

研究課題別評価

1. 研究課題名： 相同組換え時に DNA を回転させる蛋白質 RecA

2. 研究者氏名： 西中太郎

3. 研究の狙い：

大腸菌 RecA は相同組換えに必須の役割を果たすタンパク質で、単鎖 DNA と二重鎖 DNA との間の塩基配列相同性を探索し、相同鎖を交換する反応を促進させる。この反応を効率よく遂行させるためには ATP が必要であり、ATP の加水分解が伴うことによって平衡を生成物（ヘテロ二重鎖）に進めることができる。一方、DNA はらせん構造体であるから、単鎖 DNA と二重鎖 DNA との間の鎖を交換するためには DNA 分子が互いに回転する必要がある。RecA が DNA を回転させる分子モーターであるというアイデアは昔からあったが、これまでのところ数例の生化学実験による状況証拠しかなく、RecA 研究者には懐疑的な意見を持つものも少なくない。この問題を解決するためには、相同組換え反応に伴う RecA、DNA の回転運動を直接観測できる実験系を確立することが必須である。

本研究の狙いは、相同組換え反応における RecA フィラメント、(三重鎖) DNA の両らせん構造体の ATP 加水分解を伴って行われる回転機構を、1分子観察により検証することである。らせん構造は生物をかたちづくる際に非常に頻繁に出現する規則である。与えられた構成単位をある角度だけ回転させて積み上げる操作によって、らせん構造を形成することができる。そのらせん構造が実際に働いている「現場」には、その周期性をうまくいかした仕組みがあるに違いない。二重らせん構造を持つ DNA に、もう一本の鎖が加わって三重らせんとなり、塩基対の組み合わせを交換して新しい二重らせんが生じる。この仕事を円滑に進めるためには、「らせん」という構造をうまく動かせるための機構があると考えられる。

4. 研究結果：

RecA 単鎖 DNA 複合体フィラメントが外部の DNA を回転させながらフィラメント内部へ取り込んでゆく様子を 1 分子観測により初めて示した。

上の結果に基づき、RecA フィラメントが ATP 加水分解の流れとともに伸縮しながら DNA を回転させてゆく分子機構のモデルを創出した。(相同組換え反応の「ねじとナット」説)

RecA フィラメントおよび DNA を抗体二重染色法により光学顕微鏡下で可視化した。

RecA フィラメントを蛍光標識することによって RecA がフィラメントの末端から解離してゆく様子を実時間観測した。

5. 自己評価：

私がこの研究を始めたきっかけは、大学院生期間に私が手がけた RecA 蛋白質に結合した DNA の分子構造解析であった。相同組換え反応において DNA は RecA と結合することによって引き伸ばされ、巻き戻った極めて特殊な構造をとり、単鎖 DNA と二重鎖 DNA の相同鎖を交換する反応を行う。私は NMR でその単鎖 DNA の構造を決定し、それに基づいて単鎖 DNA と二重鎖 DNA が絡み合いながら鎖を交換する分子構造モデルを組み上げた。そのモデルは DNA 同士がねじれ、回転しながら鎖を交換してゆくことを暗示していた。このモデルが組みあがったのは 1996 年 5 月初頭の休日の夜のことであった。その日以降、私はらせんが回るという不思議な魅力に憑かれ、これを何とかして見てみたいと思うようになった。そのようにして、さき

がけ研究に採用していただいたのだが、その時、具体的にどのような機構で RecA が DNA を回しているかきちんと説明できるわけではなかった。

私の行っている研究に対して、評価される方の意見は全く2つに分かれている。同じように私の中の自己評価も2面性がある。心を引き裂かれそうな思いでもある。1つの意見は実験的に回転の直接証拠を世界で初めて提示したことに対する賞賛にも近い好意的なものである。また、その回転のメカニズムに対してメカニカルなモデルを提出したが、その新規的かつ、明快さに対する驚きの感である。さきがけ研究の当初は私自身、1分子観測実験に対する経験、技量もなかったが、さきがけ研究のサポートと慶応大学の木下教授のグループの皆さんと研究を進めさせていただくことで、野心的、冒険的な実験に専心することができた。その結果、多くの方が RecA が力を出して DNA を回そうとしているのは事実かもしれないと感じるであろう。実験結果を得ることができた。(変な言い回しだが現時点ではこれしか言いようがない。) また、回転メカニズムのモデルについては主に電子顕微鏡での研究から得られた RecA フィラメントの構造パラメーターと生化学的実験から得られた ATP 加水分解活性の特徴、先の NMR による DNA 分子構造モデルに基づいているので、その独創性と正当性に対しては自信を持っている。これほどまでらせん構造の動的な特質を生かした反応機構は今まで考えられたことはなかった。一方で否定的な批判をする方は全く批判的である。私は回転の活性を見出したかも知れないが、それは回転ブラウン運動と同等ぐらいの活性でしかなかった。とすると、正味の回転をすべての人が納得するように証明することは非常に難しいということになる。実験に対して厳しい方は私の実験結果に対して冷淡でもあろう。また、いくら簡潔に美しく表現できようともモデルはモデルである。生物学の発展の歴史はモデルを提示されては否定されの繰り返しであった。私の提示した分子機構モデルは堅固な実験事実に基づいているわけでは決していない。いつどこで覆るとも限らない。私の研究はまだ中途半端な状態であることを認めないわけにはいかない。

私は私自身が科学的に真実の側に居るのか虚構の側に居るのか未だわからないのである。説得力にあふれる実験結果には誰もあこがれるし、実験というものはそのように計画されるべきなのかもしれない。私のような玉虫色からなかなか抜け出せないような実験を、しつこく続けているのは愚の骨頂であるかもしれない。しかし、分子機構モデルを導いた今はそれに基づいて実験系を組み上げ、議論することによって、少し前に進むことができるだろう。ほとんどの場合 1つの実験から明らかになることはこれっぽっちもない。私の研究は RecA の反応機構に対する大きな問題提起となるはずである。後世に DNA 相同組換え研究のブレークスルー的な扱いをされないとも限らない。あいまいな解釈を残していてもパイオニア的な実験はいつかはなされなければならないとも思う。私のやっていることは決して無駄ではない、そのような信念をもって実験を続けてきた。

それでも私は、明快さ、説得力のある実験結果を求めて、さきがけ研究の後期、RecA フィラメントの蛍光ラベルの実験に取り組んだ。RecA および DNA の運動を蛍光標識法によって実時間で追うことが可能になれば間接的に回転機構を証明することができるかもしれない。その結果、RecA フィラメントが時間とともに末端から乖離してゆくことを実時間で観測し、DNA を蛍光標識し、DNA が RecA フィラメントから抜け出てゆくことを観察できた。これらは 1分子実験の本領ともいえるべき一目瞭然、説得力のある成果である。しかし、私にとっては一種の妥協の産物ともいえる。私の最終目標は DNA が RecA フィラメントの周りをらせん状に回転しながら鎖を交換する現場を押さえ、その機構を明らかにするということである。

生命現象を研究している私達は太古の時代から流れてきている悠久なリズムを想起しないわけにはいかない。特に私はあらゆる生物を通して生命の糸を紡いできた DNA という歴史

書に畏敬の念すら覚える。そこには、生物学、化学、物理学、幾何学そういった学問が混沌として生命の関数をなし、原始の法則に同化していく。そういうものに自ら触れることに生命科学者としての喜びがあるのではないかと思う。

最後に領域総括を始め私の研究に関わったすべての方々にはこのような仕事をさせていただく機会を与えていただき、ただひたすら感謝している。私の研究生生活でこれほど実験に集中できたことはなかった。発表論文は多くないが、実験の結論に慎重にならざるを得ず、現在執筆中のものが多い。今後はこの3年間に培ってきたものを充実させまとめることとともに、それを基にして新しい分野へ発展させてゆきたい。

6. 研究総括の見解：

単鎖DNAと二重らせんDNA間で相同鎖を交換して相同組換えを可能とする大腸菌 RecAがDNAを回転させる分子モーターであることを1分子可視法を駆使して証明しようとした。本人は必ずしも十分納得してないようだが、仮説は実証されたと見られる。分子生物学上価値ある知見と考えられる。

7. 主な論文等：

論文

“DNA rotation by a coordinated conformational change of RecA filaments”,
T. Nishinaka, Nucl. Acid Res. Suppl. 1, 113-114 (2001)

“Homologous genetic recombination as an intrinsic dynamic property of a DNA structure induced by RecA/Rad51-family proteins: A possible advantage of DNA over RNA as genomic material”,

T. Shibata, T. Nishinaka, T. Mikawa, H. Aihara, H. Kurumizaka, S. Yokoyama, Y. Ito, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 98, 8425-8432 (2001)

口頭発表

(国際学会)

Taro Nishinaka, Kengo Adachi, Megumu Shio, Shukuko Ikawa³, Takehiko Shibata, Yoshie Harada, Kazuhiko Kinosita Jr, “Microscope observation of the rotation of DNA driven by RecA protein.”, 4th International Conference of Biological Physics 2001, Kyoto, July 30-August 3, 2001.

Taro Nishinaka, “Visualization of RecA filament under an optical microscope”, Biophysical Society 46th Annual Meeting, San Francisco, February 23-27, 2002.

(国内学会)

西中 太郎, “RecA フィラメントの協同的構造変化によるDNAの回転機構”, 第28回核酸化学シンポジウム, 横浜, 2001年11月7日-9日

西中太郎, “RecA反応の可視化”, 日本生化学会, 京都, 2002年10月14日-17日

西中太郎, “RecA フィラメントおよびDNA運動の可視化”, 日本生物物理学学会第40回年会, 名古屋, 2002年11月2日-4日

西中太郎, “RecA フィラメントのダイナミクスの顕微鏡観察”, 第25回日本分子生物学会, 横浜, 2002年12月11日-14日