

特別講演

分子生物学研究を支えたアイソトープ： 「染色体の複製とその制御の分子生物学」を一例として

奈良先端科学技術大学院大学

教授 吉 川 寛

私達の研究室の主な研究テーマは、「真核細胞ゲノムの機能解析」、「真核生物ゲノムの複製と制御の分子機構」、「ゲノム複製開始の調節と細胞増殖制御の接点」ですが、本講演では最初に少し昔を振り返りながら分子生物学を支えたアイソトープというようなテーマでお話した後に、アイソトープを利用した私達の研究について紹介することにします。

1 分子生物学を支えたアイソトープ

1-1 遺伝子=DNAの証明(図1)

ちょうど50年前になりますが、遺伝子がDNAであるということが、アイソトープをうまく使い分けて証明されました。すなわち、タンパク質でできたバクテリオファージの殻を ^{35}S で、殻に包まれたDNAを ^{32}P で標識し、これを用いてファージの感染過程におけるタンパク質とDNAの行方を追跡したところ、ファージからバクテリア細胞に導入されるのは、 ^{32}P で標識したDNAだけであるということが分かり、遺伝子=DNAが証明されたわけです。その当時は、タンパク質が万能の時代でした。有名なグリフィスによる肺炎双球菌を用いた形質転換の実験でも、転換因子(transforming principle)の中に混在している1%に満たないタンパク質が遺伝子機能を有するに違いないという反論がその当時の学会の主流でした。このファージ感染実験(A.D.HersheyとM.Chaseの実験)によって、DNAが遺伝子であるということがようやく証明された、歴史的に重要な研究です。

1-2 Star experiment (星の実験) によるファージゲノムの定量(図2)

次に紹介するStar experiment「星の実験」はもう死語になっていますが、1960年代には分子生物学の発展にとって非常に画期的な研究でした。図2の下段左図は、図1と同じ大腸菌に感染するT2バクテリオファージで、ファージゲノムのDNAが一本の直線状

分子生物学を支えたアイソトープ

遺伝子=DNAの証明

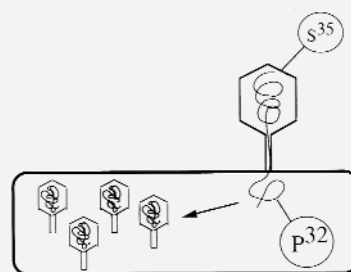


図1 分子生物学を支えたアイソトープ：バクテリオファージの感染による遺伝子の実体の証明

DNAであることを示しています。下段右図の電子顕微鏡写真は感染したファージの増殖の様子を示しています。さて、このファージ粒子からあらかじめ ^{32}P で標識したDNAを抽出し、そのDNAをオートラジオグラフィで撮った像が上段の図です。オートラジオグラムでは ^{32}P が崩壊して放出される β 線の軌跡(約100 μm)が、ちょうど星のように見えます。この星の数を数え、露出時間と元の ^{32}P の比放射能から星の核になっているDNAの量を推定することができます。次に、このDNA線維の溶液を激しく攪拌すると、DNAは攪拌力に比例して2分の1、4分の1、8分の1に切れると予想されます。そのようなサンプルについてそれぞれ星の数を数え、計算することによって、実際にDNAが段階的に半分ずつに切れていくということが明らかになりました。そこで、最初に抽出された一番大きなDNAは壊れていない元のファージゲノムのDNAと考え、その分子量を決定したわけです。後に別の方法で直接測定されたファージゲノムDNAの量と完全に一致したので、バクテリオファージゲノムDNAは、一本の連続的なDNA分子であるということが証明されたという、歴史的に大事な実験なのです。

"Star Experiment" によるファージゲノムの定量

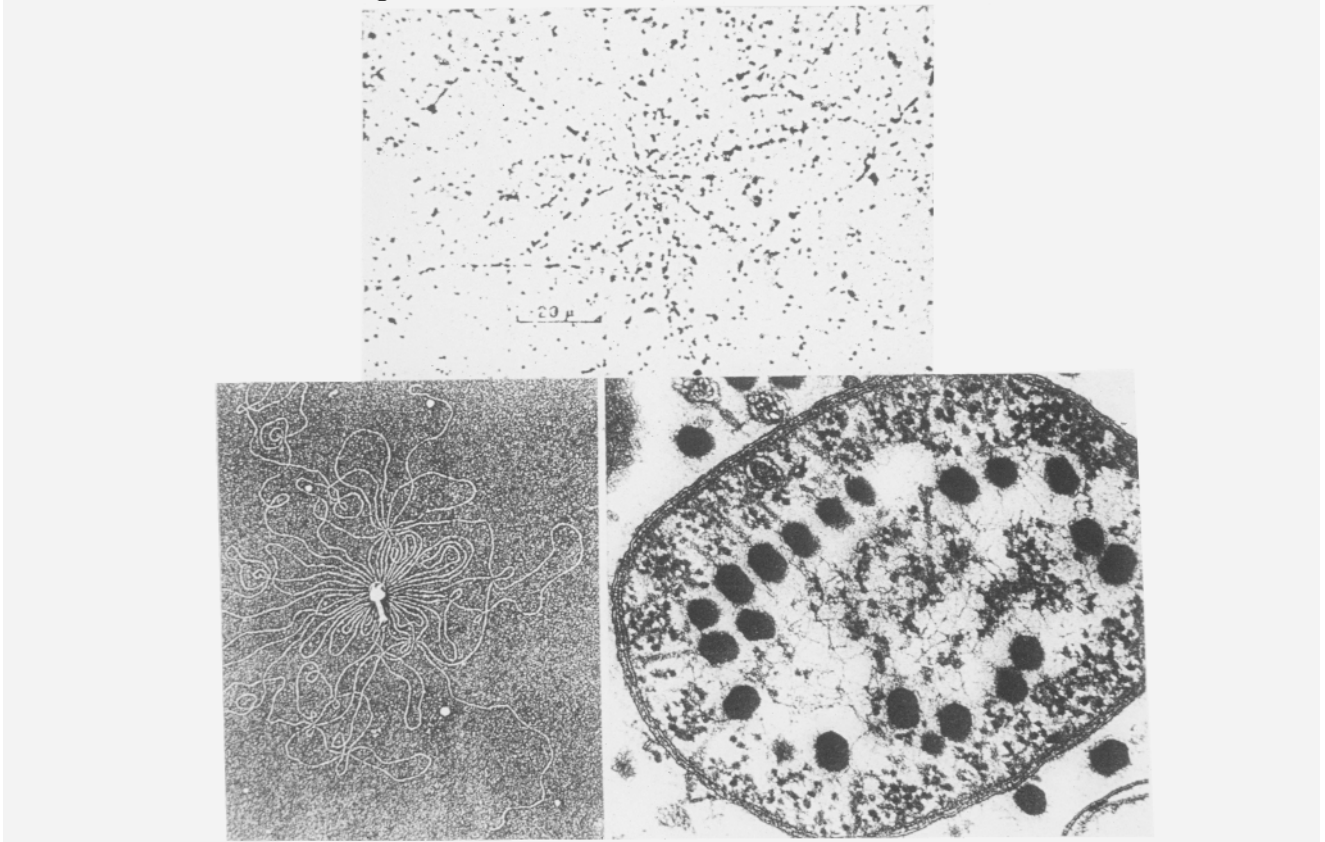


図2 Star experiment (星の実験) によるファージゲノムの定量

1-3 大腸菌DNAのオートラジオグラム (図3)

次に ^{32}P から ^3H に話を換えましょう。 ^3H のオートラジオグラムの有用性は、飛程の距離が $1\ \mu\text{m}$ 以下と短いことに起因します。 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^3H と順に約10分の1毎に β 線エネルギーが小さくなります。 ^3H の飛距離はDNA繊維を観察することが可能な大きさなのです。この実験はあらかじめ大腸菌のDNAを $[^3\text{H}]$ チミジンで約1世代標識し、ゲノムDNAを壊さないように抽出し、うまく分子を広げ複製の中間体となるようなDNA分子を観察したものです。この写真から、大腸菌ゲノムは約 $1\ \text{mm}$ の環状DNA分子であることが1963年に直接証明された訳ですが、最近明らかになった全塩基配列、 4.6×10^6 塩基対から推定する長さとはよく一致しています。

1-4 岡崎フラグメント (図4)

アイソトープの利用では忘れてはならない研究が、1960年の後半に行われました。図4が有名な岡崎フラグメントの実験です。DNAは2本の鎖が極性を持

ち、互いに反対の方向を向いています。一方DNAポリメラーゼは、 $5'$ から $3'$ 方向には複製できるが、逆向きの $3'$ から $5'$ 方向の複製能力は持っていません。ところが、巨視的に見ると複製フォークでは、両鎖とも複製は同じ方向に進行しています。このポリメラーゼの重合方向と鎖の極性との矛盾を解決すべく、色々なモデルが考案されましたが、結局は、図4の右下のモデルBが正しかったことになります。すなわち、一方の鎖は連続的に複製され、もう一方の鎖は、不連続な短い鎖として合成が行われるという、非対称不連続モデルが証明されたわけですね。それを証明するには、短い新生1本鎖DNAの存在、すなわち中間体の存在を示す必要があります。そこで、DNA全体を $[^{14}\text{C}]$ チミジンを用いて均一にラベルした後に $[^3\text{H}]$ チミジンを加えてパルス標識(短時間DNAを合成させ、碎氷とKCNを加えて反応を止める)して、ショ糖密度勾配中で遠心分離します。すると、もとのDNAは高分子部分(大きなDNAがあるところ)に、短いパルスで作られたDNAは低分子部分(小さ

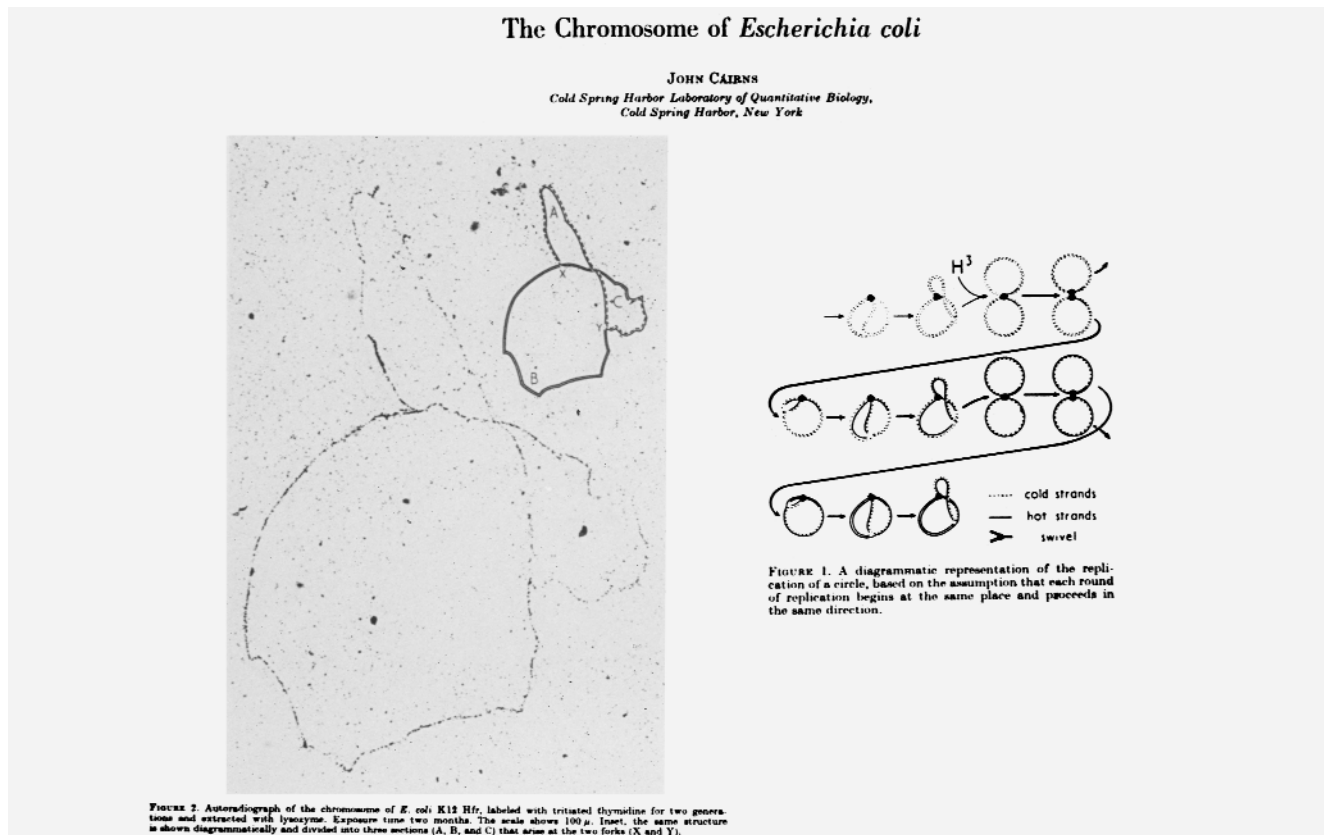


図3 大腸菌DNAのオートラジオグラム (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 28:43-46 (1963) より引用)

なDNAがあるところ)に移動します。アルカリ性シヨ糖密度勾配遠心図(図4の左図)では、5秒、10秒、30秒…とパルス標識の時間を延ばしていくにつれて短鎖が伸長していくのがわかります。また、30秒パルス標識後にチェース(非放射性チミジンを添加)の時間を増やしていくと大きなDNAに変化していくのが分かります(図4の右上段図)。従ってまず短い鎖が作られて、次に大きな鎖につながっていくという、いわゆる教科書に書かれている不連続合成が証明されました。この実験を行った岡崎令治博士は、原爆の投下の直後に親族を探しに広島を歩かれて被曝をされました。岡崎博士はそれをよく心得てましたので、いずれ自分は白血病に倒れるだろうと考えておられたようです。この実験には大量のアイソトープを使います。安全性ということから見ると、トリチウムは非常に危険なアイソトープです。特にトリチウムチミジンは体の中に入ると、半減期が長いだけでなく、トリチウムのエネルギーはちょうどDNAの鎖を分解するのに非常に適当なエネルギーなのです。その結果生じるトリチウムによるDNAの自殺は、発癌性の高い危険なものです。もちろんそういうこと

を知った上で、このような非常に高レベルのアイソトープをしかも5秒間というように短時間パルス(5秒間パルスして、反応を止める薬を入れる)するわけですから不慮の危険を伴います。岡崎博士はそういう危険な実験を学生はもとより若い研究者にも決してさせず、すべて自分でされたと聞いています。アイソトープ実験では忘れられない研究です。

1-5 DNAの塩基配列決定(図5)

時代をいっぺんに飛ばしますが、図5はいうまでもなく、DNAの塩基配列決定のためのオートラジオグラムです。今では塩基配列を決定するためにアイソトープを使っている人はほとんどいないだろうと思われていますが、一時期はこの³²Pのバンドをいかにシャープに数多く写し取り、それを読み取るかということに随分苦労したことを思い出します。この方法の開発によって、現在のDNAの研究、そしてDNAから遺伝子、遺伝子からゲノムへ、さらに遺伝子治療へというような医学におけるDNA研究を飛躍的に進展させた研究であると思います。

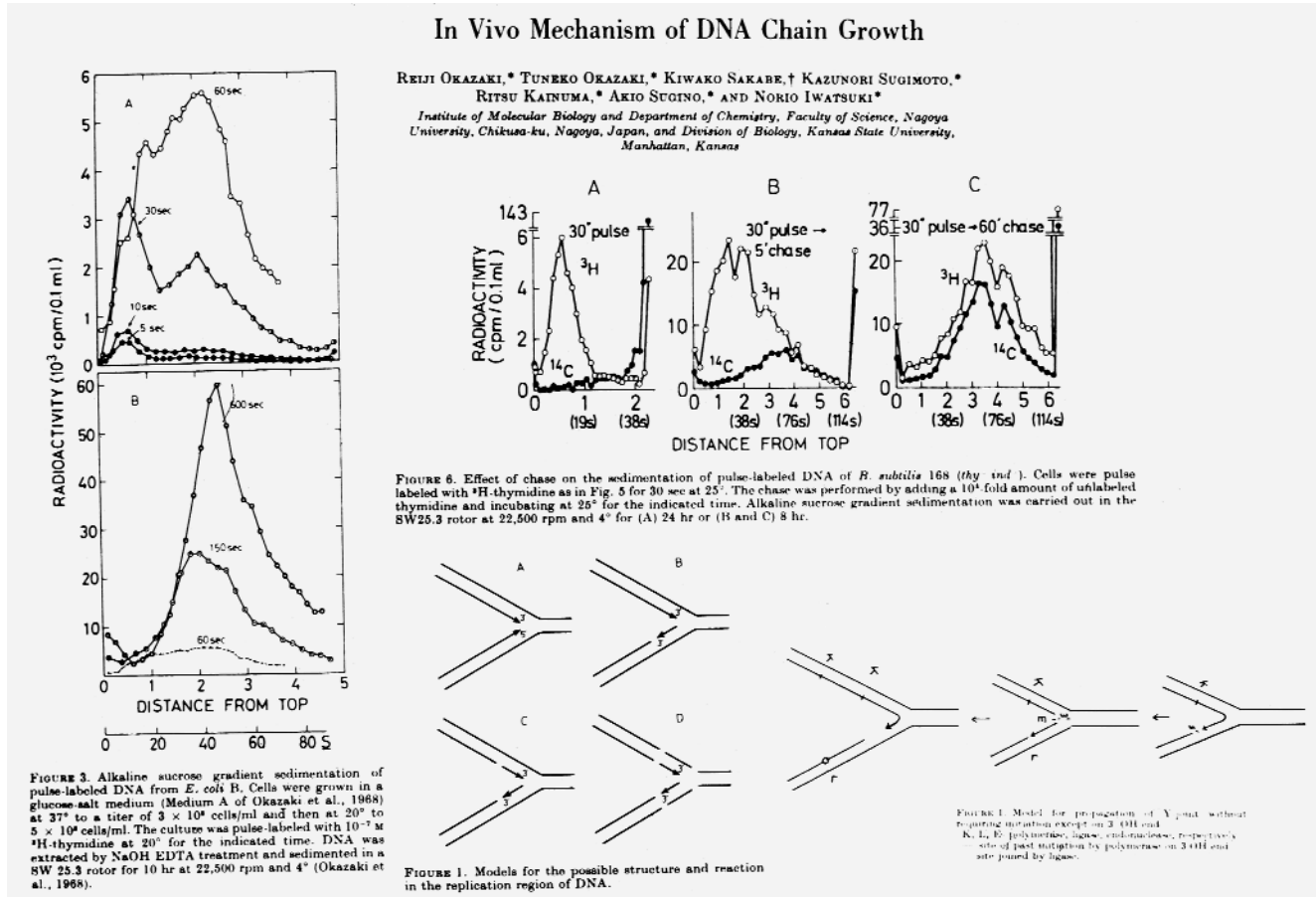


図4 岡崎フラグメントの発見 (Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 33:129-143 (1968) より引用)

2 「染色体複製と制御の分子機構に関する研究」とアイソトープ利用

2-1 RIを利用したDNA複製中間体の検出

歴史を振り返るのはこのくらいにして、現在行っている私達の研究をお話します。今やまさに脱アイソトープ実験が、標語になっているぐらいで、世の中の研究が段々アイソトープを使わない実験に移っていくのではないかと思います。しかし、研究の重要な局面ではどうしてもRIを使わなければならない状況はこれからも続くのではないかと考えられます。そのひとつは生合成の中間体の検出です。これには非常に感度の高い検出法が必要で、今だにRIに優るものはありません。もうひとつはリン酸化の研究です。私達の大学でも、情報伝達に関する研究グループによるリン酸化の研究に ^{32}P が大量に使用されています。そのようなRIがなくてはならない研究の一例として、私達が研究している「DNA複製中間体の検出とそれを利用した細胞周期チェックポイント機構の解析」についてお話してみたいと思います。

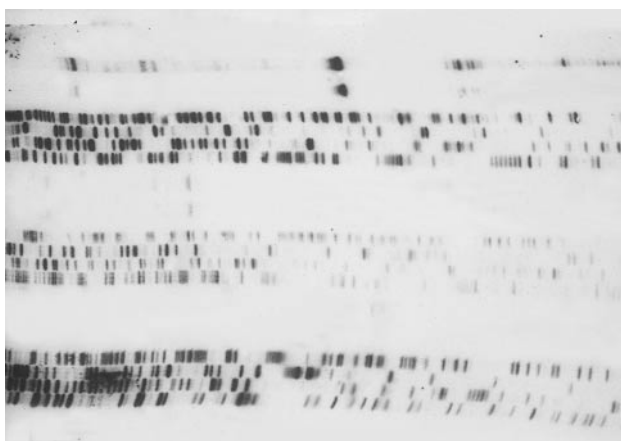


図5 DNAの塩基配列決定：塩基配列の決定のためのオートラジオグラム

2-2 真核生物の染色体DNA複製の中間的な状況 (図6)

図6は複製途中にある、真核生物染色体DNAを示しているものです。DNAは、普通は直線であり、その直線上にいくつもの複製ユニットが直列に並んでいます。ユニットをレプリコンという言葉でいえば、マルチレプリコンと呼ばれるものです。図上段のシエーマでは4つのレプリコンが複製を始めています。こういう状況のものを目玉、あるいはバブル(泡構造)と呼んでおり、これが段々長くなっていくと、バブルからいわゆる複製フォークという状況になるわけです(図下段)。図中央の電子顕微鏡写真は、クロマチンファイバーで、黒い点々は、ヌクレオソーム(染色体のサブユニット)です。従って、実際のDNAは約10倍くらいの長さになります。このような電子顕微鏡写真から1個の複製単位は約3万塩基対くらいの大きさであるということが教科書に書かれているのです。ところがこのようなマルチレプリコンが実際の染色体にどのように分布し、どのように複製が行われ、調節されているのか、さらに染色体にこれだけ沢山のレプリコンが存在する生物学的な意味は何か、というようなことはほとんどわかっておりません。このような課題にたいする私達の挑戦が約10年前から始まりました。

2-3 出芽酵母第6染色体におけるARS分布(図7)

私達は出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*の第6染色体を用いて研究を始めました。第6染色体は約290キロベースの長さを持っています。10年前はまだその構造はわかっていない時でしたけれども(今はこの酵母の全塩基配列がわかっています)、染色体の制限酵素地図を作り、約80個の連結断片をクローニングし、それらの複製開始能力を測定することによって、染色体上に10個複製開始点(ARS = Autonomously Replicating Sequence)が存在することを明らかにしました(図7)。1本の染色体のすべての複製開始点を決定したのはこれが世界で最初であり、その後も報告されていません。さて、このようなシステムができたので、先程の疑問、すなわちそれぞれの複製開始点がどのような調節を受け複製を行っているのか、そしてそれがどのような生物学的意味を持っているのかについて研究することになります。

2-4 複製開始のマッピング手法(図8, 9-1, 9-2)

図8は複製開始のマッピング手法、すなわちRIを用いた中間体の測定手法の概要を示すシエーマです。DNAの複製の中間体は、一本の長いDNAを制限酵素で切った平均3-4 kbの断片を用いて検出します。この制

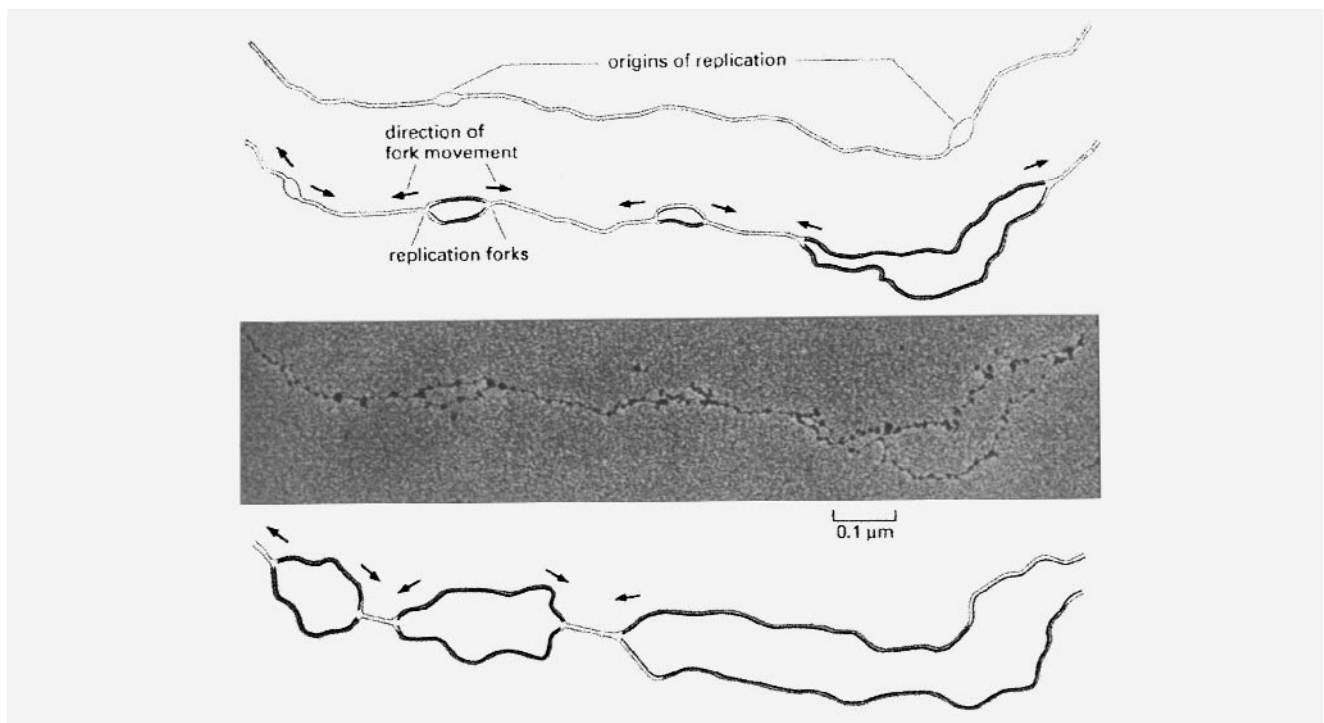


図6 複製中の真核生物の染色体DNA：電子顕微鏡観察とそのモデル

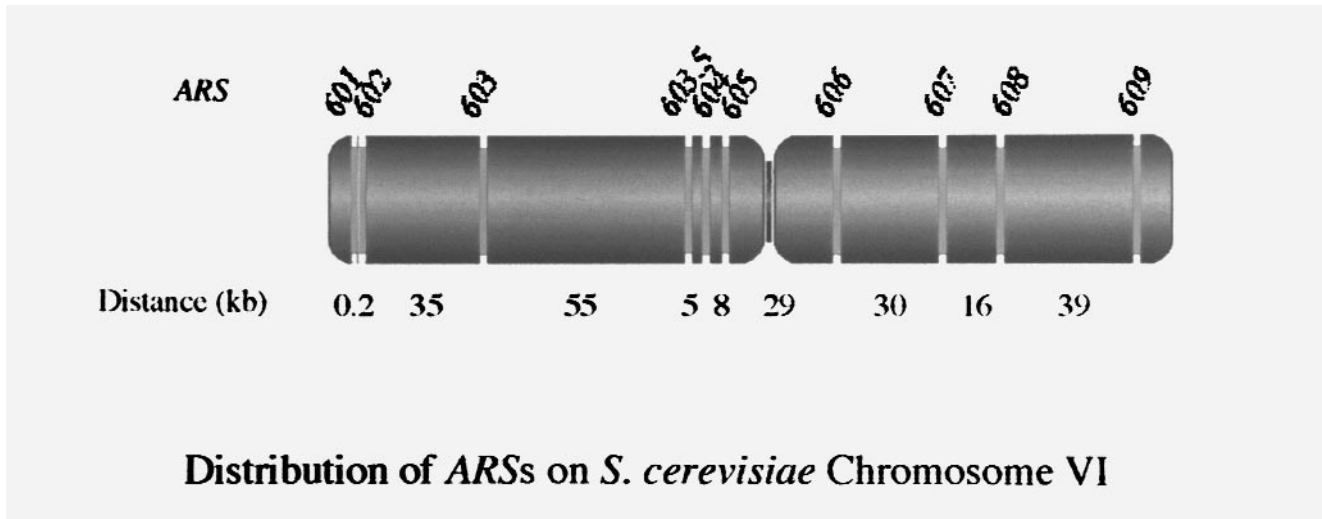


図7 出芽酵母第6染色体におけるARS*の分布

※：ARS (Autonomously Replicating Sequence, 自律的複製配列)

制限酵素の断片が複製される時は、左右の断片から進行してきた複製点によって複製されるか、あるいはたまたまその断片の中に複製開始点があって、その断片の中から起こった複製点によって行われるかのいずれかであるはずですが。前者の中間体はY型のフォーク状のDNAとなり、後者の中間体は目玉(又はBubble)型となります。この2つの状態を分離することができれば、特定の断片に複製開始点が存在するかどうかを判定することが可能になるはずですが。米国のFangmanらはDNA断片を大きさ、形の違いによって分別する二次元電気泳動法を開発しました。図8にその原理を示します。左から存在可能な5種類の中間体を示しています。特に左からの3種に注目して下さい。左隣りから複製が流れ込んでくる断片の集合(細胞毎に複製状態は異なっているので、中間体も集団となります)の電気泳動パターンは元の1.5のサイズで、3つの枝をもった断片が最も複雑な形で泳動しにくくなりますから、山形の分布をします(Simple Y)。これに対し断片の中央付近から複製を開始する断片は元の2.0のサイズのもので環状に近く最も移動し難いので、集団としてはアーチ状に分布します(Bubble Arc)。三番目のように断片の端から複製を開始する断片はアーチ状から山形へ不連続な分布をします(Bubble to Y)。このように断片の集団が示す泳動パターンを調べれば、目的の断片がどの様に複製されるのか、断片の中に複製開始点が存在するのかわからないかを判定することができるのです。判定にはRIが必要です。細胞の集団の中で、染色体の特定の位置を複製中の細胞は極めて少数ですから、制限酵素断片をつくと大部分はサイズ1の直線型DNA

であり、中間体をDNAの紫外線吸収や色素との結合によって直接観察することは不可能です。その上、二次元電気泳動のゲル上には他のDNA断片が無数に存在することを忘れてはなりません。すなわち、断片に特異的で感度の高い検出法が必要なのです。そのためには、断片の中の一部をあらかじめクローニングして、それを高レベルに³²Pで標識したプローブを用いて、泳動後フィルターに写し取ったサンプルを変性し、プローブとハイブリダイゼーションさせるのです。こうしてできたサンプルのオートラジオグラムを撮ると図9-2のような³²Pの分布が得られます。予想通り大部分の³²Pは直線でサイズ1に黒々とした背景をつくりませんが、予想された中間体も検出することができます。図9(1-2)は開始点検出の実例を酵母第6染色体上のひとつの複製開始点(ARS607)を用いて示したものです。既にARSの位置が分かっていますから、3種類の制限酵素を用いて、*Pst*I, *Bgl*III, *Bam*HIで切った時にそれぞれ複製開始点を真ん中、左寄り、左端と違った位置に置くことができます。図9-1には理論的な予想図を、図9-2には実験結果を示します。予想通り左端の例は複製開始点が中央にあるのでバブルのアーチ(Bubble Arc型)、真中の例は中央より左寄りにあるのでバブルからYへの不連続(Bubble to Y型)、右端の例は初めから端にありますから、すぐY字型になってしまうのでY(Simple Y型)というようになっています。これは酵母のようなゲノムサイズが小さい比較的簡単なもので、非常に綺麗な結果が得られます。最近ではショウジョウバエや哺乳動物といったような、より複雑な染色体でも複製中間体の検出が可能になりつつあります。

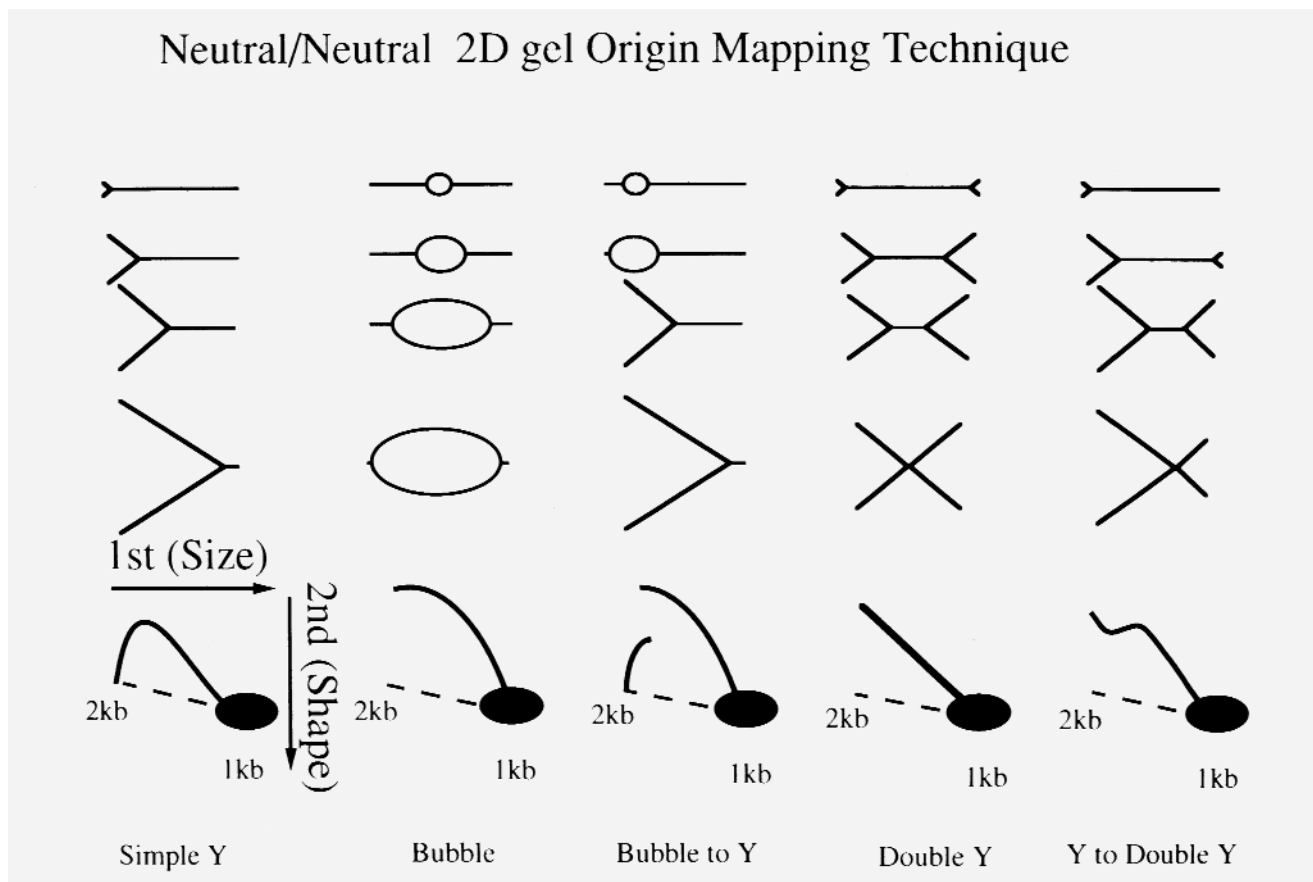


図8 複製開始点のマッピング手法

2-5 第6染色体複製開始点のマッピング (図10)

このような方法を使って、すでに全部構造がわかっている第6染色体上のすべてのARSについて、ARSを真ん中に置くような形で制限酵素断片を切り出し、二次元電気泳動を行った結果をまとめたものが図10の泳動パターンであります。左端に近い601と602は、わずか254bpしか離れてないので、複製開始点としてはひとつとして測定されています。ARS605、606、607は強いバブルアークが観察されるので、開始点の存在は明確ですが、603.5や609のようにバブルアークとシンプルY型の2つが見える場合には、細胞集団の1部は断片中で複製を開始しているけれども、他のものは隣の複製開始点から進行してきた複製点によって受動的な複製で行われていると解釈します。すなわち、この方法によってそれぞれの複製開始点について、バブルアークとYアークの比率から開始頻度を推定することができるのです。606と607は、82とか88%と高い複製開始能力を持っていることになります。しかし、604と608は5%、609は29%しかありません。ところが面白いことに、この複製開始点をプラスミド

の上に乗せてやりますと、大部分がほとんど100%の複製開始能力を出します。このように同じ塩基配列を持った複製開始点が染色体上で複製開始点として機能する能力とプラスミドでの能力がこれだけ違うということ、すなわち染色体には染色体の位置や染色体が持っているより高次な構造が開始点の能力を負に調節しているということが言えるかもしれません。

2-6 複製開始点の時間調節 (図11-12)

次にこれら9つの複製開始点がどのような順で複製を開始するのかを調べました。細胞周期をG1-Sの境界で生育を停止し、時間0で阻害を解除して、同調的にDNA複製を開始させます。そして5分おきにサンプルをとって、すべての複製開始点について複製の状況を調べるわけです。図11にその例を示しますが、一見して分かるように、607は5分後に複製開始を起こしています。一方、609は約25分から30分遅れてスタートして、いつまでも継続します。開始がいつまでも終了しないのは開始速度が遅いのではなく細胞毎に開始時間が異なっていることを示して

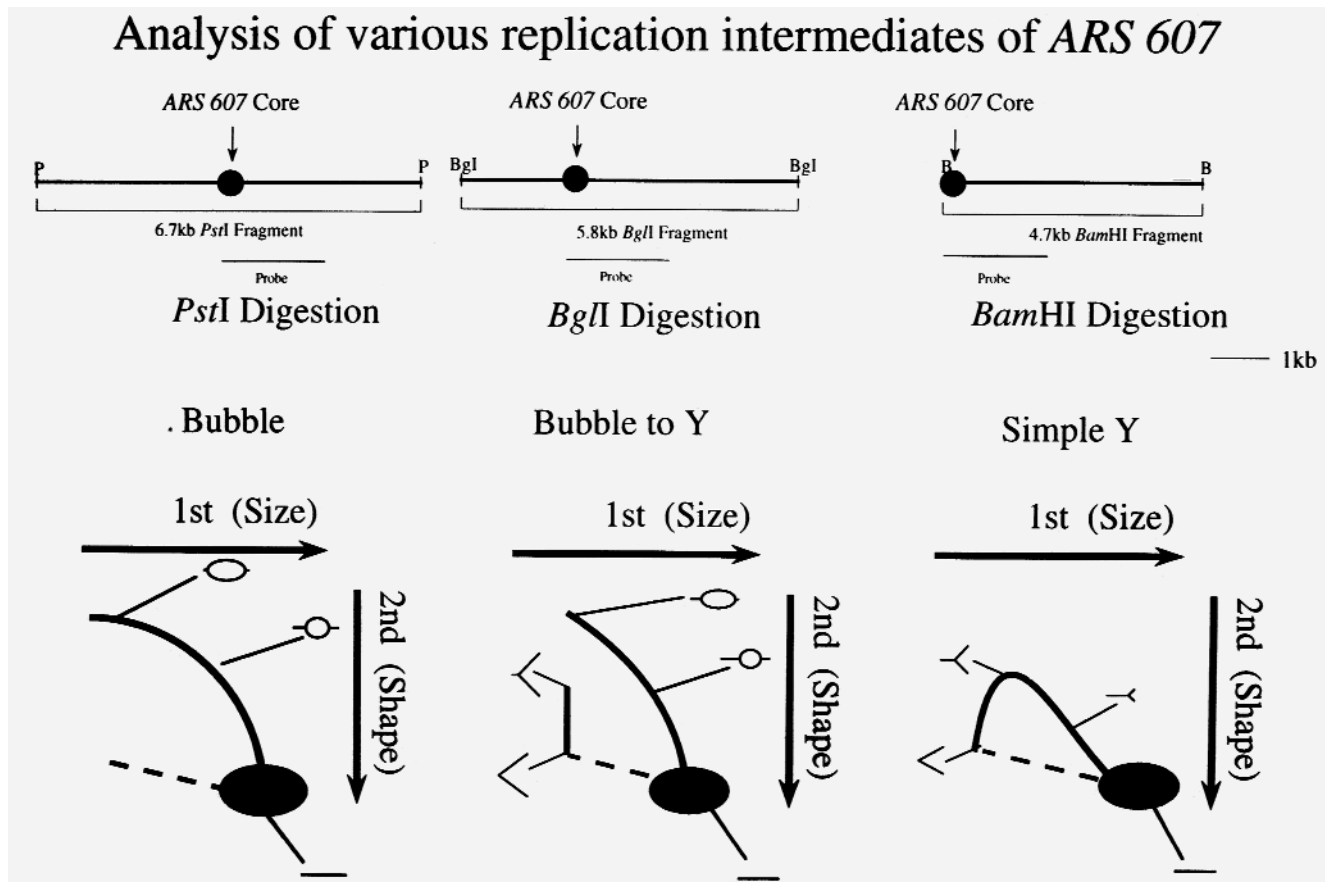


図 9-1 複製開始のマッピング手法の具体例, その 1

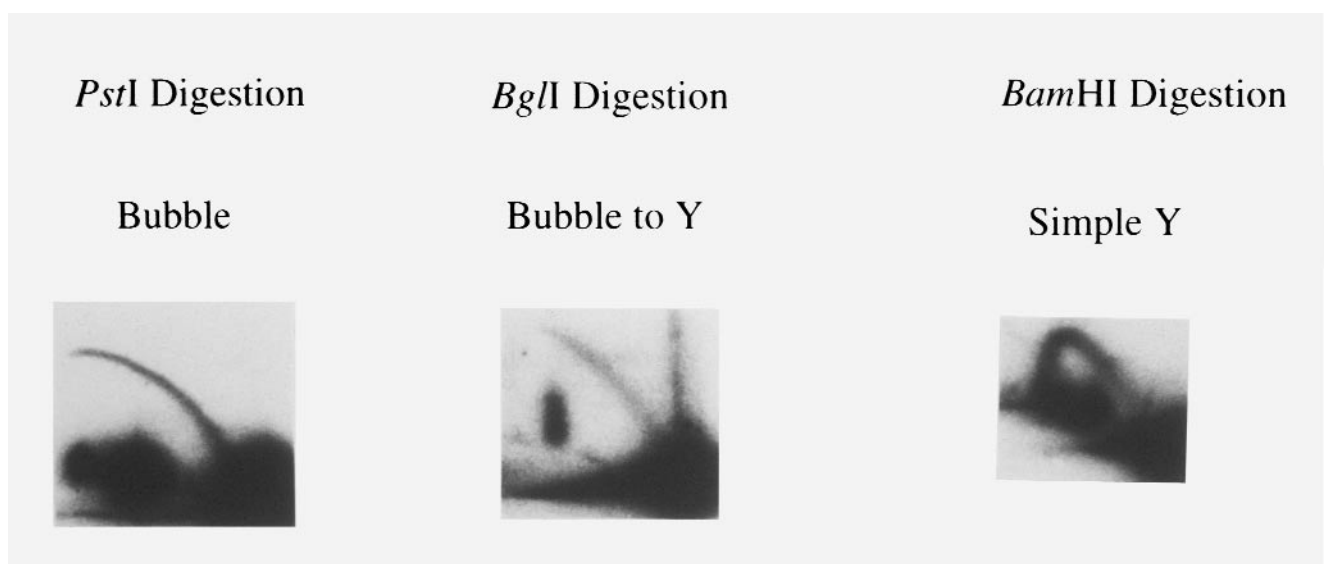


図 9-2 複製開始のマッピング手法の具体例, その 2

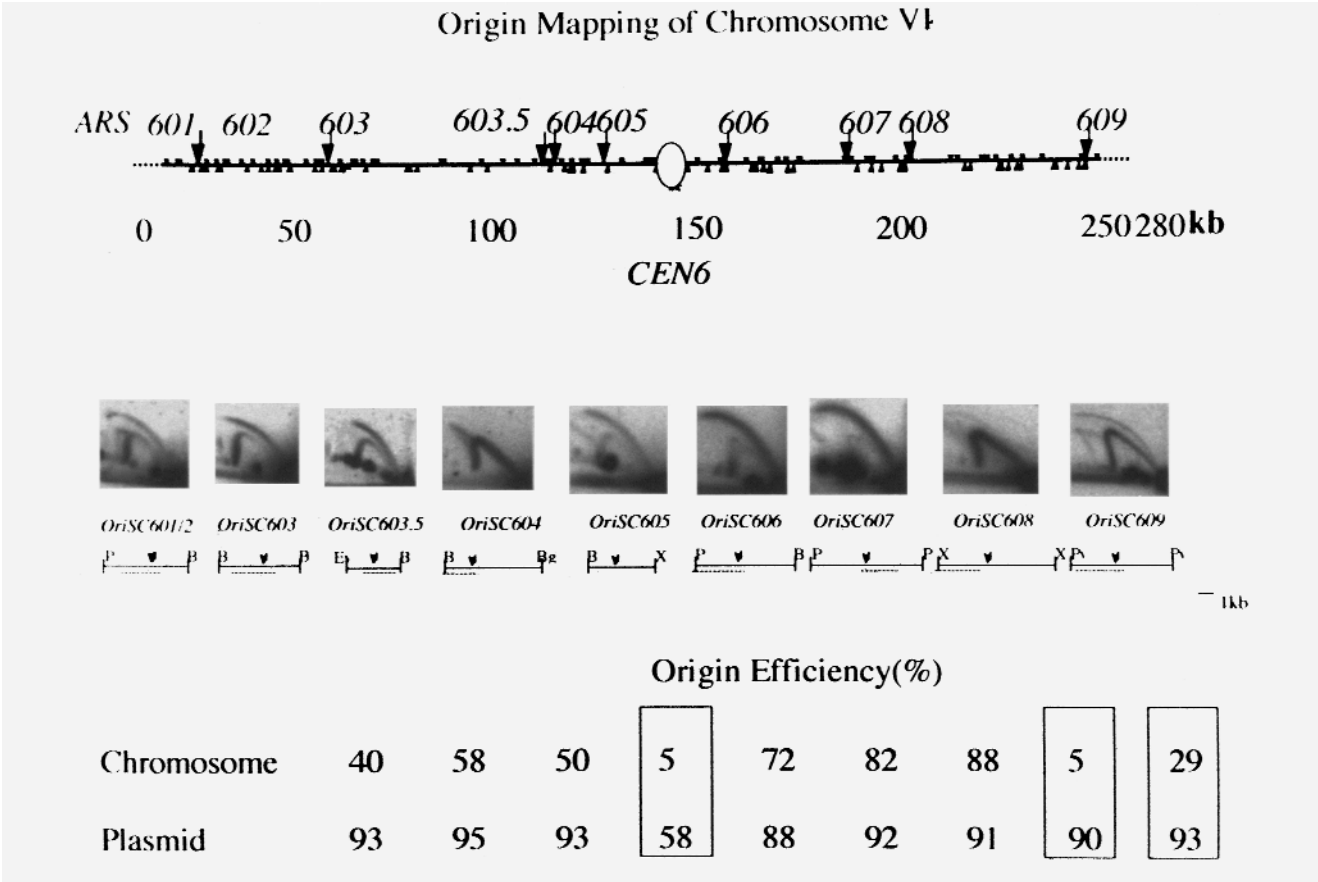


図10 第6染色体複製開始点のマッピング

います。すなわち、ある細胞は30分目に609からの複製を終えるのに対し、別の細胞は55分になってようやく同じ部分を複製しているということになります。このようにテロメアの近辺は予想以上に複雑で、不可解なことが起こっているらしいことが分かります。この研究によって初めて細胞の個性というのが見えてきたことに驚きました。図12に9個の開始点が自ら複製を開始する時間帯と隣から流れ込む複製点によって受動的に複製する時間帯を模式的に示しました。すべての開始点に15-20分くらいの拡がりがあります。これは細胞周期の同調の乱れと考えます。しかし、609は30分以上の拡がりをもっています。一方左端にある601/602は、左腕の方が長い枝を持つるにもかかわらずそれほど同調は崩れません。一体これは何だろ、右腕の609領域には特別の生物学的意味があるのではないかということに私達は興味を持ちました。

2-7 細胞周期進行とチェックポイント制御 (図13)
「細胞周期進行とチェックポイント制御」が、最近話題になり、その細胞機能における重要性の認識が広

がっています。細胞にMMS (Methyl Methane Sulfonate) を添加したり、紫外線 (UV) やRIによって照射するとDNAに傷ができます。すると、この傷を修復するために様々な遺伝子が働き始めます。まず、傷を見つける遺伝子が機能し、シグナルを発信してメディエータと呼ばれるタンパクキナーゼを活性化します。Rad53はその中核となるメディエータキナーゼなのです。活性化されたキナーゼは細胞周期 (G1期, S期, G2期, M期) の種々のステップで進行を阻害あるいは一時的に進行を止めます。これをチェックポイント制御と呼んでいます。すなわち、細胞が障害を受けたことを認識して、周期の進行を止め、その間に損傷を修復するという合目的な機能が働いているのです。Rad53のターゲットの主なものはこれまでは、CDKキナーゼ/G1サイクリン, CDKキナーゼ/Mサイクリンを阻害してG1期進行, あるいはG2期からM期への進入を止めると言われてきました。ところが最近になって、実はS期の途中で複製を止めて修復するS期チェックという現象が重要な役割をしていることが分かってきました。

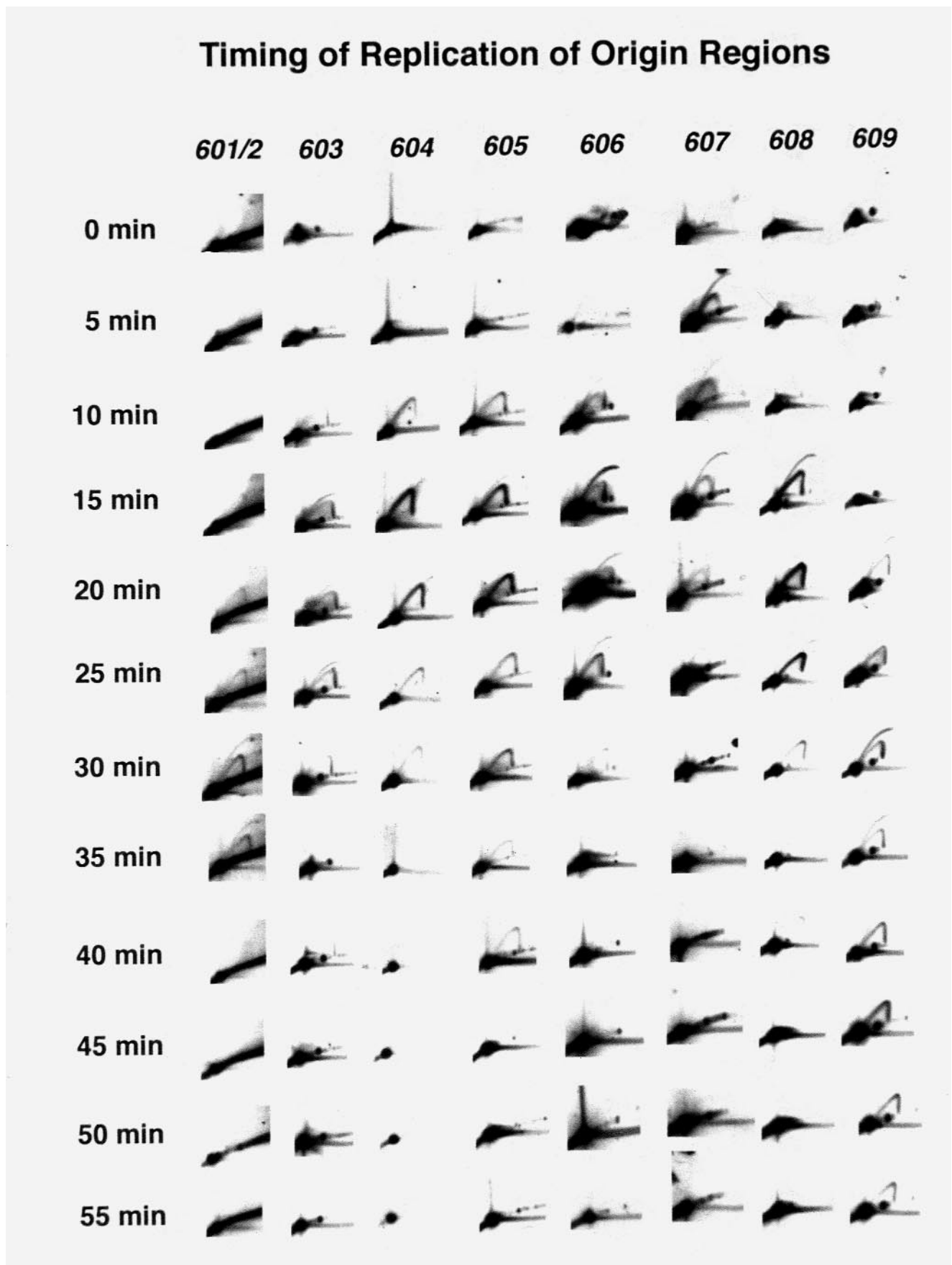


図11 複製開始点の開始のタイミング

Timing of Initiation and Passive replication of 9 Origin Regions

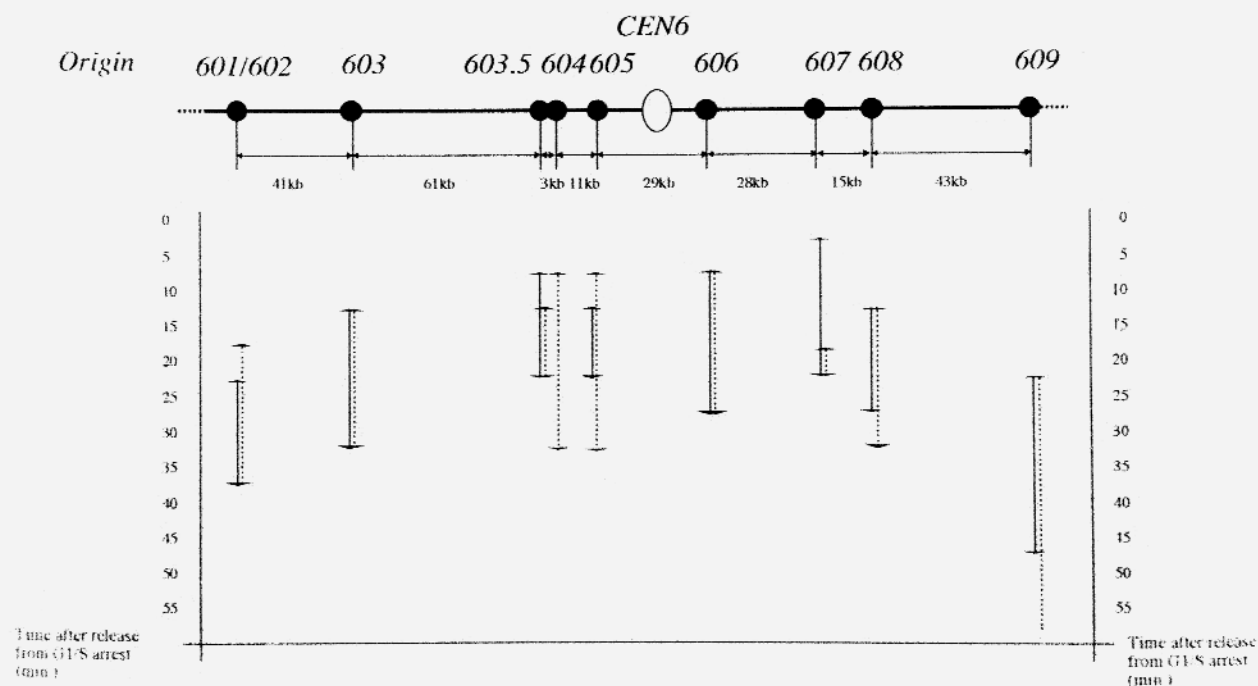


図12 9つの複製点領域における開始と受動的複製のタイミング

細胞周期進行とチェックポイント制御

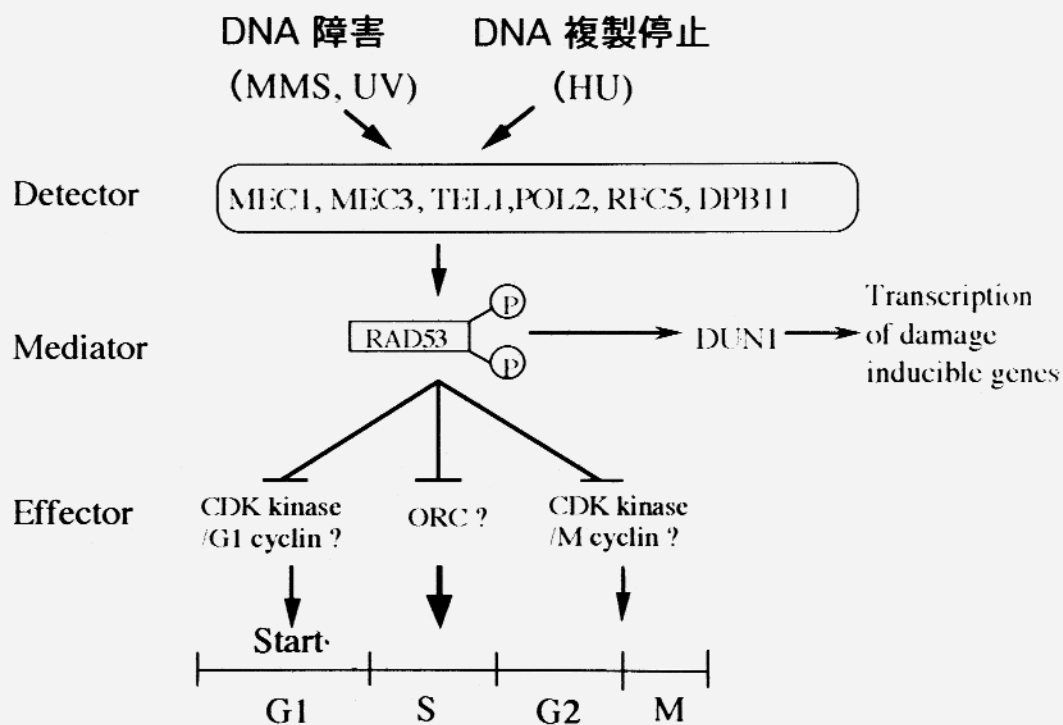


図13 細胞周期進行におけるチェックポイント制御

2-8 S期の進行におけるMMSの影響 (図14-15)

実際にS期チェックを調べると、図14のようになります。図14は細胞分取装置 (FACS, fluorescent-activated cell sorter) を用いて、横軸にDNAの量、縦軸にそれぞれのDNA量を持った細胞の数を表したものです。あらかじめG1期で細胞周期の進行を止めた細胞集団を用いていますから、時間0ではすべての細胞は1N (一倍体) 相当のDNAを持っています。これを同調的にS期に進行させると、野生型の細胞ではG1期 (1N) からSを経てG2期 (2N) へと図に示すような時

間経過で動いていきます。約60分くらいで、ほとんどの細胞がS期を終了し2個の核を持つG2期に進行します。ところが野生細胞にDNAの障害剤であるMMSを加えると、210分経っても大部分の細胞はまだS期に残っています。非常にゆっくりとS期が進行するとか、むしろS期で一旦進行を止めてしまっていると考えられます。チェック機能が働いていることを示しています。このとき細胞は増殖を止め、細胞数の増加は数時間にわたって起こらなくなります (図15)。

同じ実験をチェックポイント制御遺伝子である

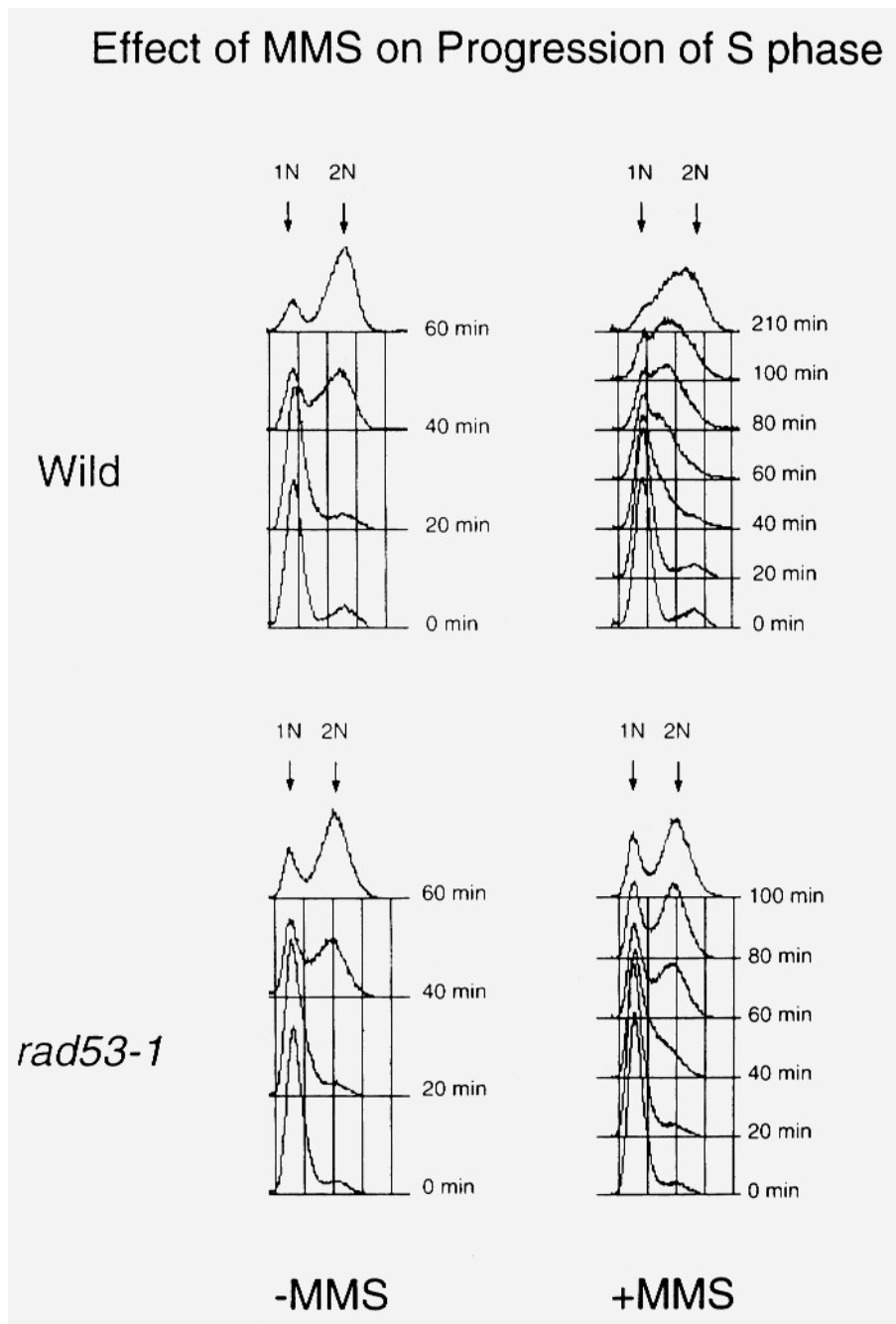


図14 S期の進行に対するMMS (Methyl Methane Sulfonate) の影響

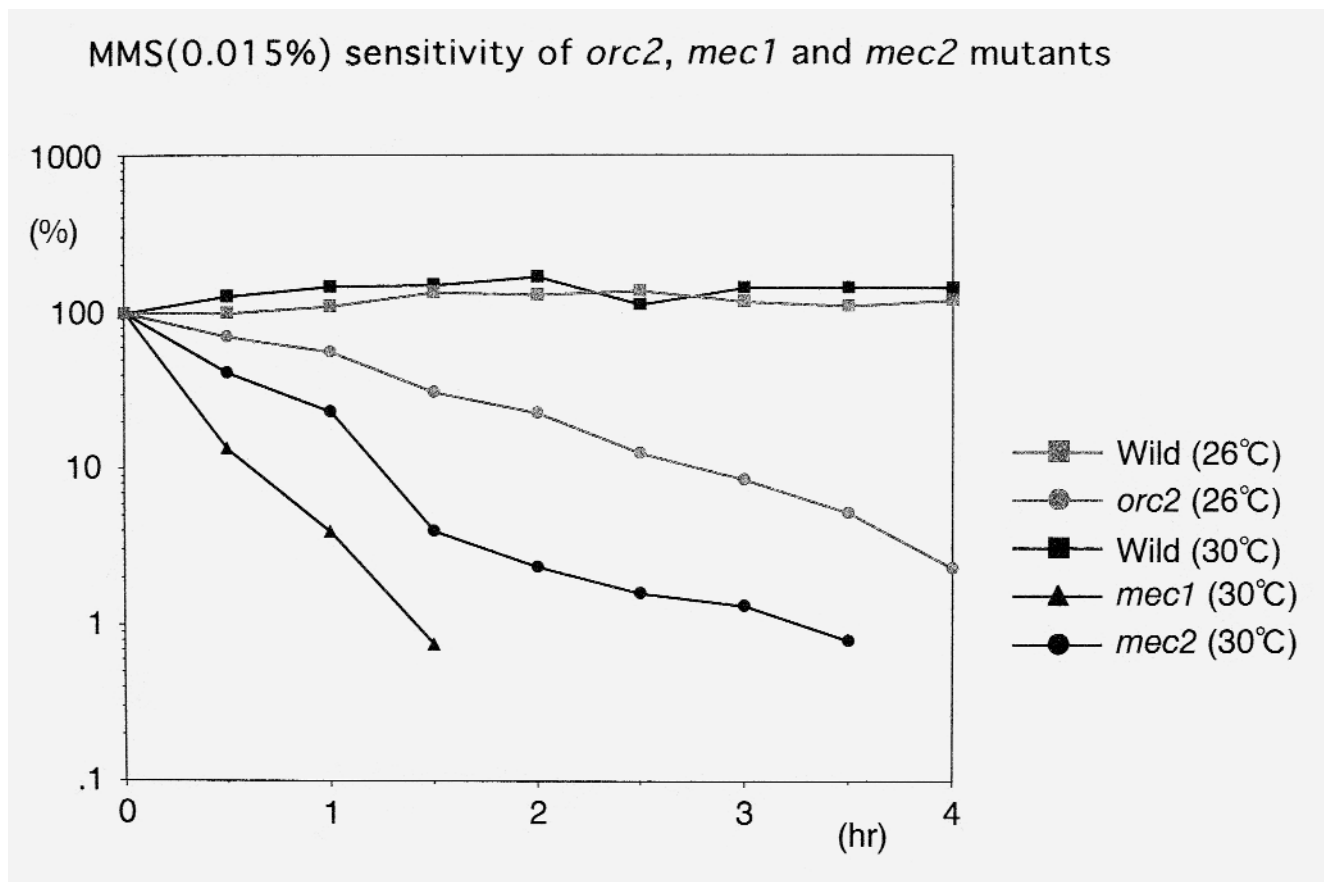


図15 チェックポイント遺伝子 *Mec2* (*Rad53*) 変異株などのMMSに対する感受性

*Rad53*の変異株 (*Rad53-1*) を用いて行いました。MMSを与えない時には、野生型と全く同じですが、MMSが存在しても、S期の進行は少し遅くなりますが、停止することなくG2へ進行してしまいます。このとき細胞は急速に死滅します。この実験をした時はまだ*Rad53*を*Mec2*という名前と呼んでいましたので、図15では*Mec2*と記載しています。このように*Rad53* (*Mec2*) が変異するとチェック機能が全く失われてしまうのです。MMSの添加によって野生株ではどうして複製が停止するのか、*Rad53*変異ではなぜ停止しないのか、第6染色体のマルチレプリコンの複製について調べてみました(本講演ではチェックに係わる種々の遺伝子のうち、*Rad53*についてのみお話します)。

2-9 複製開始能力に対するMMSの影響(図16-17)

開始点についても、代表的なものだけお話しします。607は複製開始点の中でも一番最初に複製が始まるもので、使用頻度100%の開始点、一方609は右腕のテロメアに近く最も遅く、頻度は約30%の低い能力を示す開始点です。この2つの開始点に対するMMSの効果を調べると図16のように、添加20分後

に609からの複製開始能力のみが選択的に失われてしまいます。すなわちMMSには初期複製開始点には全く影響せず、609のような後期複製開始点からの複製を阻害し、結果的にS期の途中で複製を遅延、もしくは停止させていることになります。このことを第6染色体右腕に存在する4個の複製開始点について調べたのが、図17の結果です。ここでは、MMSの影響は効果がはっきり現れる30分後のみに絞って、チェックポイント制御に係わる*Mec1*及び*Orc-2*の変異の効果も調べました(図17)。

野生株ではMMS添加によって、後期複製開始点のみが阻害され、その領域は607からの複製の進行によって非常にゆっくりと複製されます(データは示しません)。ところが、*Rad53*の変異株の中では、面白いことにもともと開始能力が低かった608と609からの複製開始頻度が促進され、MMSの添加によって全く影響を受けません。このことから、後期複製開始点や開始頻度が低い開始点はチェックポイント制御因子である*Rad53*遺伝子によって抑制されており、MMSの添加でDNAが傷を受けると抑制が強化され、開始を完全に止めてしまうことが明らかになりました。このように同

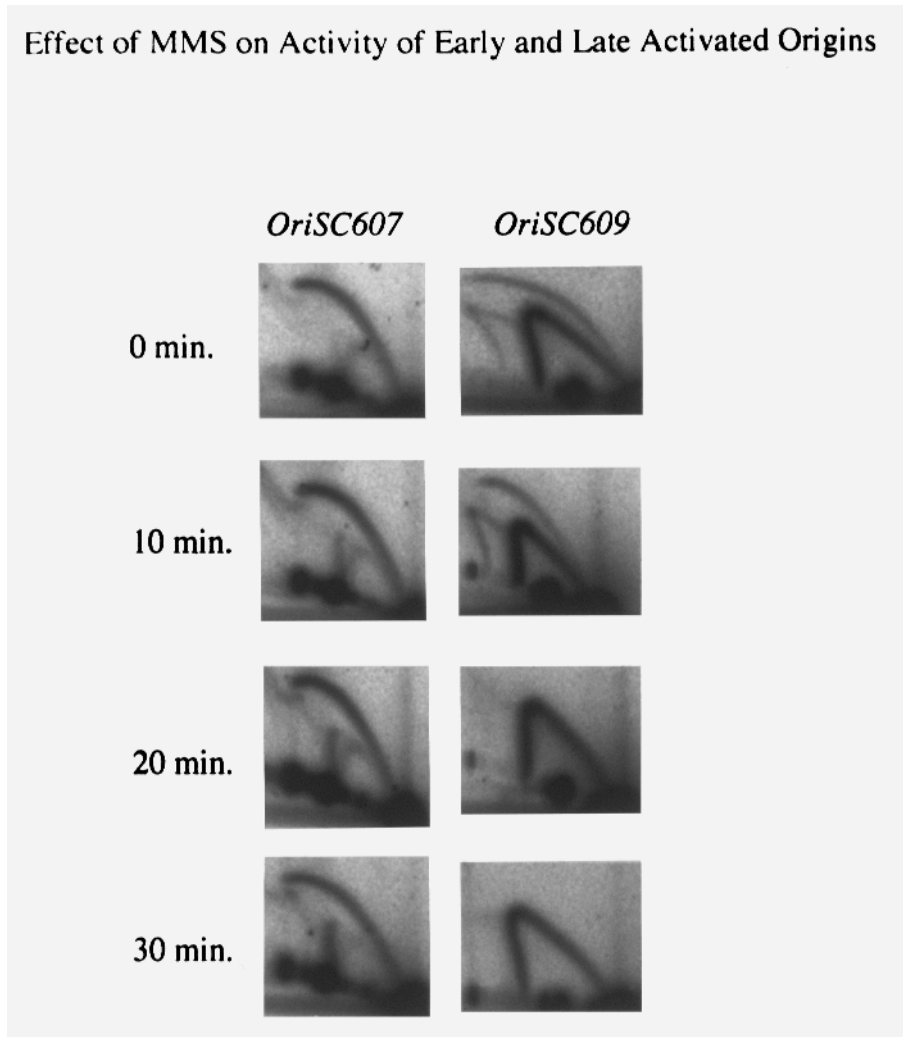


図16 複製開始能力に対するMMSの選択的な影響

じ染色体の上にあって、構造はよく似ているARSが、複製開始点の機能においては初期と後期、Rad53による抑制の有無、その結果としてチェックポイント制御への関わりの有無、というように大変異なっていることが明らかになったのです。Mec1とOrc2遺伝子の働きも大変面白いのですが長くなるので省略します。

2-10 複製開始の時間的制御(図18)

Rad53による後期複製開始点の抑制という現象から、複製開始の初期、後期という時間的な制御もRad53によるものであることが十分考えられます。そこで、607と609の開始のタイミングを、図11と同じように細胞周期進行をG1期で止めておいて、S期の進行を同調的に行わせた細胞を用いて調べました(図18)。野生型では607は10分後に開始量が最大になり、609からの開始は30分遅れて明瞭に観察されますが、Rad53の変異株では607と609の差はわずか10分以内

になってしまいます。すなわち、後期複製開始点だったものが初期の複製開始点に近いような状態になってしまうことが明らかになりました。予想通りRad53遺伝子には複製開始点の開始時期を決める働きがあることが分かったのです。

2-11 第6染色体マルチレプリコンの複製と制御(図19)

最後に第6染色体のマルチレプリコンについて、その機能分担を図19に模式的にまとめてみました。第6染色体には左腕に5個、右腕に4個と多くの複製開始点がありますが、セントロメアからテロメアの距離はどちらも約140キロベースに過ぎません。複製の速度は毎分数キロベースと推定されていますから、複製点が1個あれば、約20分のS期の間に、それぞれの腕を複製することは十分可能なのです。実際、図12のように複製開始点は独立に開始するのではなく、最初に起こる開始点から順に逐次的に起こっています。昔

Effect of MMS on Origins on Right Arm of Chromosome VI in Various Mutants

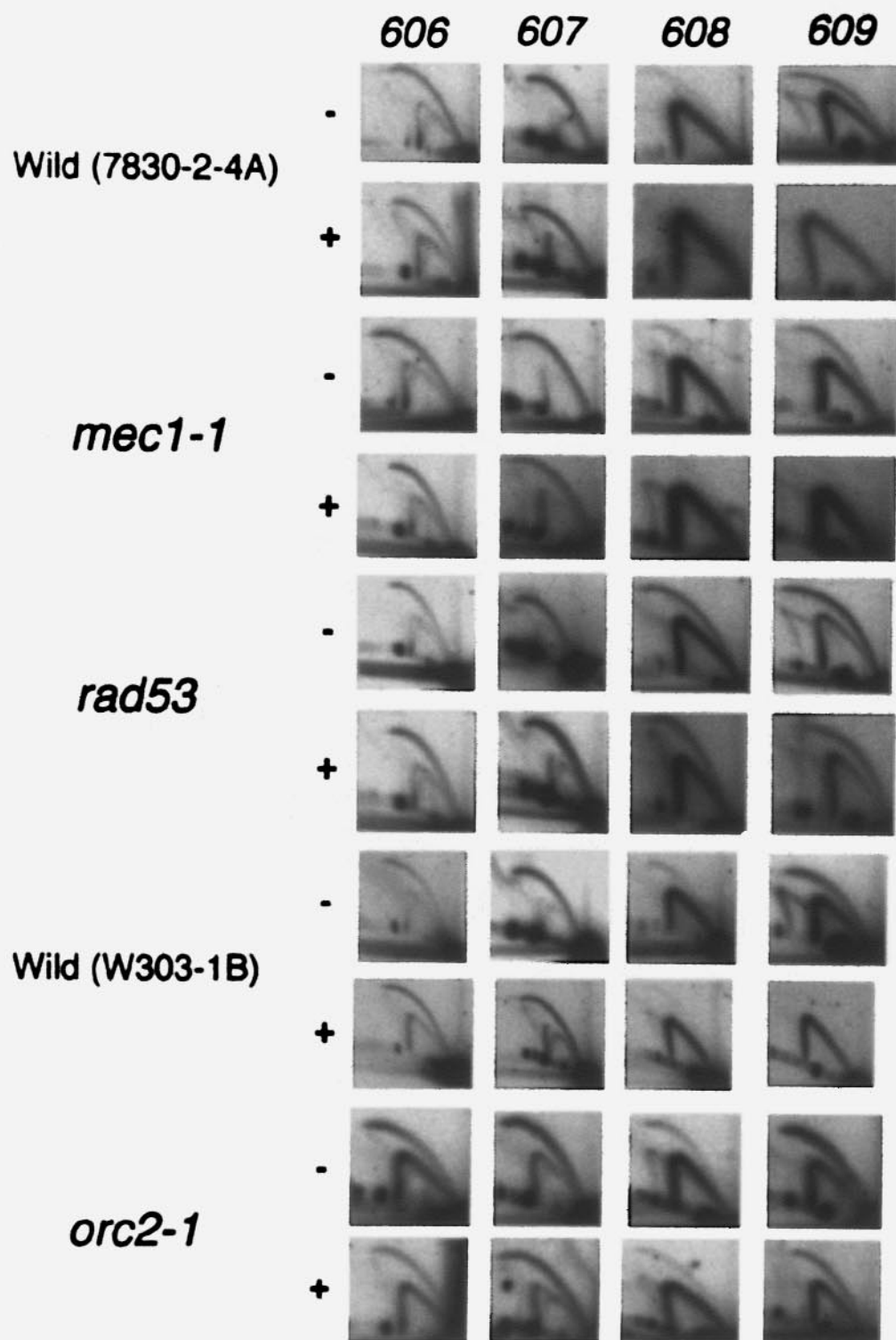


図17 種々の変異株における第6染色体右腕の複製開始点へのMMSの影響

lication Profile of Early and Late Origins in *rad53* and *orc2-1* Mutants

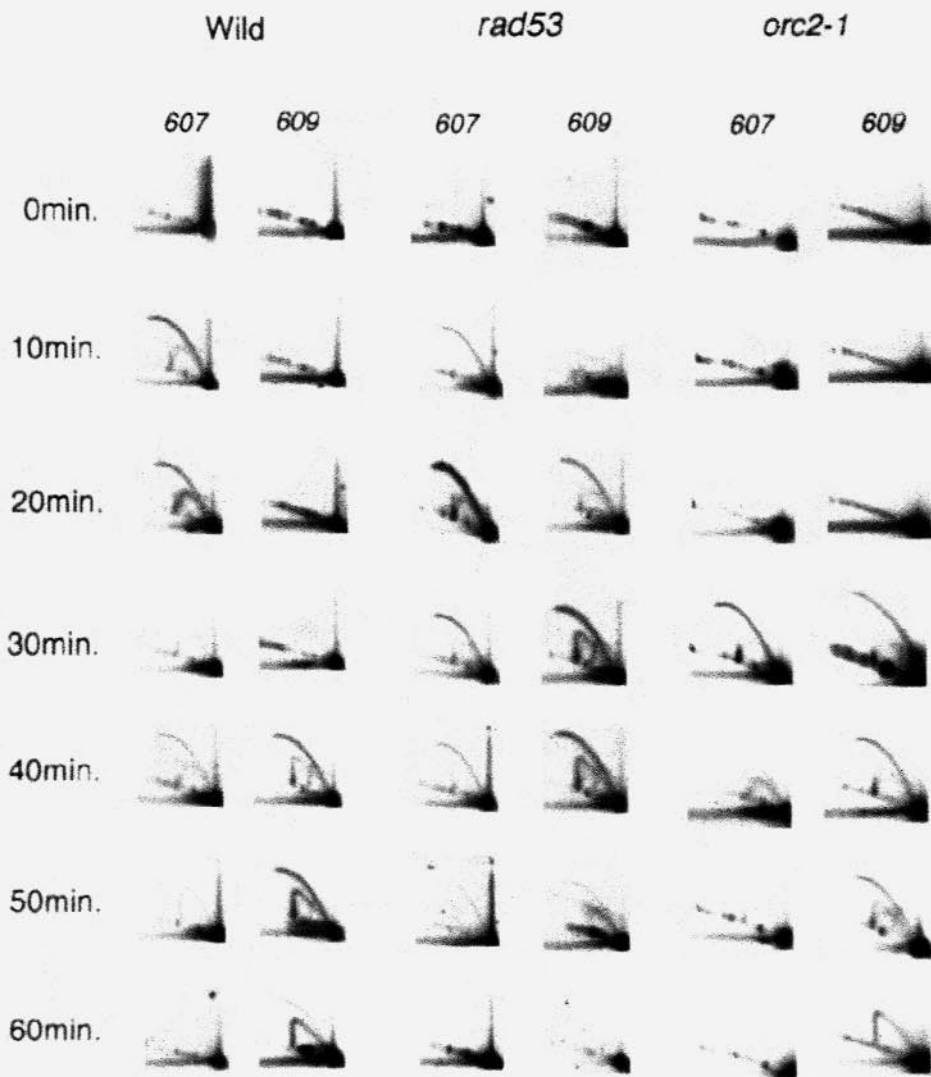
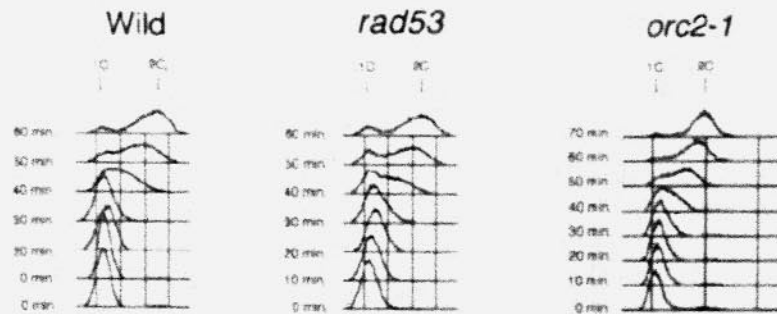


図18 Rad53遺伝子による複製開始タイミングの制御

第6 染色体マルチレプリコンの複製と制御

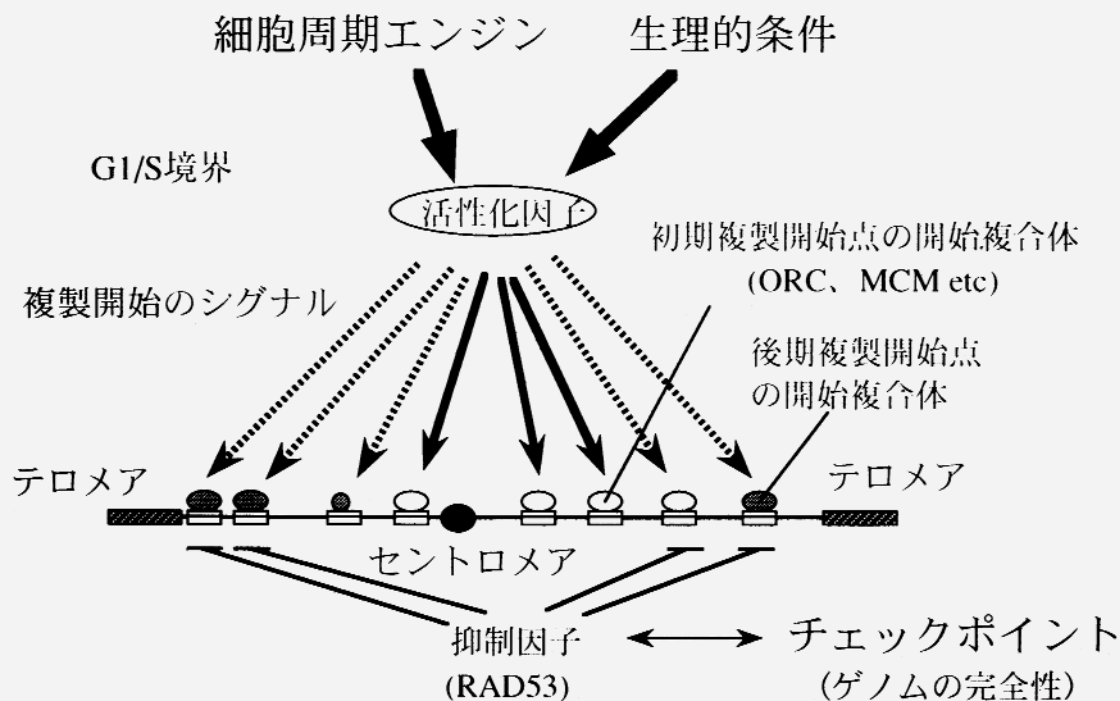


図19 第6 染色体マルチレプリコンの複製と制御の全体像

から染色体に多数の複製開始点があるのは、真核生物では複製速度が遅いので1個の染色体を複製するのに沢山の複製開始点が必要なのだということが言われています。確かに、長い染色体では、第6染色体の左腕と右腕のような150kbくらいの単位で複製が行われるように複製開始点を多数準備する必要があります。しかし、150kbをさらに30kbくらいのレプリコン単位に分割することは複製速度を確保する目的には不必要なことなのです。それでは何のためにこれほど多数の開始点を必要とするのか、私達の研究はその意味を初めて明らかにできたと思っています。

一定の大きさのDNAを単位として、その中に複数の開始点を配置し、開始反応に専念する初期開始点と初期複製点によって始まった複製が接近するまでは開始を抑制している後期開始点に機能を分担しているのです。このような単位を持つことによって、複製が完全に行われたか、DNAに傷が付いていないかを一定の単位毎に監視することができるようになります。その意味で私はこの単位をチェック制御単位と呼びたいと思います。このような私達の考え方はようやく学界で受け入れられ、論文がNature誌

(395巻6702号 618-621ページ、1998年)に掲載されました。複製開始点が染色体の中で多数あるということの生物学的意味が初めて見えたのではないかと考えております。ヒトを初め真核生物は皆このようなチェックポイント機構を持っておりますから、RIによる損傷を受けても一定の割合でそれを修復することは可能です。しかし、それに油断せず、チェック機能を乱用しないようにRI研究における安全性には注意していただきたいと思います。

今や遺伝子からゲノムの研究の時代に入っております。私はもともと染色体の複製の研究を行うに際して、部分部分の特徴というよりは、染色体全体、ゲノム全体のことを考えるということを常に心がけています。本講演でお話した研究成果を出発点として、「複製開始とその制御の普遍性と特異性」、「遺伝子の構造と機能の生物種を越えた普遍性と多様化」などについて明らかにすることを目指した研究を続けたいと思っています。

(平成11年5月7日開催の金沢大学RI安全講習会における特別講演の講演録)