



In Laboratory Now

研究室訪問 3

タンパク質の足音を追う

白髭 克彦 研究室～生体システム専攻



白髭 克彦 助教授

近年、バイオテクノロジーは急速に進歩し、私達人間のゲノムの塩基配列までもが決定されるようになった。遺伝子研究が目覚ましい発展を遂げている今、生物学は遺伝子の機能を解析する新しい時代へと進展しつつあるのである。

この遺伝子の機能を詳しく知るには、遺伝に関わるタンパク質の働きを研究することが欠かせない。このタンパク質が人間の体内で起きる様々な反応を大きく左右しているからだ。ここでは、白髭先生が行っている、複製や転写に関わるタンパク質の研究に触れてみようと思う。



DNAの世界を覗く新たな手法

生物の体は、多種多様なタンパク質で構成されている。例えば、人間の肌や内臓の強度を保つコラーゲンや、筋肉の収縮源として体を支えているミオシンなどが挙げられる。

しかし、タンパク質は単に生物の体を構成するためだけの物質ではない。生体内で起こる様々な反応を調節するという重要な役割も担っているのである。生体内の化学反応を活性化させるのに用いられている酵素などが良い例である。

白髭先生は調節に関わるタンパク質の中でも、DNAをコピーする過程(DNA複製)を調節するものについて主に研究している。

DNAは二重らせん構造をしている。細胞が分裂する前に、この二重らせん構造の二本鎖がほどかれ、それぞれの鎖を鋳型として新しいDNA鎖が合成されていくことで複製が行われる(図1)。この複製の過程に、様々なタンパク質が関わっているのである。DNAの二本鎖がほどかれ、実際に複製が起きている部分は複製フォークと呼ばれるが、ここでもDNAを一本鎖に展開するタンパク質、展開された一本鎖のDNAに沿い新たなDNA鎖を合成するタンパク質などが集まって

働いている。

しかし、複製を進行させるタンパク質だけでは、完全にDNA鎖を合成することはできない。複製の過程で異常が生じると、DNA鎖に欠陥を持った細胞が作られて、結果的に癌や腫瘍につながってしまうのだ。

私達の体は、このような場合に直ちに異常を修復し、正しいDNA配列を維持できるような機能を備えていることが知られている。この異常を感じする仕組みが、複製チェックポイント制御機構である。この機構は複製を停止して異常の拡大を防ぎ、スムーズに修復が開始できるような手助けを行っているのである。

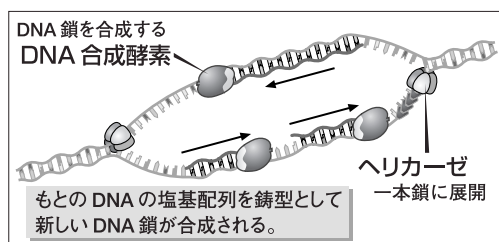


図1 複製フォーク

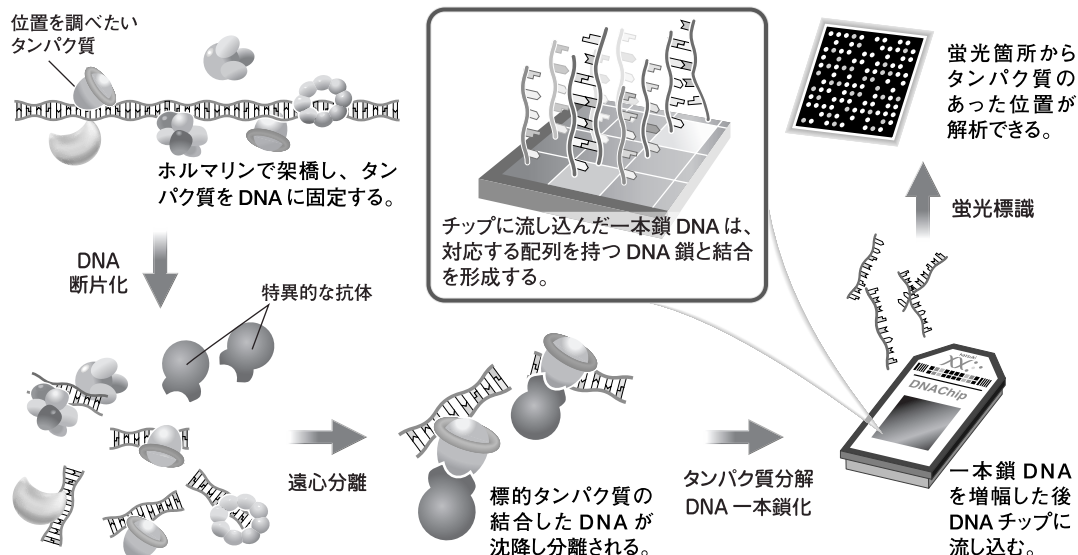


図2 ChIP-chip法

複製チェックポイント制御機構の仕組みは非常に複雑であり、様々なタンパク質が連携し適切に機能することで複製チェックポイント制御機構としての働きが発揮される。ここで白髭先生は細胞内のどのタンパク質が複製チェックポイント制御機構を活性化させるのか、なぜ異常が生じてすぐ複製を停止させることができるのかという問題にぶつかった。そして、この問題を究明することから先生の研究が始まったのである。

これらのタンパク質の機能を知る上では、DNA鎖上でタンパク質がどのように配置しているかを捉えることが欠かせない。しかし、タンパク質の位置を正確に把握することは今まで困難だったのである。

そこで、白髭先生をはじめとする研究グループは、今世紀に入ってから普及したDNAチップをいち早く取り入れ、画期的な技術を開発した。これがChIP-chip法という手法である(図2)。この方法では、まずDNAの周りに存在しているタンパク質を細胞内で一度にDNA鎖にしっかりと固定する。これによって、ある瞬間の状態を保ったままDNAを取り出せるようになる。

次に、取り出したDNAを適当な長さに切り出し、標的タンパク質のみに特異的に結合するタンパク質を結合させる。これによって標的タンパク質の結合したDNA断片だけが重くなるので、遠

心分離によって沈降していくという仕組みだ。この操作を行うことによって、標的タンパク質の結合したDNA断片を他の全てのDNA断片から一度に分離することができるのである。

ここで白髭先生は、分離したDNA断片が全体のDNA鎖上のどの位置にあったのかを詳しく調べるために、DNAチップを利用した。DNAチップには、その基板上に一本鎖のDNAが同じ長さに区切られて並んでいる。分離したDNA断片を一本鎖にして、これをDNAチップ上に流し込むと、基板上にある一本鎖のDNAとDNA断片が結合していく。

この方法を用いることで、DNA断片の位置から標的タンパク質の位置を細かく特定することができる。複製が開始する時刻から時間を少しずつ変化させていき測定を繰り返していけば、タンパク質の位置はもちろん、タンパク質がどのような挙動を示すのかということまで知ることができるのである。

このようなChIP-chip法での解析を活かし、白髭先生は複製が起きている時に、複製チェックポイント制御機構を働かせるタンパク質を調べることにした。まず複製過程で、薬剤によって人為的にDNA上に異常を生じさせる。そして、複製時に新しく合成されていくDNA鎖をBrdUという基質で標識し、複製が進む様子が観察できるように

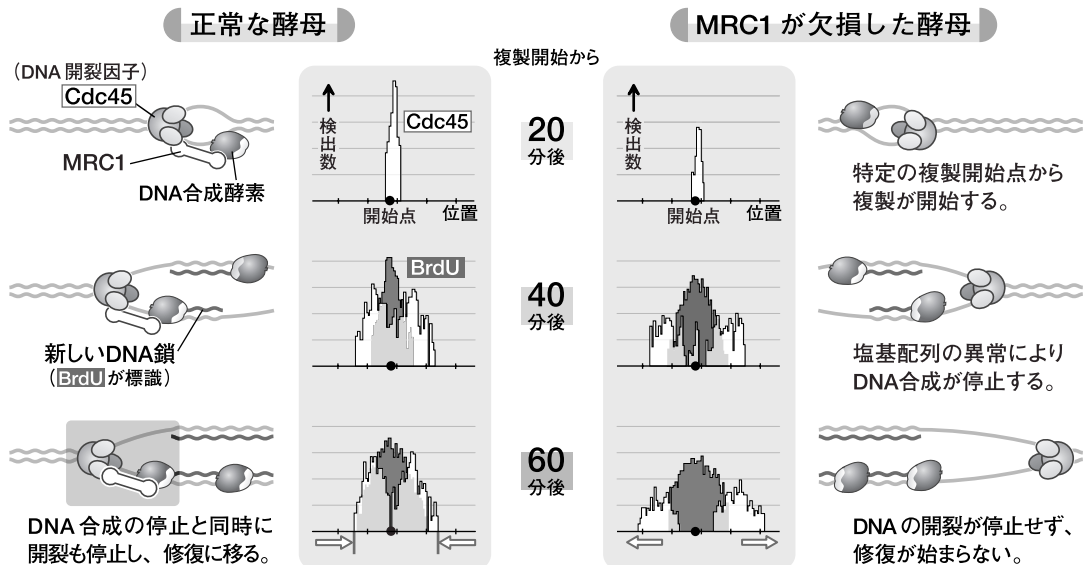


図3 正常な酵母とMRC1が欠損している酵母でのChIP-chip法の結果

する。ここで、複製フォークに関わっているタンパク質を調べて、そのタンパク質がどこに位置しているのかを測定した。

すると、いくつかのタンパク質は異常が生じることで初めて活性化し、複製フォークに結合した。しかし、MRC1とTOF1というタンパク質のみは異常の有無に関わらず、複製フォーク上に常に存在していることが分かったのである。

この結果より、先生はMRC1とTOF1というタンパク質が複製チェックポイント制御機構を働かせる発端になっているのではないかと考えた。そこで、MRC1とTOF1それぞれが欠損した酵母のDNAを用いて、薬剤添加時の複製が起きている領域について解析した。そして、これらのタンパク質が存在する場合と存在しない場合の複製の進みを比較した。

図3左は正常な酵母での、図3右はMRC1が欠損した酵母での複製の進みをChIP-chip法を用いて観察した結果である。ここで、Cdc45は複製時にDNAを開裂している(DNAの二本鎖を一本鎖にほどく)部分であり、BrdUは複製が進む過程で合成されているDNA鎖を表している。Cdc45は白いグラフ、BrdUは黒いグラフで示している。また、グラフは異常が発生した時のCdc45とBrdUの複製開始点からの進み方とそれぞれの位置での検出数、図は複製開始点から複製

が始まった時の複製フォーク領域の様子であり、異常が生じた時の各タンパク質の反応を示している。もし異常が生じたことを正しく感知することができれば、Cdc45とBrdUも複製開始点に近いところで停止するはずである。

図3の白いグラフを比較してほしい。正常な酵母では、時間が経過するとDNA鎖の開裂が停止している。それに対して、MRC1が欠損した酵母では、時間が経過してもDNA鎖の開裂が進み続けている。これは正常な酵母では速やかに複製が停止し、異常の修復が始まったのに対して、MRC1が欠損した酵母では、異常が修復されないまま複製が進み、その結果複製フォーク領域の構造が崩壊してしまったためである。TOF1についても、MRC1と同じような実験結果を得ることができた。

このことにより、MRC1とTOF1は複製異常が生じた際にその複製異常を感知して、複製を停止させるという、修復を始めるために必要な働きを持つことが明らかになった。さらに、MRC1とTOF1が欠損すると複製フォーク領域の構造が崩壊したことから、MRC1とTOF1は複製フォーク領域の構造を維持するということも分かった。MRC1とTOF1は修復開始に必要なタンパク質であると同時に、複製フォーク領域を維持するという大切な役割も果たしているのである。



知られざるコヒーシンの役割

先生が開発したChIP-chip法はMRC1やTOF1といったチェックポイントに関わるタンパク質の働きを解明しただけではなく、他の様々なタンパク質の研究にも大きく貢献している。今までは解析することが難しく、想像するしかなかったタンパク質の働きを実際に観察できるようになったからだ。そこで先生は、このChIP-chip法でコヒーシンというタンパク質を解析しようと考えた。

コヒーシンは、細胞が分裂する際に働くタンパク質であり、一組の染色体が正確に二つに分裂して、分裂した細胞それぞれに同数の染色体が分配されるのを助けている。しかし、コヒーシンが染色体上のどこにあり、どのような役割を果たしているかなどといった詳細はこれまで調べられていなかった。

細胞分裂が起こっていない時のコヒーシンの働きに興味を持った先生は、コヒーシンと転写との関係について詳しく調べてみることにした。転写とは、DNAの塩基配列を読み取り、それに対応する塩基配列を持つRNAを合成する働きであり、RNAの情報をもとにタンパク質が作られる。

初めに先生は、転写が始まった時のコヒーシンの動きを観察した。すると、転写が始まってRNA合成酵素などの他のタンパク質が結合すると、ゲノム上に結合しているコヒーシンはそれを避けるようにして移動したのである(図4)。また細胞が分化する、熱処理を受けるなどして転写の起こる状況が変化すると、それに伴ってコヒーシンはDNA上を移動していった。コヒーシンの移動は、ものによっては1万塩基以上もの距離に及ぶことが観察された。

このようなことから、DNA上を自由に移動で

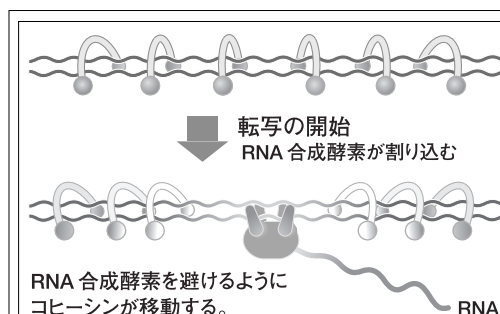


図4 染色体上を移動するコヒーシン

きるのは、コヒーシンがカーテンリングのような環状構造をしているためだと推察された。また、転写状況によってコヒーシンが位置を変えるということから、コヒーシンは染色体の分配という自身の役割と転写という働きを、互いに阻害しないようにうまく機能させているということが明らかになった。

またさらに、最近の研究によると、新しく複製されたDNA鎖がコヒーシンの輪をくぐるためには、MRC1とTOF1が必要であるということも分かっている。これからの課題は、どうすればDNA鎖がコヒーシンの輪を通り抜けて、うまく複製を進めていくことができるのかを研究することだと先生は言う。

白髭先生は今後、ヒト染色体の構造や機能の研究にも取り組んでいくつもりだ。ヒト染色体の研究が進めば、医療面などの様々な分野において大いなる貢献が期待できるだろう。これからは様々なタンパク質の構造や機能を、複製や転写といった違った方向から研究していくことがますます重要になってくるに違いない。

初めての主筆ということもあり、取材ではとても緊張してしまいましたが、先生の話は私にとって大変興味深いものでした。

DNAチップを用いたChIP-chip法によって、タンパク質の構造や機能だけでなく挙動まで観察できるということにとっても驚きました。ちょっと視点を変えるだけでこんなにも多くの発見ができる

生物の研究はとてもやりがいのあるものですし、私もぜひこのような研究に関わっていきたいと強く感じました。

最後になりましたが、非常にお忙しい中、快く取材を引き受けてくださった白髭先生と白髭研究室の方々に、この場を借りて御礼申し上げます。本当にありがとうございました。(香月 美穂)