

# 分子レベルでみた タンパク質とDNAとの結合

嶋本伸雄

総合研究大学院大学遺伝学専攻/国立遺伝学研究所

法則が論理的に完全なことと、現実に適するかどうかは別である。熱力学は、経験の集積が公理系になったもので、この世で起こる平衡のすべてを支配しているように見える。しかし、本来個々の分子の挙動を考えたものではない。生物のなかで起こるDNAとタンパク質の結合の1分子レベルの観測をきっかけに、熱力学では取り扱えない平衡現象が発見された。

## 物理からの脱出と邂逅

私が物理学科の4年生だったとき、今おもしろいことではなく、将来おもしろくなることをやろうと決めた。生物学をめざすようになった背景には、物理学に閉塞感を感じていたこともあった。生物学の学生と似た研究をしても仕方ないので、酵素反応機構論—転写反応論—1分子ダイナミクスと、ずっと時間に関することをやりながら生物学に接近した。事実、おもしろくて仕方がない。最近何のたたりか、物理に引き戻されるような事態に陥ってしまった。

それは、「エルゴード問題」と呼ばれ、ある分子の集団を対象に熱力学的法則が適用できるかどうかというボルツマンの時代からの超古典的問題である(文献1,2)。この問題は、物理の古典的問題が現代生物学に顔を出したという意味でおもしろいだけでなく、現代における生物学と物理学との関係を象徴していておもしろい。さらに、物質の行動の単位が分子である効果が直接生物学に顕れた希有の例にもなっている。

生物においても、熱力学的概念である親和性や安定性は重要である。それゆえに、生物学的な親和性や安定性が熱力学のものと食い違うといろいろな不都合や誤解が生じるのである。ここでは、DNAに結合して遺伝子発現にかかわるタンパク質とDNAとの結合平衡の1分子実験、

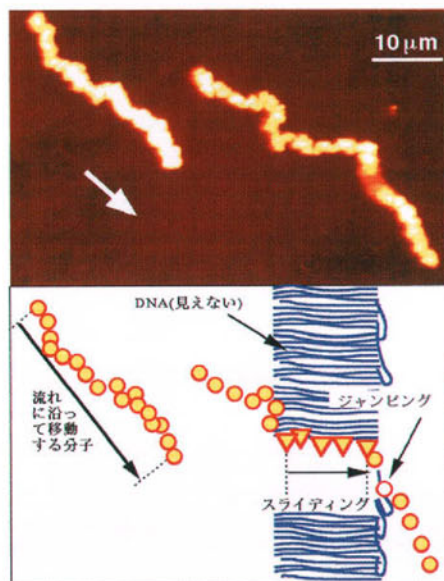
多分子実験の結果を述べる。実は、個々の分子の挙動を眺めると、多分子集団では普通気が付かない熱力学的矛盾が見えてくるのである。少々こみ入った話になるが、ぜひおつきあいいただきたい。

## DNAの上をスライドして 結合すべき場所を探すタンパク質

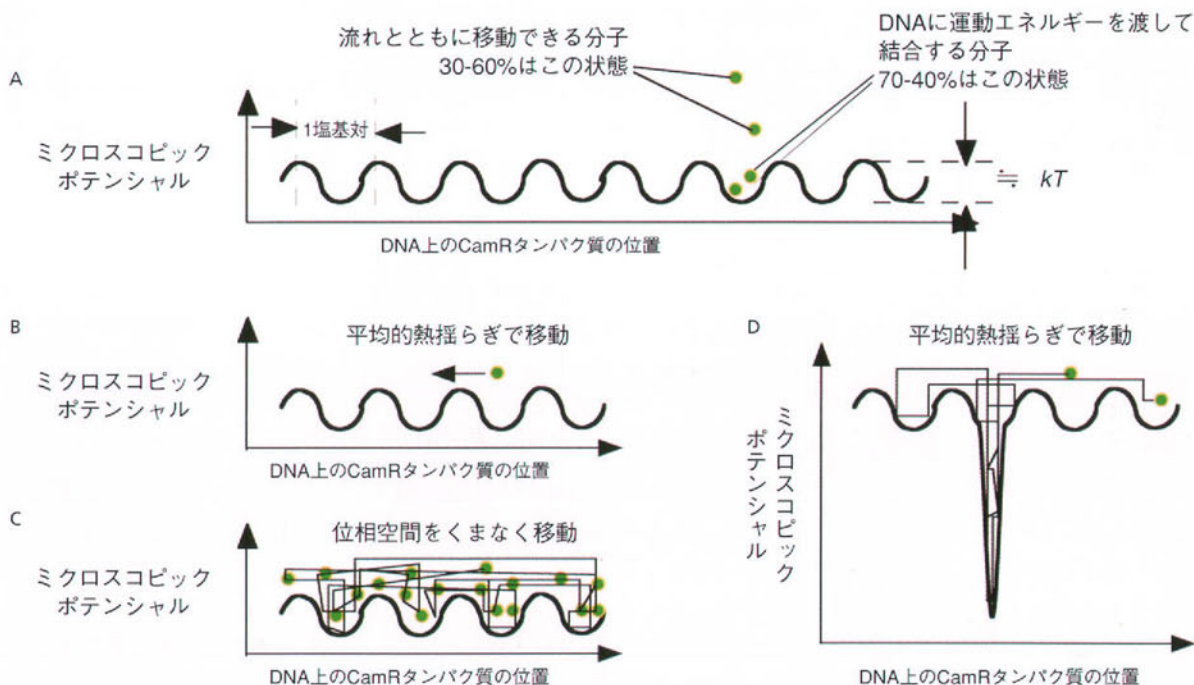
DNA上の遺伝情報はまずmRNAに転写される。この働きをする酵素がRNAポリメラーゼだ。この酵素は、長いDNAから転写を開始すべき部位(プロモーター)を見つけだし、そこに結合しなければならない。一方、リプレッサーは、プロモーター付近の部位(オペレーター)に結合し、RNAポリメラーゼを排除す

る。つまり、どちらのタンパク質も、結合すべき場所に結合して特異的複合体をつくるのが、機能を発揮するために必須である。

大部分のDNA結合タンパク質は、特異的部位以外の場所に結合して「非特異的複合体」をつくることが知られている。また、タンパク質がDNAの上を一次元的に拡散する可能性が議論されていた(文献3)。私たちは1分子計測の実験を設計し、大腸菌RNAポリメラーゼに應用して、はじめてスライディングを実証した(文献4)。DNAをスライドガラス上に多数平行に固定しておき、RNAポリメラーゼに蛍光物質を結合したものを、緩衝液の流れに乗せてスライドガラス上に流す(①)。



①スライディングする大腸菌RNAポリメラーゼ分子  
長さ15 μmの多数のT7 DNAの両端をスライドガラス表面に固定しておく。一方、DNA結合能を保存するように蛍光ラベルしたRNAポリメラーゼを含む緩衝液を斜めに流した。まず、ポリメラーゼは流れに沿って斜め下に向かうが、DNAのある領域(中央)では、スライディングにより水平方向に移動し、これを過ぎると再び流れに平行した動きに変わった。



## ●DNA上のタンパク質の運動

A. DNAとタンパク質の摩擦のミクロ的解釈。

緩やかな外流に追従する状態と追従しない状態との時間的平均がスライディングの速度となる。

B. 平均的热運動で移動できる位相空間は単一の熱力学的状態に属する。

C. 位相空間をくまなく移動できるだけの時間DNA上にとどまるなら、それが単一の熱力学的状態になる。

D. 特異的部位を含む熱力学的状態は、深いポテンシャルの谷にあたるが、Cと同じ理由で周辺の非特異的部位も含む。

このため、生物学的に意味をもつ特異的複合体は、熱力学的状態でなくなる。

緩衝液の流れは、矢印で示したように左上から右下に向かっていて、映像で見ていただけないのが残念だが、ポリメラーゼも最初は流れに乗ってその方向に移動する。しかし、ある場所から水平方向に向きが変わり、しばらく移動した後に再び流れに乗る(右の輝線)。スライドガラスに固定されたDNAに沿って動いたと考えられる移動の仕方である。

この結果は、生物学で大きな意味をもつ。タンパク質は特異的部位に結合してはじめて働くが、いきなり特異的部位を見つけて結合することはできない。タンパク質に目があるわけではないからだ。その代わりに、とりあえずDNAのどこかにくっついてDNA分子上をすべるように移動する。そして、DNAとの複合体が最も安定になる場所、つまり特異的部

位で機能できる複合体をつくる。そのために、タンパク質とDNAの非特異的複合体は、外部の流れに追従してポリメラーゼが動くぐらい動的なものになっているのだ。

## スライディングの分子イメージ

RNAポリメラーゼがDNAの上をスライドして機能すべき場所に落ち着くというだけでもおもしろく、生物学のダイナミックな側面を見せてくれるが、実は、この現象にはもっと深い物理学的意義と生物学的意義が潜んでいる。物理学的意義は、この現象が「エルゴード仮説」に従わず、新たな物理学を要求することだ。

私達は、ポリメラーゼの後に、CamRというタンパク質がDNAに沿って水平方向に移動するのと同じ方法で観測し

た。このタンパク質は、本来、防御のための毒であるショウノウを、栄養として利用できる菌*P.putida*のショウノウ利用反応に関係している。これがスライドしているときの速度は、緩衝液の水平方向の流速の30~60%であった。この結果はどう解釈したらよいだろうか。CamRがスライドガラス上のDNAにしっかり結合しているなら、緩衝液の流れに押されてもこんなに速くDNA上を移動することはできない。

まず、CamRがDNAに「しっかり結合していない」ということを分子のレベルで考えてみよう。水溶液中のタンパク質と水の分子は、そのときの温度に応じた熱運動をしている。つまり、水溶液中の全分子はさまざまな方向にさまざまな速さで動いている。分子どうしが衝突する

たびに、分子の動く向きや速さは変わり、速度に応じた運動エネルギーも変わる。そんな押し合い、へし合いのなかでタンパク質分子も右往左往し、そのエネルギーは刻々変化する。「しっかり結合していない」状態とは、タンパク質がこのような熱運動でDNAに沿って移動できる結合状態をさす。

これをポテンシャルという物理の言葉を使って言い換えてみよう。②Aを見てほしい。CamRが固定されるのは、このタンパク質がDNAのポテンシャルの中(谷の部分)にはまり込んだ状態である。スライディングは、このポテンシャルの山をつぎつぎに越えていくことに相当する。衝突にはさまざまな強さのものがあるので、CamR分子のなかには水分子の衝突を受けるうちにこの山よりも高い熱運動エネルギーをもつものが出てくる。そして、これらの分子は緩衝液の流れに乗り、次の谷に移動するのである。緩衝液の流速の30~60%で移動したという上の結果は、CamR分子が山より高い運動エネルギーをもっていた時間が30~60%存在していたことになる。

### 熱力学のトリックとその限界

熱力学の法則は、元来経験則で、多くの分子からなるマクロな系の状態を対象としている。熱力学で扱うマクロ状態と分子個々のミクロ状態(すべての原子の位置と速度)の集合との関係は一筋縄ではいかない。このため、ミクロ状態の集合をマクロ状態として扱えるようにするための条件として、エルゴード仮説というものがある。この仮定では、刻々変わっていくミクロ状態の集合が一定の分布にある、つまり分布が平衡に達した状態をマクロ状態と見なす。言い換えれば、ある時間以内に起こる変化は無視し、それより遅い変化のみに注目するのである。

エルゴード仮説の一般的解説はややこしいので後回しにし、タンパク質とDNAの結合状態の場合を考えてみよう。熱力学では、平均的な熱運動は無視するので、エルゴード仮説では、平均的な熱運動で移り変わるミクロ状態はすべて

1つの熱力学的状態に含まれる。タンパク質が非特異的部位にいる場合、1つの谷にタンパク質がいる状態は、平均的な熱運動によって他の状態に移り変わるので(②B)、個々の非特異的複合体は熱力学的状態でない。もし、タンパク質分子がDNAの長い非特異的部分に長時間にわたってとどまり、さまざまなミクロ状態を大部分経験できるならば、すべての非特異的複合体をひとまとめにして熱力学的状態と見なすことはできる(②C)。しかし実際には、非特異的複合体の寿命は割合短いので、これも一般的には保証できない。

なんのために、こんな議論をくどくどと展開しているのかと思われる読者もあるだろう。しかし、この「エルゴード仮説に従わない」ということが生物では大きな意味をもってくる。生物的には明確な意味をもつ特異的複合体をポテンシャルで表現すると、②Dのように深い谷になる。だから、結合すると谷に落ち込み、平均的な熱運動では出られない。つまり、がっちり結合するのである。特異的複合体は熱運動で壊れにくく、上で議論した観点から見ればエルゴード仮説に従う一つの状態になり、熱力学的な扱いができそうに見える。しかし、特異的部位の両側には、非特異的部位の浅い谷があり、タンパク質はここから平均的な熱運動で特異的部位に到達する。このため、特異的部位とこれらの非特異的部位は分離できず、特異的複合体は一つの熱力学的状態でなくなる。生物学的には明確に機能で定義できる特異的複合体が、熱力学では扱えないという、生物学と物理学との乖離が起こるのである。

CamRの1分子計測実験では、タンパク質の特異的部位への結合はほぼすべてスライディングを経て起こるのに対し、特異的部位に結合していたタンパク質が解離するときには、スライディングを利用せず直接解離した。これも、エルゴード的な状態では、平衡状態における反応経路の不一致として、禁止されている現象である。

### 熱力学でない平衡

複合体の形成といった事象は、熱力学では、結合平衡として記述される。AとBという分子が結合してABができるとき、A、B、ABの濃度の間に一定の関係が成り立つ。タンパク質がDNAのある部位に結合してできる複合体の場合は、以下のようなおなじみの平衡式に従うことになる。

$$K_{\text{site}} = \frac{\left[ \begin{array}{c} \text{遊離状態の} \\ \text{タンパク質} \end{array} \right] \left[ \begin{array}{c} \text{空の} \\ \text{結合部位} \end{array} \right]}{\left[ \text{ある結合部位での複合体} \right]} \quad (1)$$

この式で $K_{\text{site}}$ は結合定数であり、[ ]はそのなかのものの濃度を示す。この式が熱力学で導かれている以上、この式が成り立つのは、[ ]のなかのすべてのものが熱力学的状態にある場合だけなのだ。タンパク質とDNAの場合、分母にあたる複合体は、非特異的複合体はもちろん特異的複合体も熱力学的状態ではない。従って、この式で複合体の形成を考えるわけにはいかない。実はこれが生物には幸いする。

実際に結合実験をしてみると、(1)式は結構よく成り立つ。しかし、熱力学が成立する証拠にはならない。実は、CamRでは、(1)式は成り立つが、熱力学の予言と異なって $K_{\text{site}}$ は定数でなく、用いるDNAの長さに依存する変数となる結果が得られた。つまり、複合体のできやすさが、DNAの長さによって変わるのである。同じ特異的部位を含むDNA断片でも、非特異的複合体がスライディングできる長さを十分にとれる長い断片のほうが、特異的部位への結合が起こりやすくなる。このDNAの長さの効果を「アンテナ効果」と呼ぶ(③A, 文献3)。こうした効果は、分子を意識しない熱力学では記述できず、1分子の挙動に基づいた統計的手法ではじめて説明できる真の分子効果なのである。アンテナ効果は、RNAポリメラーゼではあまり大きくないが、CamRでは顕著であった。DNAを32塩基対から410塩基対に延ばすと、特

異的結合部位への結合は100倍起こりやすくなった。この効果は、特異的複合体が同じDNAと2カ所で結合している場合にも起こる(③B)が、CamRの場合は、その機構ではなく、スライディングによる結合過程の加速で起こっていた(③C)。

### 物質と分子の混同と熱力学の迷信

このスライディングによる効果の意義を、ここで少し強調しておきたい。分子生物学の登場により、概念的であった生物の論理が物質レベルに還元された。分子生物学の発展には物理出身者も大きく貢献し、かつて深い溝があった生物学と物理学や化学との間は急速に接近した。そのこと自体は大きな進展であるが、その際、生物現象にかかわる「分子」が、化学反応にかかわる「物質」とほぼ等しいイメージでとらえられるようになってしまった。分子を意識しない「物質」の扱い方を用いて、頭のなかでは個々の「分子」の振る舞いをイメージするとい

うちぐはぐが、教育を通して普遍化したのである。

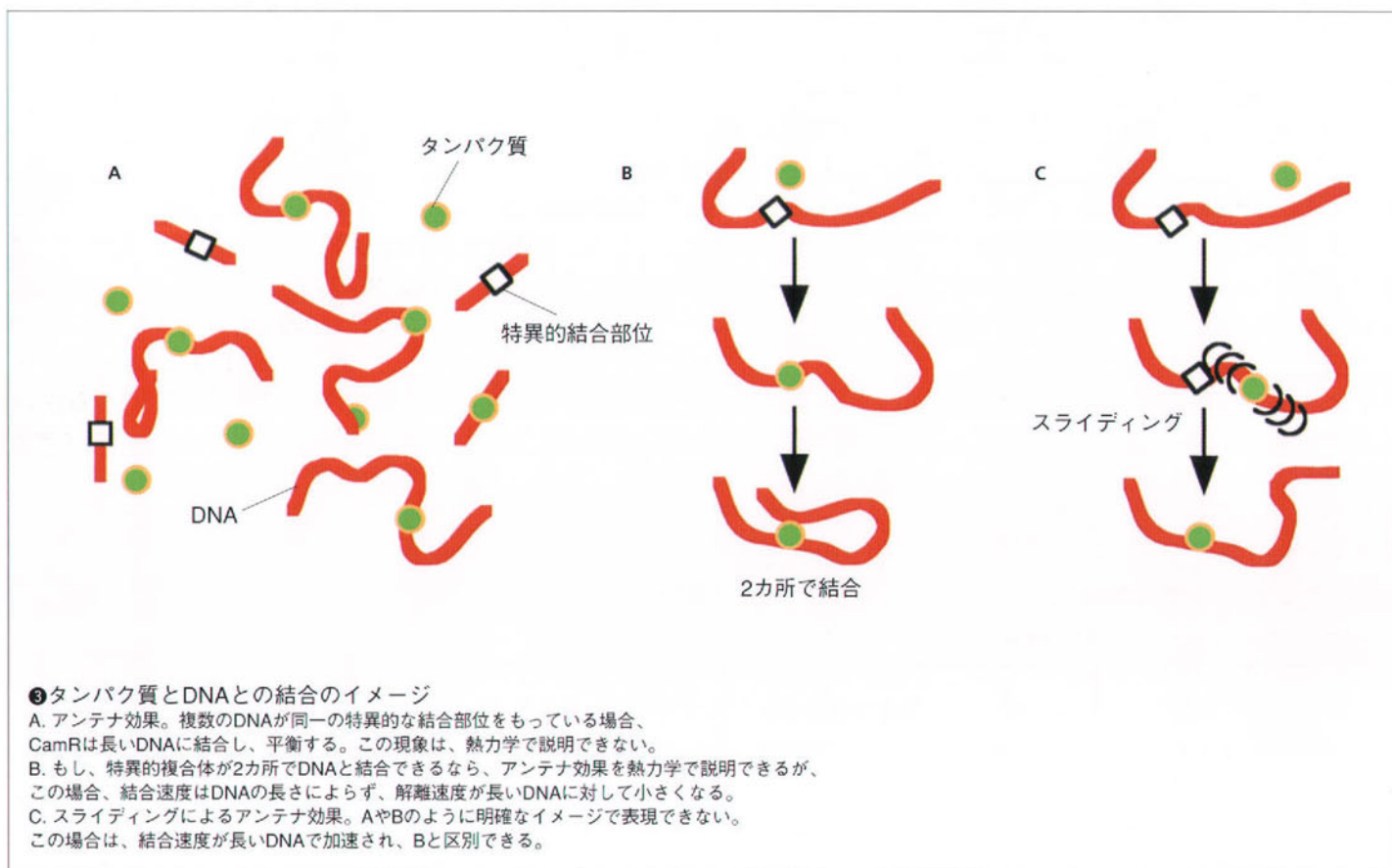
たとえば、DNAにタンパク質が結合した状態を考えると、長いDNA分子の特定の位置に丸いタンパク質がくっついている状態を想像する(③Cの一番下)。その状態は明らかに隣の部位にくっついている状態とはイメージとして異なるので、各々が独立した状態で、その間の反応や平衡関係を速度論や熱力学で導くことができると思いきや、また、熱運動をしている状態はイメージしにくい(②Cと③C)。しかし、分子の状態が速度論や熱力学で記述できるためには、エルゴード仮説を満たす必要があるが、この必要性を実験で証明したり、イメージしたりするのは、とても難しい。つまり、上で述べた「どんな状態でも平衡していれば熱力学に従う」という見方を暗黙のうちにとらざるを得ないことになっているのである。筆者が発見したスライディングにおけるアンテナ効果は、この「す

べての平衡は熱力学で扱える」という迷信をうち破る意味をもっている。

### アンテナ効果を利用する生物

実際に細胞内でスライディングによるアンテナ効果は働いている。大腸菌が外部からトリプトファンを取り込める状態のとき、むだになるトリプトファン合成遺伝子の発現はリプレッサーTrpRによって抑えられる。TrpRの特異的結合部位への結合は、非特異的結合部位への結合に比べて500倍しか強くないと測定された(文献5)。増殖期の大腸菌では、 $10^7$ 個に近い非特異的結合部位が露出しているため、その間に1個しかない特異的結合部位にTrpRが結合して機能するためには、 $10^4$ - $10^5$ 個程度のTrpR分子が存在する必要がある。しかし、実際のTrpRのコピー数はたった100のオーダーで(文献6)、必要量の1%しか存在しない。これは熱力学的矛盾である。

そこでTrpRのアンテナ効果を測定し



## エルゴード仮説と熱力学・速度論

人間が観測することにより決めることができる物質の状態、例えば特異的複合体、はマクロ状態と呼ばれ、含まれる原子すべての位置や速度の異なる膨大な数のミクロ状態までは決定できない。このため、ミクロ状態の分布を仮定しない限り、マクロ状態の性質、例えば複合体の分解の速さをミクロ状態から計算できない。熱力学の利用を念頭におき、第二法則（エントロピー増大則）を満たすような分布としてボルツマンにより提唱されたのがエルゴード仮説で、別のマクロ状態に移る前に、大部分のミクロ状態は均一に実現される、というものである。（後に、位相空間という力学的な概念を用いて、物理量の時間平均と位相平均が等しいということとなった。）この仮定を満たす平衡した状態には熱力学を適用することができる。

速度論は、反応量を時間によらない速度定数と物質の濃度との積で表現できることを仮定した非平衡論であるが、濃度が割りふられるマクロ状態に対して、エルゴード性を仮定する。つまり、平衡状態からそれほどずれていないとする。すると、どのミクロ状態も、同じ時間経過の道筋にあるので、遅いか早いかだけで、同一の頻度で反応を起こすことになる。だからこそ、異なるミクロ状態を濃度でひとくくりに取り扱えるのである。

エルゴード仮説は、このように分子のさまざまな状態の均一さの証明ではなく仮定であり、不均一な運動の可能性を否定するものではない。熱力学・速度論の公理系は、[エルゴード性の確立

に要する時間] ≪ [反応時間] を前提とし、この関係を満たす反応しか取り扱えない。実は、スライディングではこの関係は成立せず、適用外である。

## 熱力学、エントロピー、第二法則の誤解と迷信

過去に、熱力学はもっとも基準とすべき科学と考えられた時代があり、量子論の誕生にも関係した（文献7）。もっとも広く行き渡っている迷信は、熱力学が経験とよく一致するので（経験則だったので当然である）、「平衡状態は、常にエルゴード的である」というものだ。熱力学の迷信はさらに「エントロピー」でエスカレートする。この言葉の一見高尚な響きに、「秩序」や「生命」といった社会的価値観をもつ言葉を重ね合わせて、この迷信は盛り上がる。一方、自殺に追い込まれてしまったボルツマンの墓には、 $k \cdot \log W$ と刻まれている。エントロピーの定義式であり、実はエントロピーはこれ以上でもこれ以下でもない。ボルツマンの努力は、この彼の名前をもつ  $k$  という定数を原子・分子あたりの単位とするとところにある。量子論も電子顕微鏡もなかった時代に、物質の行動の単位として原子・分子が存在することを力学と熱力学の食い違いから主張したのである。まことに「原子を愛した男（文献2）」であった。

なぜ  $\log$  なのだろうか？ 彼は可逆なミクロの法則と非可逆な熱力学を結合させるために、まれにしか実現しない状態からありふれた状態への変化、という形で確率を導入した。2つの事象が

てみると16塩基対から4000塩基対まで1万倍以上あった。上記の500倍という報告は、短い（42塩基対の）DNAを用いて測定された。TrpRがスライディングできるDNAの長さが1000塩基対程度ならば、特異性はさらに100倍され、コピー数は100程度で事足りる。つまり、大腸菌はスライディングによるアンテナ効果を利用して、TrpRのコピー数を100分の1に節約しているのである。これが、スライディングによるアンテナ効果の生理的意義の最初の証明である。さらに、スライディングによるアンテナ効果は、

本来独立した複数の異なる部位でのDNA複合体形成が干渉するという効果をうみだすので、調節ネットワークの結び目として機能できる。今後の具体例の発見が楽しみである。

このように、一見単純なタンパク質とDNAとの結合は、熱力学の限界を示し、物質が分子から構成されていることの効果をマクロな形で見せるという深遠な意味をもつだけでなく、これまで知られていなかった遺伝子発現調節機構としても重要である。詳しく知りたい読者は、囲みと文献を参考にしてほしい。この拙文

をきっかけに、生物学者にも、物理学者にも、また、知的好奇心にあふれた一般読者にも、何らかの問題意識をもっていただければ幸いである。

[謝辞] 熱力学に関わる一般的文献は、共同研究者の遺伝学研究所 富澤純一博士が発掘されたものである。摩擦の分子論は同じ総研大の核融合科学専攻（核融合科学研究所）佐藤哲也研究室との議論で得られたものである。斎藤信彦博士をはじめとする方々との議論にも感謝します。

なにバカ言ってるの。  
ただの蚊取り線香の  
豚じゃない。

エルゴディックに考えない  
といけない。均一なセラミ  
ックだから、煙などないは  
ずだ。目の錯覚だろう。

うーむ、  
この煙の機能は何だ？  
煙の遺伝子をノックアウト  
してみよう。



同じ現象でも、見方と信じている仮定で、適用する法則を誤ることがある。

重なって起こる条件付き確率は2つの確率の積で与えられる。私の考えるところ、元来人間は積というのは苦手な、和や差ほどの直感は働かない。そのために対数 (log) を用いたのである。これが理由で、実際に用いる平衡定数、速度定数等にするときには、必ず指数関数で戻さなければならないのである。つまり、エントロピーなどは対数目盛の計算尺なのである。エントロピーに関す

る多くの混乱や神秘性は、 $\log W$ の $W$ が、単なる「起こりうる場合の数」ではなく、「同じ確率で起こりそうな場合の数」でなければならないことを無視することによる。ミクロのすべてを知らなくても予言ができる神秘のエントロピーではなく、すべてを知らなければわからない確率ではじめて計算できるエントロピーなのである。

嶋本伸雄 (しまもと・のぶお)

この研究について、国際的な学者が目の前で怒り狂ったり、感激のあまりハイになったりしたことがある。つまりところ「理解する」ということは「好き」ということであり、「わからない」ということは「不安で嫌い」ということだと思いついた。私は、同時に2つを比較して考えることしかできないが、同じ総研大の笠谷和比古先生によれば、3つ考えておられるそうである。つくづく科学者(私だけとは思いたくないので)はあほなのだと思う。



[参考文献]

- 1) この重要な点を明記した教科書は少ない。M. Toda, R. Kubo & N. Saito, "Statistical Physics I: Equilibrium Statistical Mechanics," pp.169-182, Springer: テル・ハール、「熱統計力学」第1巻付録、みすず書房。
- 2) Boltzmannの戦いを記したものはDavid Lindley, "Boltzmann's Atom: The Great Debate That Launched a Revolution in Physics," Free Press (2000); Carlo Cercignani, "Ludwig Boltzmann: The man who loved atoms," Oxford Press (1998); 熱力学の成立を思考史として記したものは、山本義隆、「熱学思想の史的展開—熱とエントロピー」、現代数学社 (1987)。
- 3) 最近の総説は、N. Shimamoto, *J. Biol. Chem.* 274, 15293-15296(1999)。
- 4) H. Kabata *et al.*, *Science* 262, 1561-1563(1993)。
- 5) J. Carey, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 975-979(1988)。
- 6) R. P. Gunsalus *et al.*, *J. Bacteriol.* 167, 272-278(1986)。
- 7) W.ハイゼンベルグ、「部分と全体」(湯川秀樹序、山崎和夫訳)、みすず書房。