

分子形態観察に基づく高次機能複合体の解析

●釣本 敏樹

奈良先端科学技術大学院大学 (現 九州大学理学研究院)

〈研究の目的と進め方〉

複製、転写等の基本的な細胞機能は、DNAを足場として多数の関連因子が集合体を形成し、その上で特有の反応を進行する。このため、個々の蛋白質分子の機能の理解には、それらが機能複合体を形成する際の分子集合とその動態を理解することが必須である。この目的には蛋白質の1分子レベルの分解能による形態観察が有効と考えられる。そこで、機能複合体として複製フォーク複合体を研究材料とし、そこに含まれる因子の分子形態と機能との関連を明らかにする。この研究を基にして、機能複合体の構成と分子形態を解析する方法論を確立し、蛋白質機能の解明における分子形態情報の有効性を明らかにすることを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

高次機能複合体の解析対象として複製フォークを選び、それを構成する蛋白質1分子から複合体レベルまでの透過電子顕微鏡 (TEM)、原子間力顕微鏡 (AFM) による分子形態観察を試みる。具体的には以下の試みを通して、複合体の分子形態の観察に適した試料調製法、観察法の確立を行い、実際の観察をもとにして機能を論じる方法の有効性の検討を行う。

- 1.複製フォークの再構築に必要な因子をヒト培養細胞の抽出液、大腸菌、昆虫細胞等の発現系から精製する。得られた因子を用いて個々の複合体の形成反応を行うと共に、複製反応の再構築を行い、そこから反応途上の複製中間体を精製しその複製フォーク複合体の単離を行う。
- 2.蛋白質分子の構造変化、複合体状態の蛋白質の分子集合を直接とらえる方法として透過型電子顕微鏡 (TEM)、原子間力顕微鏡 (AFM) を採用し、複製フォークに含まれリング構造を持つクランプ分子、PCNA、およびPCNAをDNAに結合させる活性を持つヘテロ5量体から成るRFCのサブユニット構成、位置関係の解析を行う。これを元にして蛋白質分子形態の解析基盤を確立する。

〈研究期間の成果〉

蛋白質の白金蒸着試料の透過式電子顕微鏡 (TEM) による観察およびナノカーボンプローブを使用した原子間力顕微鏡 (AFM) 観察を試み、いずれも蛋白質の分子形態観察に有効であることを明らかにした (Hohmura et al. 2000)。たとえば、これらの方法により真核生物の複製フォーク構成因子であるクランプ (PCNA) とそのローダー (RFC) の複合体形成過程の解析を行い、それぞれの因子の分子集合様式、サブユニットの配置が明らかにできた。さらにATP添加による構造変化を観察することができた。さらに両者の複合体像が観察され、形成時の各因子間の位置関係を解明することができた (Shiomi et al. 2000)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ここで試みたTEM, AFMによる分子レベルの形態観察は、蛋白質分子の動態、さらにそれらの集合した機能複合体の分子集合を明らかにするのに有効な方法であった。実際に、PCNA、RFC様のチェックポイントや染色体接着複合体の構造解析に使用された例が我々および米国のグループによって報告された。また米国のグループが行ったRFCおよび、PCNA-RFC複合体の結晶構造解析による構造のモデル化において、有益な情報を提供した。したがって蛋白質のTEM, AFM観察による分子形態という情報は、蛋白質機能の同定、推定をする上で、有効な要素となりうる。また複合体の集合様式を直接観察することができ、今後研究対象が拡大する高次複合体の解析法として重要性が増加すると思われる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

TEM, AFM観察の現在の技術では複体内の個々のサブユニット、集合体内の構成のより複雑な位置関係については、解析に限界があり、各構成要素を観察像内で同定することが困難であった。これは、これらの観察像が主に2次元構造の情報であることによる点と、観察法の解像力の限界による。

〈今後の課題〉

上記の問題点に対して、より詳細な構造情報が得られるネガティブ染色による電顕観察、観察像の平均化等による解像度の向上が期待できる。また、白金蒸着試料のTEM観察でも、チルティングによる観察で、3次元観察に近い情報の入手が可能になる。これらの導入、および評価は今後の課題であるが、可能となれば、蛋白質の機能解析における分子形態観察の有効性はさらに拡大することが期待される。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. 0602012319
Shiomi, Y., Usukura, J., Masamura, Y., Takeyasu, K., Nakayama, Y., Obuse, C., Yoshikawa, H., and Tsurimoto, T. ATP-dependent structural change of the eukaryotic clamp loader protein, RFC. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 14127-14132 (2000)
2. 0602012335
Hohmura, K., Itokazu, Y., Yoshimura, S., Mizuguchi, G., Masamura, Y., Takeyasu, K., Shiomi, Y., and Tsurimoto, T., Nishijima, H., Akita S., Nakamura Y. AFM with carbon nanotube probe resolves the subunit organization of protein complexes. J Electron. Microsc. 49, 415-421 (2000)
3. 0602012350
Tatsumi Y, Tsurimoto T, Shirahige K, Yoshikawa H, and Obuse C. Association of human origin recognition complex 1 with chromatin DNA and nuclease-resistant nuclear structures. J Biol Chem. 275, 5904-5910 (2000)

4. 0602020906

Shikata, K. Ohta, S. Yamada, H. Obuse, C. Yoshikawa. H. and Tsurimoto, T. The human homologue of fission yeast *cdc27*, p66, is a component of active human DNA polymerase δ . *J. Biochem.* 129, 699 - 708 (2001)