	大学院生	1分子測定	平成19年4月～ 平成20年3月
シェングリ ウシュル	(財)東京都医学 研究機構 東京 都臨床医学総 合研究所	研究補助 員	試料調製	平成19年5月～ 平成20年3月

DNA モーターグループ(DNA 分子モータータンパク質の生化学的、分子生物学的研究)

氏名	所属	役職	研究項目	参加時期
品川日出夫	大阪大学微生物病研究所	教授	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成14年11月～ 平成17年3月
	同上	招聘教授	同上	平成17年4月～ 平成19年3月
	バイオアカデミア(株)	代表取締役	同上	平成19年4月～ 平成20年3月
菱田卓	大阪大学微生物病研究所	助手	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成14年11月～ 平成17年6月

	同上	助教授 (准教授)	同上	平成 17 年 7 月 ~ 平成 20 年 3 月
森下卓	大阪大学微生物病研究所	助手	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 17 年 3 月
	同上	特任研究員	同上	平成 17 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
韓龍雲	大阪大学微生物病研究所	博士研究員	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 14 年 12 月
大屋知子 (奥村)	大阪大学微生物病研究所	博士研究員	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 17 年 3 月
大西隆之	大阪大学微生物病研究所	特任研究員	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 17 年 6 月
柴田竜也	大阪大学微生物病研究所	大学院生	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 17 年 3 月
森川博史	大阪大学微生物病研究所	大学院生	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成 14 年 11 月 ~ 平成 17 年 3 月
服部裕美	大阪大学微生物病研究所	研究補助員	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成 16 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
坂口周子	大阪大学微生物病研究所	大学院生	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成 17 年 4 月 ~
勝野真子	大阪大学微生物病研究所	研究補助員	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成 17 年 4 月 ~ 平成 19 年 3 月
	バイオアカデミア (株)	研究補助員	同上	平成 19 年 4 月 ~
中津律子	大阪大学微生物病研究所	研究補助員	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成 17 年 4 月 ~ 平成 18 年 3 月
石野園子	大阪大学微生物病研究所	研究員	DNA モータータンパク質の構造と機能の解析	平成 17 年 10 月 ~ 平成 19 年 3 月
	バイオアカデミア (株)		同上	平成 19 年 4 月 ~

5 招聘した研究者等

氏名(所属、役職)	招聘の目的	滞在先	滞在期間
-----------	-------	-----	------

6 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内誌 0 件、国際誌 18 件)

- 1) Takashi Hishida, Hiroshi Iwasaki, Yong-Woon Han, Takayuki Ohnishi and Hideo Shinagawa: Uncoupling of the ATPase activity from the branch migration activity of RuvAB protein complexes containing both wild-type and ATPase-defective RuvB proteins. *Genes to Cells*. 8, 721-730 (2003)
- 2) Takashi Hishida, Yong-Woon Han, Satoko Fujimoto, Hiroshi Iwasaki and Hideo Shinagawa: Direct evidence that a conserved arginine in RuvB AAA+ ATPase acts as an allosteric effector for the ATPase activity of the adjacent subunit in a hexamer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101, 9573-9577 (2004)
- 3) Takashi Hishida, Yong-Woon Han, Tatsuya Shibata, Yoshino Kubota, Yoshizumi Ishino, Hiroshi Iwasaki and Hideo Shinagawa: Role of the Escherichia coli RecQ DNA helicase in SOS signaling and genome stabilization at stalled replication forks. *Genes Dev*. 18, 1886-1897 (2004)
- 4) Yoshie Harada: Studies on Biomolecules Using Single Molecule Imaging and Manipulation Techniques. *Sci. Tech. Adv. Mat*. 5, 709-713 (2004)
- 5) Tatsuya Shibata, Takashi Hishida, Yoshino Kubota, Yong-Woon Han, Hiroshi Iwasaki and Hideo Shinagawa: Functional overlap between RecA and MgsA (RarA) in the rescue of stalled replication forks in Escherichia coli. *Genes Cells* 10. 181-191 (2005)
- 6) Tomomi Tani, Yoshikazu Miyamoto, Fujimori Kazuhiro, Takahisa Taguchi, Toshio Yanagida, Sako Yasushi and Yoshie Harada: Trafficking of ligand-receptor complex on the growth cones as an essential step for the uptake of nerve growth factor at the distal end of axon: a single-molecule analysis. *J. Neurosci*. 25, 2181-2191 (2005)
- 7) Takanori Hirano, Satoshi Shibata, Kouhei Ohnishi, Tomomi Tani and Shin-Ichi Aizawa: N-terminal signal region of FliK is dispensable for length control of the flagellar hook. *Mol. Microbiol*. 56, 346-3600 (2005)
- 8) Takayuki Ohnishi, Takashi Hishida, Yoshie Harada, Hiroshi Iwasaki and Hideo Shinagawa: Structure-function analysis of the three domains of RuvB DNA motor protein. *J. Biol. Chem*. 280, 30504-30510 (2005)
- 9) Yasuhiro Sasuga, Tomomi Tani, Masahito Hayashi, Hisashi Yamakawa, Osamu Ohara and Yoshie Harada: Development of a microscopic platform for real-time monitoring of biomolecular interactions. *Genome Research* 16, 132-139 (2006)
- 10) Takashi Hishida, Tomoko Ohya, Yoshino Kubota, Yusuke Kamada and Hideo Shinagawa: Functional and physical interaction of yeast Mgs1 with PCNA:

- impact on RAD6-dependent DNA damage tolerance. *Mol. Cell Biol.* 26 (14), 5509-5517 (2006).
- 11) Yong-Woon Han, Tomomi Tani, Masahito Hayashi, Takashi Hishida, Hiroshi Iwasaki, Hideo Shinagawa and Yoshie Harada: Direct observation of DNA rotation during branch migration of Holliday junction DNA by *Escherichia coli* RuvA-RuvB protein complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103 (31), 11544-11548 (2006).
 - 12) Kohji Nagashima, Yoshino Kubota, Tatsuya Shibata, Chikako Sakaguchi, Hideo Shinagawa and Takashi Hishida: Degradation of *Escherichia coli* RecN aggregates by ClpXP protease and its implications for DNA damage tolerance. *J. Biol. Chem.* 281 (41), 30941-30946 (2006).
 - 13) Masaoki Kohzaki, Atsushi Hatanaka, Eiichiro Sonoda, Mitsuyoshi Yamazoe, Koji Kikuchi, Nguyen Vu Trung, Dávid Szüts, Julian E. Sale, Hideo Shinagawa, Masami Watanabe and Shunichi Takeda: Cooperative roles of vertebrate Fbh1 and Blm DNA helicases in avoidance of crossovers during recombination initiated by replication fork collapse. *Mol. Cell Biol.* 27 (8), 2812-2820 (2007).
 - 14) Taro Nishinaka, Yuko Doi, Makiko Hashimoto, Reiko Hara, Takehiko Shibata, Yoshie Harada, Kazuhiko Kinoshita Jr, Hiroyuki Noji and Eiji Yashima: Visualization of RecA filaments and DNA by fluorescence microscopy, *J. Biochem.* 141(2), 147-156 (2007).
 - 15) Jun Kozuka, Hiroaki Yokota, Yoshiyuki Arai, Yoshiharu Ishi and Toshio Yanagida: Dynamic polymorphism of actin as activation mechanism for cell motility. *Biosystems* 88 (3), 273-282 (2007)
 - 16) Jean-Francois Allemand, David Bensimon, Gilles Charvin, Vincent Croquette, Giuseppe Lia, Timothée Lionnet, Keir Neuman, Omar Saleh and Hiroaki Yokota.: Studies of DNA-Protein Interactions at the Single Molecule Level with Magnetic Tweezers. *Lect. Notes Phys.* 711, 123-140 (2007)
 - 17) Masahito Hayashi and Yoshie Harada: Direct observation of the reversible unwinding of a single DNA molecule caused by the intercalation of ethidium bromide. *Nucleic Acids Research* 35(19), e125 (2007)
 - 18) Chikako Sakaguchi, Takashi Morishita, Hideo Shinagawa and Takashi Hishida: Essential and distinct roles of the F-box and helicase domains of Fbh1 damage repair. *BMC Molecular Biology* 9, 27 (2008)

(2)その他の著作物 (総説、書籍など)

- 1) 原田慶恵：生体分子の1分子イメージング. 生命科学への招待 太田博道・柳川弘志 編著 (三共出版) 151-163 (2003)
- 2) 原田慶恵：RNA ポリメラーゼによる DNA の回転を観る. 実験医学 (羊土社) 21(13), 1800-1801 (2003)
- 3) 原田慶恵：DNA モーターの 1 分子機能解析. 日生誌 65(7・8), 225-231 (2003)
- 4) 原田慶恵：熱ゆらぎを利用して動く？ モータータンパク質の新しい運動モデル . 化学 58 (11), 48-49 (2003)
- 5) 貴家康尋, 原田慶恵：生体分子機能を観察できる光学顕微鏡システムの開発. 月刊薬事 46(5), 149-154 (2004)
- 6) 谷知己, 原田慶恵：蛍光 1 分子イメージング. 蛋白質 核酸 酵素 49, 1647-1651 (2004)
- 7) 貴家康尋, 原田慶恵：分子イメージングによる分子間相互作用解析法の開発. バイオテクノロジージャーナル(羊土社) 5(3), 303-305 (2005)
- 8) 原田慶恵：1分子イメージング. ソフトナノテクノロジー バイオマテリアル革命 (シーエムシー出版) 314-324 (2005)
- 9) Yoshie Harada: Microbead Arrays. The Japan Journal September 2005, 27 (2005)
- 10) 原田慶恵：ビーズを用いた生体分子間相互作用解析技術の開発. BIO INDUSTRY (シーエムシー出版) 22(10), 66-74 (2005)
- 11) 原田慶恵, 横田浩章：バイオマシン・生物分子モーター. 細胞工学 (秀潤社), 25(8), 878-883 (2006).
- 12) 原田慶恵：一分子観察, 蛍光顕微鏡, 蛍光色素, 光ピンセット. ナノバイオ大辞典 (テクノシステム), 56-58, 147-148, 149-151, 449-450 (2007).
- 13) 原田慶恵：一分子蛍光法. 化学と生物 (日本農芸化学会 会誌) 45(5), 340-346, (2007)
- 14) 横田浩章, 原田慶恵：光ピンセット～生体分子の操作と力・変位計測～. 生命科学のための機器分析実験ハンドブック (実験医学別冊) 第3章顕微解析 4, 羊土社, 99-104, (2007)

(3)学会発表(国際学会発表及び主要な国内学会発表)

招待講演 (国内会議 10 件、国際会議 4 件)

- 1) Yoshie Harada: Single-molecule approach to the function of cell and DNA motor. XXIST International Conference on Photochemistry, (2003).7.28, 奈良 (招待講演)

- 2) 谷知己、宮本善一、藤森一浩、田口隆久、柳田敏雄、佐甲靖志、原田慶恵：成長円錐における神経成長因子の受容機構：1分子の振る舞いから。日本顕微鏡学会第48回シンポジウム 材料科学と生命科学のクロストークー顕微鏡解析の最前線ー，(2003).12.6-7, 東京(招待講演)
- 3) Yoshie Harada: Single-Molecule Approach to the Function of Cell and DNA Motor. Mini-conference "Nano-machines: Frontiers and opportunities", (2003).12.26, Taichung, Taiwan (招待講演)
- 4) 原田慶恵：Biomolecule imaging. ナノ電気計測グループ研究会，(2004).3.20, 日光 (招待講演)
- 5) Yoshie Harada: Studies on biomolecules using single molecule imaging and manipulation technique. 遺伝子工学 公開シンポジウム，(2004).4.9, 福岡 (招待講演)
- 6) Yoshie Harada: Studies on biomolecules using single molecule imaging techniques. UK-Japan Nanotechnology Symposium, (2005).3.9, 東京 (招待講演)
- 7) 原田慶恵：蛍光1分子イメージングや光ピンセット・磁気ピンセットによる1分子操作で生体分子の機能を探る。第11回ナノバイオ磁気工学専門研究会，(2005).5.31, 東京 (招待講演)
- 8) Takashi Morishita, Fumiko Furukawa and Hideo Shinagawa: Role of the fission yeast F-box DNA helicase in processing recombination intermediates. Fifth International Symposium on Replication, Recombination and Repair, (2005).11.13-17, Awaji Island, Hyogo, Japan.(Invited)
- 9) 原田慶恵：1分子イメージングで生体分子の機能を探る。北海道大学21世紀COE共催シンポジウム「バイオとナノの融合 - 生物物理学からのアプローチ -」第43回日本生物物理学会年会，(2005).11.23-25, 札幌 (招待講演)
- 10) 原田慶恵：成長円錐における神経成長因子の受容と軸索伸長制御のしくみ，第25回神経組織培養研究会，(2006).9.9, 東京(招待講演)
- 11) 原田慶恵：新たな技術の開発 生体分子1個の働きを見る，大阪大学産業科学研究所21世紀COEプログラム「新産業創造指向インターナノサイエンス」セミナー「新産業創造指向融合型研究における男女共同参画の推進」，(2007).1.17, 大阪 (招待講演)
- 12) 原田慶恵：一分子イメージングで生体分子の機能を探る。分子・細胞・組織操作を目指したシステム細胞工学ー女性研究者による理学 医学 工学融合分野の現状と動向ー，(2007).8.11, 東京 (招待講演)
- 13) 原田慶恵：ナノマシーンとバイオイメージング。第16回日本バイオイメージング学会学術集会，2007.10.31, 野田 (招待講演)

- 14) 貴家康尋, 小原收, 原田慶恵: マイクロピーズを利用した in vitro 生体分子間相互作用解析法と単一細胞解析技術の開発. BMB2007 ワークショップ, 2007.12.11, 横浜(招待講演)

口頭発表 (国内会議 33 件、国際会議 2 件)

- 1) 原田慶恵: 個々の生体分子の動きを見て細胞や分子モーターの機能を探る. 第 27 回バイオインフォマティクス研究会, (2003).4.23, 東京
- 2) Yoshie Harada: Studies on Biomolecules Using Single Molecule Imaging and Manipulation Techniques. Nanoscience and Nanotechnology on Quantum Particles 2003, (2003).12.15, Tokyo
- 3) 原田慶恵: 1 分子の動きを観てタンパク質の機能を探る. 遺伝子実験施設公開セミナー, (2003).12.19, 名古屋
- 4) 原田慶恵: 分子イメージングによる生体分子間相互作用解析システムの開発. 特定領域研究(B)公開シンポジウム, (2004).3.5, 東京
- 5) 韓 龍雲, 菱田 卓, 谷 知己, 岩崎博史, 原田慶恵, 品川日出夫: 一分子計測法を用いた RuvA-RubB 蛋白質複合体による Holliday 構造 DNA の分岐点移動反応の直接観察. 日本遺伝学会第 76 回大会, (2004).9.27-29, 吹田
- 6) 森下卓, 古川史子, 品川日出夫: 分裂酵母 F-ボックス DNA ヘリケースの組換え修復における役割. 日本遺伝学会第 76 回大会, (2004).9.27-29, 大阪
- 7) 韓龍雲, 原田慶恵: 一分子解析法を用いた組換え反応における RuvAB の動作原理の解明. CERST ソフトナノマシン領域会議, 2004.10.7-8, 名古屋
- 8) 原田慶恵: 神経成長因子の結合にともなう神経成長円錐の応答. 第 9 回神経科学領域における分子モニタリングシンポジウム, (2004).11.12, 東京
- 9) 韓龍雲, 谷知己, 林真人, 菱田卓, 岩崎博史, 品川日出夫, 原田慶恵: 一分子解析法を用いた DNA 相同組み換え反応に関与する RuvAB の動作原理の解明. 2005 年 生体運動合同班会議, (2005).1.9, 大阪
- 10) 原田慶恵: 1 分子イメージングで生体分子の機能を探る. 産業技術総合研究所セミナー, 2005.1.28, つくば
- 11) 原田慶恵: 蛍光 1 分子イメージングや光ピンセット・磁気ピンセットによる 1 分子操作で生体分子の機能を探る. 第 11 回ナノバイオ磁気工学専門研究会, (2005).5.31, 東京
- 12) 原田慶恵: Holliday 構造 DNA の分岐点移動反応の顕微鏡による直接観察. 特定領域「生体ナノシステムの制御」全体会議, (2005).9.9, 東京
- 13) 藤兼亮輔, 品川日出夫, 石野良純: 超好熱性アーキア由来新規ヘリカー

- ぜの機能解析日本遺伝学会第 77 回大会, (2005).9.27-29, 東京
- 14) 大屋知子, 新井宏和, 品川日出夫, 菱田卓: クロマチンサイレンシングに関与する出芽酵母 Esc2 蛋白質の DNA 複製阻害からの回復における役割. 日本遺伝学会第 77 回大会, (2005).9.27-29, 東京
 - 15) 森下卓, 坂口周子, 古川史子, 品川日出夫: 分裂酵母 F-ボックス DNA ヘリケースの組換え修復における役割. 日本遺伝学会第 77 回大会, (2005).9.27-29, 東京
 - 16) 原田慶恵: DNA 分子モーターの動作原理の解明. 研究領域「ソフトナノマシン等の高次機能構造体の構築と利用」平成 17 年度領域会議, (2005).10.13, 名古屋
 - 17) 野村真未, 原田慶恵, 谷知己: 神経軸索再生に関わる成長円錐の観察. 2006 年生体運動研究研究合同班会議, (2006).1.6-9, 東京
 - 18) Osamu Ohara, Yasuhiro Sasuga, Yoshie Harada, Takahiro Nagase, Atsushi Hijikata, Yayoi Kimura, Hiroshi Kitamura, Kiyoko Shimada, Makoto Kawai, Masatoshi Murakami and Hisashi Koga: Kazusa Mammalian cDNA Resources: orThe current status and its extension toward development of new gene/protein functional analysis platfms. Comparative and Functional Genomics (BITS) Workshop, (2005).9.27-30, Cambridgeshire, UK
 - 19) 原田慶恵: バイオ分子間相互作用リアルタイム解析法. ちばバイオクラスター交流会, (2006).7.25, 千葉
 - 20) 永嶋浩二, 久保田佳乃, 柴田竜也, 品川日出夫, 菱田卓 プロテアーゼによる RecN 分解制御機構の解析: DNA ストレスに対するバクテリア適応戦略. 日本遺伝学会第 78 回大会ワークショップ, (2006).9.25, つくば
 - 21) 坂口周子, 森下卓, 菱田卓, 品川日出夫: 組換え修復に関与する F-box DNA ヘリ ケースの機能モチーフの解析. 日本遺伝学会第 78 回大会, (2006).9.25, つくば
 - 22) 岩澤朋之, 貴家康尋, 原田慶恵: 一細胞中の酵素活性測定技術の開発. 2007 年生体運動研究研究合同班会議, (2007).1.7-9, 金沢
 - 23) 原田慶恵: DNA モーターの機能を探る, 第 2 回バイオナノ研究会「動くタンパク質を考える」, (2007).1.23, 城崎
 - 24) 貴家康尋, 横田浩章, 原田慶恵: 1細胞内生体分子の定量法の開発. 第 4 回ライフサーベイヤシンポジウム・第 4 回特定領域研究全体会議, (2007).1.29-30, 京都
 - 25) 横田浩章: DNA / タンパク質間相互作用の高精度 1 分子多次元解析. 第 3 回「生命現象と計測分析」領域会議, (2007).1.31-2.1, 福岡
 - 26) 横田浩章: DNA / タンパク質間相互作用の高精度 1 分子多次元解析. 第 2 回生命・計測分析合同研究会, (2007).4.20, 東京(八重洲ビル)

- 27) 横田浩章:タンパク質分子ダイナミクスの 1 分子計測. 慶應義塾大学理工学部物理学科談話会, (2007).5.23, 横浜
- 28) 横田浩章:光学顕微鏡による生体分子・細胞生物学研究のこれまでと将来展望. 第 4 回放射光学会若手ワークショップ, (2007).8.6-7, 播磨
- 28) 横田浩章: MRI・蛍光同時計測による生体内分子・細胞イメージング法の開発. 第 4 回「生命現象と計測分析」領域会議, (2007).9.3-4, 小樽
- 29) 山岸舞, 石浜陽, 白崎善隆, 貴家康尋, 寺田佳代子, 原田慶恵, 船津高志: 生細胞内での mRNA 動態解析による局在化機構の解明. BMB2007, (2007).12.11, 横浜
- 30) 岡部弘基, 船津高志, 原田慶恵: 生きた単一細胞における内在性 mRNA のリアルタイム定量. 日本生物物理学会第 45 回年会, (2007).12.21-23, 横浜
- 31) 山岸舞, 石浜陽, 白崎善隆, 貴家康尋, 寺田佳代子, 原田慶恵, 船津高志: 細胞質の分子篩効果による mRNA の細胞質内局在化. 日本生物物理学会第 45 回年会, (2007).12.21-23, 横浜
- 32) 中条裕子, 横田浩章, 原田慶恵: DNA helicase UvrD の一分子観察. 日本生物物理学会第 45 回年会, (2007).12.21-23, 横浜
- 33) 横田浩章, 韓龍雲, Jean-François Allemand, Xugang Xi, Vincent Croquette, David Bensimon., 原田慶恵: 同時計測顕微鏡による DNA / ヘリカーゼ相互作用の 1 分子観察. 日本生物物理学会第 45 回年会, (2007).12.21-23, 横浜
- 34) 加藤悠子, 原田慶恵: 転写バブル形成時の DNA の構造変化の可視化. 2008 年生体運動研究会合同班会議, (2008).1.7-9, 仙台
- 35) 原田慶恵: DNA モーターが引き起こす DNA ねじれ回転運動の直接観察. ナノバーチャル合同シンポジウム, (2008).1.22, 東京

ポスター発表 (国内会議 30 件、国際会議 30 件)

- 1) 谷知己, 原田慶恵: 成長円錐における神経成長因子の輸送と集積: 1 分子単位の観察. 日本生物物理学会 第 41 回年会, (2003).9.23-25, 新潟
- 2) Yoshie Harada: Observation of DNA rotation during transcription by RNA polymerase. Forth East Asian Biophysics Symposium, (2003).11.3-6, Taipei, Taiwan
- 3) Tomomi Tani, Yoshikazu Miyamoto, Kazuhiro E. Fujimori, Takahisa Taguchi, Toshio Yanagida, Yasushi Sako and Yoshie Harada: Transport of nerve growth factor in the growth cones of dorsal root ganglion neurons. COE International Conference 2003 “Molecular Mechanism of Intracellular Transports: The Roles of Kinesin and Dynein Superfamily Proteins”,

- (2003).11.4-8, Hakone
- 4) Yasuhiro Sasuga, Osamu Ohara and Yoshie Harada: High-throughput analysis of the biomolecular interactions by the using microbeads array. The 6th Conference of Asia-Pacific International Molecular Biology Network, (2003).11.12-13, Tokyo
 - 5) Tomomi Tani, Yoshikazu Miyamoto, Kazuhiro E. Fujimori, Takahisa Taguchi, Toshio Yanagida, Yasushi Sako and Yoshie Harada: Single molecule tracking of nerve growth factor on the growth cones of dorsal root ganglion. First COE International Symposium Gunma University “Molecular Mechanisms for Vesicle Trafficking and Membrane Fusion”, (2003).11.21-22, Maebashi
 - 6) Yasuhiro Sasuga, Osamu Ohara and Yoshie Harada: Analysis of the biomolecular interactions by the using microbeads array. Nanoscience and Nanotechnology on Quantum Particles 2003, (2003).12.15-17, Tokyo
 - 7) 鞍馬秀輝, 貴家康尋, 多田隈尚史, 永川豊広, 船津高志, 原田慶恵: actin mRNA の細胞内輸送と局在のイメージング. CREST 領域会議, (2004).4.22,
 - 8) 菱田卓, 韓龍雲, 藤本聡子, 岩崎博史, 品川日出夫: 6量体 RuvB タンパク質の Arginine174 は ATP 加水分解における分子間の協調的な働きに必須の役割を果たしている. 第27回日本分子生物学会年会, (2004).12.8-11, 神戸
 - 9) 大屋知子, 菱田卓, 品川日出夫: DNA 組換えに依存した複製フォーク進行阻害の回復に関与する出芽酵母 Mgs1 蛋白質の機能解析. 第27回日本分子生物学会年会, (2004).12.8-11, 神戸
 - 10) 坂口周子, 森下卓, 品川日出夫: 組換え修復に関与する F-box DNA ヘリケースの機能モチーフの解析. 第27回日本分子生物学会年会, (2004).12.8-11, 神戸
 - 11) 柴田竜也, 菱田卓, 品川日出夫: 大腸菌 SMC 様蛋白質 RecN の機能解析. 第27回日本分子生物学会年会, (2004).12.8-11, 神戸
 - 12) 谷 知己, 原田慶恵: 神経成長因子の結合に伴う後根節神経成長円錐の運動反応: その刺激応答連関の1分子解析. 日本生物物理学会第42回年会, (2004).12.13-15, 京都
 - 13) 林 真人, 原田慶恵: 1本の DNA に生じる2重らせん構造の変化を直接計測する. 日本生物物理学会第42回年会, (2004).12.13-15, 京都
 - 14) 貴家康尋, 小原 収, 谷 知己, 原田慶恵: マイクロビーズアレイを利用した分子イメージングによる生体分子間相互作用解析法の開発. 日本生物物理学会第42回年会, (2004).12.13-15, 京都

- 15) 韓 龍雲, 谷 知己, 林 真人, 菱田 卓, 岩崎博史, 品川日出夫, 原田慶
惠: 一分子解析法を用いた RuvA-RuvB 蛋白質複合体の Holliday 構造
DNA 分岐点移動反応の直接観察. 日本生物物理学会第 42 回年会,
(2004).12.13-15, 京都
- 16) Yong-Woon Han, Tomomi Tani, Masahito Hayashi, Takashi Hishida, Hiroshi
Iwasaki, Hideo Shinagawa and Yoshie Harada: Direct observation of the
RuvA-RuvB mediated branch migration of Holliday junction DNA with
single-molecule analysis. Biophysical Society 49th Annual Meeting,
(2005).2.12-16, Long Beach, USA
- 17) Masahito Hayashi and Yoshie Harada: Direct measurement of the unwinding
of a single DNA molecule by T7 RNA polymerase. Biophysical Society
49th Annual Meeting, (2005).2.12-16, Long Beach, USA
- 18) Tomomi Tani, Yoshikazu Miyamoto, Kazuhiro E. Fujimori, Takahisa Taguchi,
Toshio Yanagida, Yasushi Sako and Yoshie Harada: Signal input of nerve
growth factor into the growth cone visualized by the use of single-molecule
imaging. Biophysical Society 49th Annual Meeting, (2005).2.12-16, Long
Beach, USA
- 19) Tomomi Tani and Yoshie Harada: Trafficking of a ligand-receptor complex
on the growth cones as an essential step for the uptake of nerve growth
factor at the distal end of the axon: a single-molecule analysis. 第 58 回 日
本細胞生物学会大会, (2005).6.15, 大宮
- 20) Masahito Hayashi and Yoshie Harada: Direct measurement of the unwinding
of a single DNA molecule by T7 RNA polymerase. 第 58 回 日本細胞生物
学会大会, (2005).6.16, 大宮
- 21) Takashi Morishita, Chikako Sakaguchi, Fumiko Furukawa, Antony M. Carr,
Hiroshi Iwasaki and Hideo Shinagawa: Role of the Schizosaccharomyces
Pombe F-box DNA Helicase in Processing of Recombination Intermediates.
FASEB Summer Research Conferences on Genetic Recombination and
Genome Rearrangement, (2005).8.23-28, Colorado, USA
- 22) Tomomi Tani and Yoshie Harada: Single molecule imaging of signal input of
nerve growth factor into the growth cone. 15th IUPAB & 5th EBSA
International Biophysics Congress, (2005).8.27-9.1, Montpellier, France
- 23) Kohki Okabe, Hisafumi Ikeda, Yoshie Harada and Takashi Funatsu:
Development of real time imaging of specific messenger RNA in a living
cell using artificial antisense nucleic acids. 第 4 回国際核酸化学シンポジ
ウム(SNAC2005), (2005). 9. 20-22, 福岡
- 24) Tohru Natsume, Yasuhiro Tsutsui, Takashi Morishita, Hiroshi Iwasaki,

Hideo Shinagawa, Fumiaki Yamao: Fission Yeast *mcl1* gene is involved in maintenance of heterochromatin. Fifth International Symposium on Replication, Recombination and Repair, (2005).11.13-17, Awaji Island, Hyogo, Japan.

- 25) 永嶋浩二, 柴田竜也, 久保田佳乃, 品川日出夫, 菱田卓: 大腸菌 SMC 様タンパク質 RecN の機能解析. 第 28 回日本分子生物学会年会, (2005).12.7-10, 福岡
- 26) 森下卓, 古川史子, 品川日出夫: 分裂酵母 F ボックス DNA ヘリケースの相同組換えにおける役割. 第 28 回日本分子生物学会年会, (2005).12.7-10, 福岡
- 27) 坂口周子, 森下卓, 品川日出夫; 組換え修復に關与する F-box DNA ヘリケースの機能モチーフの解析. 第 28 回日本分子生物学会年会, (2005).12.7-10, 福岡
- 28) 吉永亜耶, 藤兼亮輔, 大山拓次, 森川耿右, 品川日出夫, 石野良純: 超好熱性アーキア *Pyrococcus furiosus* Hjm ヘリカーゼの DNA 結合様式解析. 第 28 回日本分子生物学会年会, (2005).12.7-10, 福岡
- 29) 横田浩章, 韓龍雲, Jean-Francois Allemand, Xuguang Xi, Vincent Croquette, David Bensimon, 原田慶恵: 1 分子力学 / 蛍光同時計測顕微鏡の開発 II. 第 43 回日本生物物理学会年会, (2005).11.23-25, 札幌
- 30) 岡部弘基, 池田壽文, 原田慶恵, 船津高志: 人工核酸を用いた生きた細胞内における特定の mRNA のリアルタイムイメージング. 第 43 回日本生物物理学会年会, (2005).11.23-25, 札幌
- 31) 韓龍雲, 谷知己, 林真人, 横田浩章, 菱田卓, 岩崎博史, 品川日出夫, 原田慶恵: Holliday 構造 DNA 分岐点移動反応に關与する RuvA-RuvB 蛋白質複合体の動力的解析. 第 43 回日本生物物理学会年会, (2005).11.23-25, 札幌
- 32) 貴家康尋, 寺田佳代子, 谷知己, 小原收, 原田慶恵: マイクロビーズアレイ技術を利用した単一細胞タンパク質発現プロファイリング. 第 43 回日本生物物理学会年会, (2005).11.23-25, 札幌
- 33) 山岸舞, 貴家康尋, 寺田佳代子, 原田慶恵, 船津高志: mRNA の細胞内ラベリングと運動解析. 第 43 回日本生物物理学会年会, (2005).11.23-25, 札幌
- 34) 西中太郎, 土井ゆうこ, 橋本牧子, 柴田武彦, 原田慶恵, 木下一彦, 野地博行, 八島栄次: RecA-DNA 複合体フィラメントのヌクレオチド依存性形状解析. 第 43 回日本生物物理学会年会, (2005).11.23-25, 札幌
- 35) 林真人, 原田慶恵: 1 分子 DNA 構造変化計測法を用いた臭化エチジウムの DNA への結合定数の測定. 第 43 回日本生物物理学会年会,

- (2005).11.23-25, 札幌
- 36) Yasuhiro Sasuga, Osamu Ohara and Yoshie Harada: Development of a microscopic platform for real-time monitoring of biomolecular interactions. The 9th Asian-Pacific Conference on Transcription, (2005).12.12-15, Miaoli (台湾)
 - 37) Yong-Woon Han, Tomomi Tani, Masahito Hayashi, Takashi Hishida, Hiroshi Iwasaki, Hideo Shinagawa and Yoshie Harada: Kinetic analysis of Holliday junction branch migration mediated by RuvA-RuvB. Biophysical Society 50th Annual Meeting, (2006).2.18-22, Salt Lake City, USA
 - 38) Yasuhiro Sasuga, Tomomi Tani, Masahito Hayashi, Hisashi Yamakawa, Osamu Ohara and Yoshie Harada: Development of a microscopic platform for real-time monitoring of biomolecular interactions using microbead array. Biophysical Society 50th Annual Meeting, 2006.2.18-22, Salt Lake City, USA
 - 39) 貴家康尋, 横田浩章, 原田慶恵: 1 細胞内生体分子の定量法の開発. 第 3 回特定領域研究(生体分子群のデジタル精密計測に基づいた細胞機能解析: ライフサーベイヤをめざして)シンポジウム, (2006).6.6, 東京
 - 40) Yasuhiro Sasuga, Tomomi Tani, Masahito Hayashi, Hisashi Yamakawa, Osamu Ohara and Yoshie Harada: Development of a microscopic platform for real-time monitoring of biomolecular interactions. Gordon Research Conference 2006 Single Molecule Approaches To Biology, (2006).6.17-22, New London, USA
 - 41) 原田慶恵: DNA 分子モーターがひきおこす十字型 DNA 分岐点移動時の DNA の回転運動の直接観察. ナノテクノロジー分野別バーチャルラボ成果報告会「ナノテクは進化する」, (2006).7.15, 東京
 - 42) 原田慶恵: Direct observation of DNA rotation during branch migration of Holliday junction DNA by Escherichia coli RuvA-RuvB protein complex. 特定領域研究「生態ナノシステムの制御」松島国際会議, (2006).9.1-3, 松島町
 - 43) Toshiaki Miki, Shun Sakamoto, Hiroaki Yokota, and Yoshie Harada: Labeling of iron-sulfur protein with a fluorescent dye to detect its conformation change in the cytochrome bcl complex. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, (2006).11.12-16, Ginowan City, Japan
 - 44) Yuko Kato, Hiroaki Yokota, Masahito Hayashi, Kayoko Terada, Yasuhiro Sasuga and Yoshie Harada: Direct observation of T7 RNA polymerase rotation during transcription. Fifth East Asian Biophysics Symposium &

- Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, (2006).11.12-16, Ginowan City, Japan
- 45) Masahito Hayashi and Yoshie Harada: Direct observation of the twisting motion of a single DNA molecule caused by the intercalation of ethidium bromide. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, (2006).11.12-16, Ginowan City, Japan
 - 46) Hiroaki Yokota, Yong-Woon Han, Jean-François Allemand, Xugang Xi, Vincent Croquette, David Bensimon and Yoshie Harada: Novel microscopy for simultaneous single molecule measurement of DNA/protein interaction. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, (2006).11.12-16, Ginowan City, Japan
 - 47) Mami Nomura, Tomomi Tani, and Yoshie Harada: Live imaging of growth cone regeneration after axotomy of dorsal root ganglion neurons. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, (2006).11.12-16, Ginowan City, Japan
 - 48) Kohki Okabe, Yoshie Harada and Takashi Funatsu: Real Time Imaging of Specific Messenger RNA in a Living Cell Using Artificial Nucleic Acids. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, (2006).11.12-16, Ginowan City, Japan
 - 49) Yasuhiro Sasuga, Tomoyuki Iwasawa, Kayoko Terada, Hiroyuki Sorimachi, Osamu Ohara and Yoshie Harada: Development of a microscopic platform for single-cell analyses using picoliter microwell array. Fifth East Asian Biophysics Symposium & Forty-Fourth Annual Meeting of the Biophysical Society of Japan, (2006).11.12-16, Ginowan City, Japan
 - 50) 石野園子, 當利和夫, 大木めぐみ, 品川日出夫, 石野良純: 超好熱性アーキ Pyrococcus furiosus 細胞中の DNA ポリメラーゼ活性分画と性質比較. 日本分子生物学 2006 フォーラム(分子生物学の未来), (2006).12.7, 名古屋
 - 51) Kohki Okabe, Yoshie Harada and Takashi Funatsu: 726-Pos/B570. Real Time Imaging of Specific Messenger RNA in a Living Cell Using Artificial Nucleic Acids. Biophysical Society 51st Annual Meeting, (2007).3.2-7, Baltimore, USA
 - 52) 薄井(青木)一恵, 貴家康尋, 岡崎規理子, 小原玲子, 原田慶恵, 小原收: マイクロ流路を利用した迅速なタンパク質相互作用検出システムの開発 BMB2007, (2007).12.11, 横浜
 - 53) 加藤悠子, 林真人, 原田慶恵: 転写開始時の転写バブル形成の可視化.

- 日本生物物理学会第 45 回年会, (2007).12.21-23, 横浜
- 54) 野村真未, 原田慶恵, 谷知己: 切断された神経軸索の再生における神経成長因子の作用. 日本生物物理学会第 45 回年会, (2007).12.21-23, 横浜
- 55) 貴家康尋, 寺田佳代子, 大江良洋, 小原收, 原田慶恵: マイクロウェルアレイを用いた単一細胞分泌タンパク質解析法の開発. 日本生物物理学会第 45 回年会, (2007).12.21-23, 横浜
- 56) 原田慶恵: DNA モーターが引き起こす DNA ねじれ回転運動の直接観察. ナノバーチャル合同シンポジウム, (2008).1.22, 東京
- 57) Hiroaki Yokota, Yong-Woon Han, Jean-Francois Allemand., Xugang Xi, Vincent Croquette, David Bensimon and Yoshie Harada: Single-molecule Observation of DNA/helicase Interaction by Novel Microscopy. Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysics Congress, (2008).2.2-6, Long Beach.
- 58) Kohki Okabe, Yoshie Harada and Takashi Funatsu: Real Time Quantitation of an Endogenous mRNA in Single Living Cells. Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysics Congress, (2008).2.2-6, Long Beach
- 59) Mai Yamagishi, Yo Ishihama, Yoshitaka Shirasaki, Hideki Kurama, Yasuhiro Sasuga, Kayoko Terada, Yoshie Harada and Takashi Funatsu: Effect of Zipcode Sequence and Molecular Weight of mRNA on Its Subcellular Localization Revealed by Single Molecule Imaging. Joint Meeting of the Biophysical Society 52nd Annual Meeting & 16th International Biophysics Congress, (2008).2.2-6, Long Beach
- 60) Hiroaki Yokota, Yong-Woon Han, Jean-Francois Allemand., Xugang Xi, Vincent Croquette, David Bensimon and Yoshie Harada: Single-molecule Observation of DNA/helicase Interaction by Novel Microscopy.. The first iCeMS Symposium, featuring mesoscopic interactions in cells and cellular membranes and the 11th International Membrane Research Forum, (2008).2.20-22, Kyoto City

(4)特許出願

国内出願 (2件)

1. 特許出願 発明の名称「マイクロビーズアレイ作製法」
発明者 原田慶恵、貴家康尋
出願人 財団法人東京都医学研究機構

出願日 平成 15 年 11 月 11 日

特許公開番号 2005 - 147718

特許出願番号 2003 - 381765

2. 特許出願 発明の名称「マイクロ流路形成体を利用したマイクロビーズアレイ用チップ、マイクロビーズアレイ及びこれらを用いた被検物質を検出する方法」

発明者 原田慶恵、貴家康尋、小原收

出願人 財団法人かずさディー・エヌ・エー研究所

財団法人東京都医学研究機構

出願日 平成 19 年 7 月 27 日

特許出願番号 2007 - 195476

海外出願 (0件)

(5)受賞等

受賞

新聞報道

日経産業新聞 2005 年 3 月 24 日

日経産業新聞 2006 年 7 月 21 日

静岡新聞 2006 年 9 月 24 日

日本経済新聞 2006 年 11 月 17 日

7 研究期間中の主な活動(ワークショップ・シンポジウム等)

年月日	名称	場所	参加人数	概要
2005 年 11 月 13 ~ 17 日	International Symposium on Replication, Recombination & Repair	兵庫県淡路島	210 名	2 年に 1 度開催される DNA 複製、組換え、修復関連の国際シンポジウムで、品川がオーガナイザーの一人となった。

8 研究成果の展開

(1)他の研究事業への展開

(2)実用化に向けた展開

9 他チーム、他領域との活動とその効果

(1)領域内の活動とその効果

(2)領域横断的活動とその効果

10 研究成果の今後の貢献について

(1)科学技術の進歩が期待される成果

本研究によって、DNA モータータンパク質の一分子機能解析を行う、汎用性の高い新たなシステムを開発したことは、今後、DNA モータータンパク質以外の様々なタンパク質の機能にともなう動きを観察するシステムを開発するための基礎となる。

(2)社会・経済の発展が期待される成果

DNA 分子モーターチームが、酵母を研究材料として新たに発見した、真核生物においてゲノム安定性の維持に關与する新規 DNA モータータンパク質 Fbh-1 や SMC5/6 複合体モータータンパク質の構成分子 Rad60 と Rad61 は、生物学的機能解析の結果、組換え反応の後期過程に關与するタンパク質であることを明らかにした。先に述べたように、これらのタンパク質の機能の欠損は、突然変異や染色体の異常を亢進し、癌や早老症の遺伝的素因となっているので、これらのタンパク質について生化学、分子生物学的手法による解析および、一分子解析を行い、生体内での役割を明らかにしていくことは医学的にも重要な課題である。

11 結び

本助成金で、研究員、研究補助員を雇用することができ、目標とした研究成果が達成されたことに非常に満足している。領域事務所の皆さまには、我々の研究がスムーズに進行するよう、便宜を図って頂き大変感謝している。本研究が終了しても我々は本研究成果を基に研究を継続していく。しかし、研究助成の終了とともに研究チームのメンバーが転出するので、今後どのように研究を継続していくかが課題である。何らかの形で切れ目のない助成・継続の手だてが講じられればありがたい。



研究代表者 原田慶恵の所属する(財)東京都医学研究機構 東京都臨床医学総合研究所 「一分子イメージングとナノテクノロジーによる生体機能分子の解析」プロジェクトのメンバー