

岡崎フラグメント発見 50 周年：DNA 複製研究の歴史と最前線

岡崎令治博士は、1968 年の Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology において、DNA 複製の不連続モデルを発表した。『岡崎フラグメント』誕生の瞬間であった。

DNA の二重らせん構造の発見により、半保存的 DNA 複製機構が提唱され、時をまたずにメセルソン=スタールの実験により証明された。アーサー・コーンバーグ博士による DNA ポリメラーゼの発見により、DNA 複製の基本的機構は解明されたかに見えた。しかし、カラム 1 に記載されているように、DNA ポリメラーゼの発見は、新たな問題を生み出し、この問題に解決を与えたのが岡崎令治博士であった。

半保存的 DNA 複製機構、不連続 DNA 複製機構は DNA 複製の二大基本ルールとなったが、その詳細な分子機構の解明は、その後の長い研究を待つことになる。種々のアプローチにより DNA 複製の研究は進展してきた。

1) 遺伝学的研究

1960 年代初頭に Jacob らによりイニシエーターとレプリケーターから構成されるレプリコン仮説が提唱された。また、主に大腸菌における *dna* 変異体の解析から、DNA 複製の過程には多くの因子が関与する可能性が示唆された。その中で DnaA はイニシエーターの候補であると考えられた。またレプリケーターに相当するゲノム部位も同定され、*oriC* と名付けられた。

真核細胞の DNA 複製機構の解明においても、酵母における遺伝学的研究は重要な役割を果たした。原核細胞と同様に、温度感受性変異体の解析により、多くの複製関連因子が同定された。

2) ファージ・プラスミド・ウィルスをモデルとした研究

大腸菌などを宿主とするファージ・プラスミドは、複製メカニズム研究の上で重要な役割を果たした。特に M13, G4, ϕ X174 などの 1 本鎖 DNA ファージの複製メカニズムの解析から、宿主の複製メカニズムが明らかになった。これは、これらの DNA の複製は、ほとんどすべて、宿主の複製因子に依存しているからである（図 1）。

同様に真核細胞においても Adeno virus や SV40 などのウィルスの複製系の解析により、特に、宿主細胞の DNA 鎖の伸長の過程に関して多くの知見が得られた¹⁾。

3) 複製開始のメカニズム

ファージやウィルスをを用いた解析においては、複製伸長についての情報は得られるが、染色体複製開始の解析には適さない。なぜなら、これらの寄生ゲノムの多くは、宿主の複製開始とは異なるメカニズムを使用しているからである。原核細胞では、染色体複製起点 *oriC* からの開始メカニズムの生化学的解析が必要であった。コーンバーグのグループは、長年の努力の結果、試験管内で *oriC* 配列からの複製開始反応を再構築し、そのメカニズムを明らかにした²⁾。

4) 精製タンパク質からの複製開始の再構成

真核細胞における複製開始のメカニズムの研究は、主に酵母の複製起点依存的な複製システムとカエル卵抽出液における DNA 複製系による解析が主要な役割をはたした(図 2)。後者では免疫沈降による標的タンパク質の除去により、複製因子の機能が解明された。この系を用いてライセンスングという概念が確立され、その実体が、MCM を中心とする preRC の形成であること、そして、その後、DNA 複製制御において最も重要である、再複製抑制(once and only once replication)の詳細なメカニズム解明がもたらされた。

前者の解析では、複製起点に結合する ORC がイニシエーターとして同定され、最近になり、複製開始を精製タンパク質から再構成することが可能になった。また、複製複合体の詳細な構造が明らかになりつつある(図 3)³⁾。

5) 複製開始部位とその制御

原核細胞の複製起点は厳密に規定されており、イニシエーター~レプリケーターは 1:1 に対応する。一方、高等生物の複製起点は、緩やかに制御されており、多くの場合、確率的に複製開始を行っているようにさえ見える⁴⁾。一方、巨大なゲノムのどの部分をいつ、どこで複製するかというルールは、各細胞において、大まかに決まっており、染色体の核内における配置や、高次クロマチン構造と密接に関連すること、また、その決定は G1 初期にされることが明らかになっている(図 4)。

6) 複製開始から終結までのメカニズムの解明

1980 年代後半に原核細胞の複製開始のメカニズムが *oriC* 複製系の解体再構成によりほぼ解明されてから、真核細胞における複製開始のメカニズム解明にその興味に移ったが、ここ数年で、飛躍的な発展があった。出芽酵母の染色体複製開始が、クロマチン鋳型の上で精製タンパク質から再構成された⁵⁾。日本人研究者を含め多くの研究者の貢献があったが、中心的な役割をはたした Bruce Stillman および John Diffley 両博士が本年の Gairdner 賞を受賞している。

7) DNA 複製複合体の構造の解明

DNA 複製の過程には多くのタンパク質が関与する。Pre-RC の形成のみでも 14 種類のポリペプチドが関与する。これに引き続く、複製開始、さらに複製フォーク複合体の形成には、全部で~50 種類のポリペプチドが要求される。これらのタンパク質は、鋳型 DNA の上で種々の複合体を形成する。細胞中から、あるいは精製タンパク質を用いて、これらの複合体を単離することが可能になった。さらに、CryoEM によりこれらの巨大複合体の構造を解明することが可能になり、DNA 複製の分子集合の詳細が解明された(図 3)³⁾。

8) DNA 複製の障害と疾患

DNA 複製は、種々の内因性、外因性の理由(ヌクレオチド枯渇、DNA 損傷、DNA の高次構造など)により障害を受け停止する。細胞は、これらの複製ストレスを感知し、

複製を完了するための方策を有している（図 5）。これを複製チェックポイント機構という。複製チェックポイント機構は、細胞が、一旦開始した複製を完了させ、ゲノムの安定性の維持に重要な役割をはたす。このシステムの破綻は、ゲノムに変異を誘導し、がんなどの疾患の原因となる。

9) 今後の展望

DNA 二重らせん構造の発見と、半保存的複製機構の提唱、そして岡崎フラグメントによる不連続合成機構の発見から、50 年余が経過した。大腸菌染色体複製開始の再構成から 20 年余をへて、真核細胞の複製開始も精製タンパク質から再構築された。そして、その分子構造の実態も解明されつつある。今後は、がん細胞の発生を誘導する、ゲノムの不安定化と直結すると考えられる、外的、内的要因による複製フォークの進行の障害、防御、制御、回復のメカニズムの解明が、DNA 複製と疾患の関連から重要な課題となろう。また、複製開始の *stochasticity*(確率論的現象)や *diversity*(多様性)の解明は、生物の *robustness*(頑強性)と複製システムの進化の分子背景を明らかにする上で重要である⁶⁾。複製、転写、組換え、修復、など DNA 鋳型上での反応は、互いに連動して制御されるとともに、染色体の分離分配の過程とも密接に連携する。その際、核内におけるクロマチンの空間的配置、形態は、ゲノム配列、エピゲノム情報の支配のもと、生物の生育、生存、あるいは細胞死、がん化、老化を制御する。全ゲノムのクロマチン一次元情報から 3 次元情報の解析、試験管内再構成システムによる複雑な反応系の再構築を通じて、核内染色体の動態の全貌を明らかにすることが近い将来可能になるであろう。そして、これらの知見は、有機化学、核酸化学、ナノ工学の技術と組み合わせられることにより、染色体の構造、機能を自在に操作する技術開発、そしてその疾患診断、治療への応用とつながってゆくであろう。

コラム 1

分子生物学の黎明期の間には、あまたの新発見が報告され、それと同時に多くの謎が生み出されていた。その一つが DNA の複製メカニズムである。DNA の 2 本鎖は互いに向きが異なる。DNA が複製される際にはこの 2 本鎖がほどけ、一方の鎖が 5'→3' 方向に複製され、もう一方は 3'→5' 方向に複製されなければならない。しかし、知られているすべての DNA 合成酵素は 5'→3' の一方向にのみにしか DNA を伸長できない。つまり、巨視的には DNA の複製は両方向で起こらなくてはならないが、DNA 合成は一方向でしか進まないという矛盾が存在していたのである。

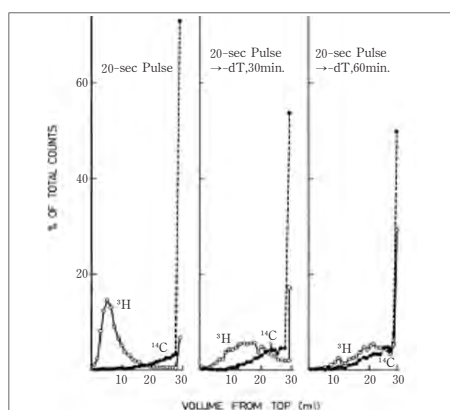


図 i 新生短鎖 DNA の発見

パルス標識をすると、まず短い鎖長の DNA に ^3H がとりこまれるが、非標識チミジンを加えて培養すると長鎖 DNA へと ^3H は移行してゆく

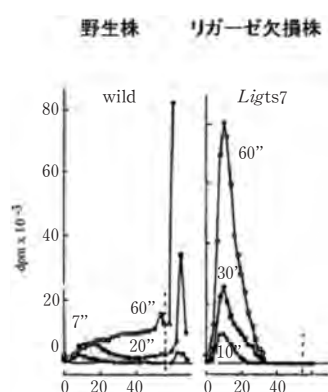


図 ii DNA リガーゼの役割の発見

DNA リガーゼ欠損株では、新生短鎖 DNA の長鎖への移動が観察されない。

この矛盾を説明するために、 ^3H チミジンで数秒のパルス標識を行うことにより、新生 DNA 鎖を解析した(図 i). この解析から新生短鎖 DNA が発見され、これらの新生短鎖 DNA は、その後大きな分子へと変化してゆく

ことが明らかとなった. さらに、単離されたばかりの DNA リガーゼ変異体を用いて、短鎖 DNA

鎖の長鎖への移行に DNA リガーゼが必要であることを示した). これらの結果に基づき、岡崎令治博士は、新生短鎖による DNA の不連続 DNA 複製モデルを提唱した. このモデルでは、ラギング鎖とよばれる $3' \rightarrow 5'$ 鎖 (DNA 複製の方向と DNA 鎖伸長の方向が逆の鎖) は、短い $5' \rightarrow 3'$ 方向で合成された不連続な DNA 断片が最終的に DNA リガーゼによって連結され、一本の連続的な DNA 鎖へと変換されると提唱した(図 ii). 岡崎令治博士は 1968 年にコールドスプリングハーバーシンポジウムでこの不連続 DNA 複製モデルを報告した. 令治博士が発見したラギング鎖の DNA 断片は岡崎フラグメントと名付けられ、今では世界中の分子生物学の教科書に重要用語として掲載されている. 生命の神秘を解き明かそうとする学生や研究者でその名前を知らない人はいないだろう.

令治博士による歴史的な講演から 50 年後の 2018 年 12 月 17, 18 日. 名古屋大学にて『岡崎フラグメントー不連続 DNA 複製モデル 50 周年記念国際シンポジウム』が開催された. 今回のシンポジウムでは 4 人の海外研究者, 13 人の日本人研究者による講演が行われ、岡崎フラグメントの発見から脈々と続いてきた研究の進展が報告された. DNA という生命の基礎をつかさどるものの研究ゆえ、その視点は基礎生物学の領域にとどまらず、医療分野への応用やゲノム進化のメカニズム研究など多岐に及ぶ. 改めて、岡崎フラグメントと不連続 DNA 複製モデルの発見がもたらした影響の大きさを感ぜられた.

コラム 2

名古屋大学理学部分子生物学科元教授、岡崎令治博士による、岡崎フラグメント発見から 50 年を記念して、2018 年 12 月 17 日、18 日に名古屋大学で「岡崎フラグメント

「不連続 DNA 複製モデル 50 周年記念国際シンポジウム」が開催された。名古屋大学で行われた日本発の独創性のある研究で、早逝されなければノーベル賞確実だと言われた発見である。この機会に岡崎令治博士はどのような研究者だったのか、当時の研究現場について、ご夫人でもあり、共同研究者でもあった岡崎恒子博士にお話をうかがった。

岡崎フラグメントの発見者として分子生物学の歴史にその名を残す岡崎令治博士とはいったいどのような人だったのか。

共同研究者で令治博士のご夫人でもある岡崎恒子博士に尋ねると、ひと言、「典型的日本男児」と評した。モットーは「的を定めたことはちゃんと解決するまではやめない」ことだったという。その姿勢は研究においても同様で、研究一筋の人だった。令治博士の研究以外の趣味について尋ねると「さあ、あったのかしらね」と首をひねる。とにかく神経質なまでに研究のことを考え続けていたという。家に帰っても何か気になることがあれば、夜中に何度も研究室を訪れることもあった。研究室から自宅までの短い距離の度重なる往復は車のバッテリーをあげるには十分だった。

当時の研究で苦勞したことを恒子博士に尋ねると、まっさきに「とにかく、お金がなかったこと」と答える。当時の日本では、研究を援助する制度が十分に整っていなかったという。研究に使う試薬も日本にはなく、海外から輸入するしかなかった。1ドル360円の時代である。海外の個人財団から援助をもらってはいたものの、私費を投じることもあった。

そんな厳しい研究環境の中で令治博士は議論を重視した。黎明期の分子生物学の研究は「実験で手を動かす人も言われたままにやるのではだめで、アイデアを出していかないと進んでいかなかった」と恒子博士は話す。令治博士との議論について、岡崎研究室出身で令治博士のもとで研究をしたことがある玉野井冬彦博士は「正しい考察、正しい実験方法にたどりつくまで何時間も議論をしていた。とにかく妥協がなかった」と振り返る。岡崎フラグメントの発見はその妥協なき議論のたまものだったのだろう。

岡崎フラグメントの存在が確認されたあと、課題は岡崎フラグメントが DNA の複製過程に本当に関与しているかどうかを証明することだった。カギとなる研究は複製の開始に必要なプライマーRNAの構造を決定することだった。しかし、分解されやすいプライマーRNAを相手にした研究は困難を極めた。そのさなか、令治博士は自身が示した DNA の不連続複製過程を証明できぬままこの世を去ることとなる。享年 44。白血病だった。1945 年 8 月 6 日、中学生だった岡崎令治博士は広島にいた。今なお輝き続ける功績に反して、その生涯はあまりにも短い。

岡崎フラグメントをめぐる物語は、恒子博士に引き継がれることになる。令治博士の死後、岡崎フラグメントに似た DNA 短鎖が DNA の修復時にも生じる研究が発表された。当然、岡崎フラグメントによる複製モデルに対する批判があがることとなる。恒子博士らはその批判に対する反証を行いながら、プライマーRNAの構造を決定づける研究に奮闘した。そして、ついにプライマーRNAの正体をつかむ。さまざまな媒体はここに

至る研究を「執念の研究」と表現している。恒子博士は「それは書く人がそう書いているだけ」と笑うが、岡崎フラグメントの発見を報告してから約 10 年の月日が経っていた。

最後に「研究者にとって一番大事なことは何か」を尋ねると恒子博士はこう答えた。

「ギブアップしないこと。一つに定めてやり出したらちょっと困難だからといってやめるのではなく進めること。私の場合は、夫に先立たれ、ギブアップするしかないかという場面が種々あった。それでも諦めずに続けてきて道が開けたことがたくさんある。だからネバーギブアップっていうのが一番大事」

令治博士の「的を定めたことはちゃんと解決するまではやめない」というモットーと共鳴する言葉だった。あきらめないこと、ネバーギブアップ。ともすれば使い古された言葉と思われるかもしれない。しかし、実際にその姿勢を貫き、道を開き続けた恒子博士のその言葉は金言として響いた。

今回の岡崎フラグメント 50 周年シンポジウムの懇親会が終わった後、恒子博士の周りを女性の研究者や学生が取囲み、記念撮影をする光景があった。恒子博士に「先生は研究者の目標だ」と言うと「そう言われると気恥ずかしい」と笑った。

参考文献

- 1) Kelly T. Historical Perspective of Eukaryotic DNA Replication. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1042:1-41. doi: 10.1007/978-981-10-6955-0_1. Review. PubMed PMID: 29357051.
- 2) Bramhill D, Kornberg A. A model for initiation at origins of DNA replication. *Cell.* 1988 Sep 23;54(7):915-8. Review. PubMed PMID: 2843291.
- 3) Bai L, Yuan Z, Sun J, Georgescu R, O'Donnell ME, Li H. Architecture of the *Saccharomyces cerevisiae* Replisome. *Adv Exp Med Biol.* 2017;1042:207-228. doi: 10.1007/978-981-10-6955-0_10. Review. PubMed PMID: 29357060; PubMed Central PMCID: PMC5800748.
- 4) Masai H, Matsumoto S, You Z, Yoshizawa-Sugata N, Oda M. Eukaryotic chromosome DNA replication: where, when, and how? *Annu Rev Biochem.* 2010;79:89-130. doi: 10.1146/annurev.biochem.052308.103205. Review. PubMed PMID: 20373915.
- 5) Yeeles JT, Deegan TD, Janska A, Early A, Diffley JF. Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature.* 2015 Mar 26;519(7544):431-5. doi: 10.1038/nature14285. Epub 2015 Mar 4. PubMed PMID: 25739503; PubMed Central PMCID: PMC4874468.
- 6) 正井久雄 微生物のゲノム複製のストラテジー：ーレプリコン仮説再考 私物と科学 遺伝 No.04 pp375-381 2018

図の説明

図 1 ϕ X174 フェージ DNA の試験管内での複製に必要な精製タンパク質群

それぞれのタンパク質が色分けされている。当時遺伝子座の不明であったタンパク質の遺伝子もその後同定された。

図 2 真核細胞複製開始のメカニズム

G1 期に Orc-Cdc6-Cdt1-Mcm により前複製複合体 (pre-RC) が染色体上に形成される。S 期に入ると、これらの pre-RC は、順次活性化される。このステップには Cdc7 と Cdk の 2 種類のキナーゼによるリン酸化が関与する。

図 3 CMG ヘリカーゼの構造

真核細胞の複製ヘリカーゼ CMG は Mcm2-7 複合体、Cdc45, GINS 複合体から構成される。CMG ヘリカーゼは傾き型/伸張型コンフォメーション (A) と平行型/コンパクト型コンフォメーション (B) を繰り返して、二本鎖 DNA を巻き戻すと提唱された (C、石油掘削装置様ポンプジャックヘリカーゼモデル)。

図 4 細胞周期はルールに従い秩序正しく進行する：複製開始と進行の制御ポイント

複製起点の準備およびその活性化のタイミングの決定は G1 期に行われる。ライセンスは複製起点前複合体 (pre-RC) 形成を制御する。複製タイミングの決定は TDP (Timing Decision Point) と呼ばれるが、その決定には Rif1 という因子が関与する。

ゲノム DNA 複製が、ゲノム上でどのような順序で、また核内のどこで起こるか (複製の時空間制御) は、染色体の核内における空間的配置、高次構造と関連する。Cdc7 キナーゼ (DDK; Dbf4-dependent kinase) は、各複製起点による複製開始のシグナルとして機能する⁴⁾。

図 5 複製ストレスに対する細胞応答

A. 原核細胞では、複製フォークが障害を受けると、停止複製フォークを安定化し、複製を再開する経路が作動する。真核細胞では複製フォーク障害は、複製の再開のほか、休眠・潜在的複製起点の活性化で回避される場合もある。B. 真核細胞では、複製ストレスにより、複製ストレスチェックポイント経路が活性化する。この経路の下流に、複製や細胞周期進行を一時停止するシグナルが伝達され、複製フォークの回復をもたらす。Cdc7 キナーゼは、Claspin を介して、チェックポイントの活性化にも関与する。

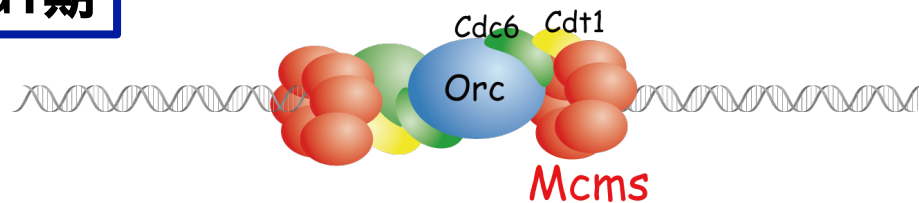
iタンパク質
(DnaT)



n'タンパク質
(PriA)

n, n''タンパク質
(PriB, PriC)

G1期



pre-RC形成

G1-S境界およびS

CDK

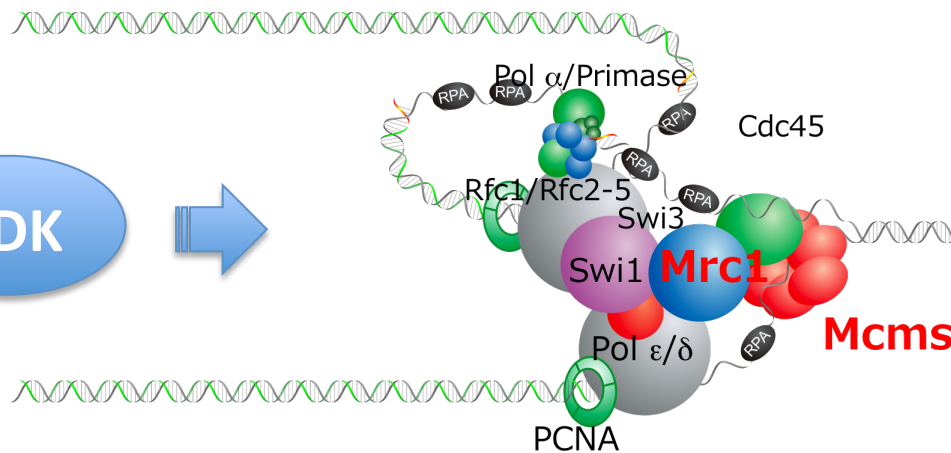


Dbf4

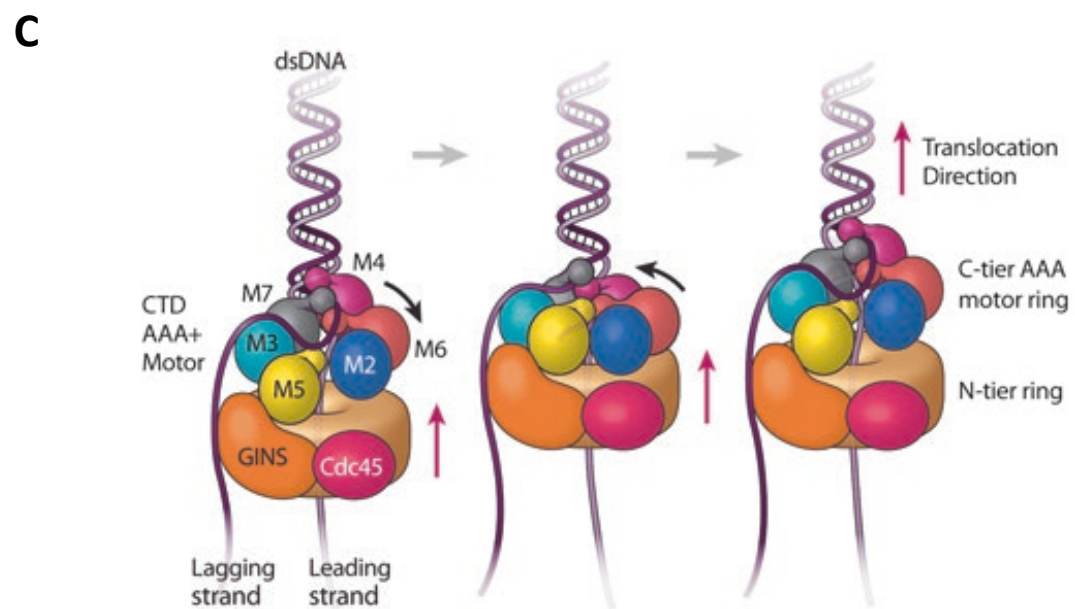
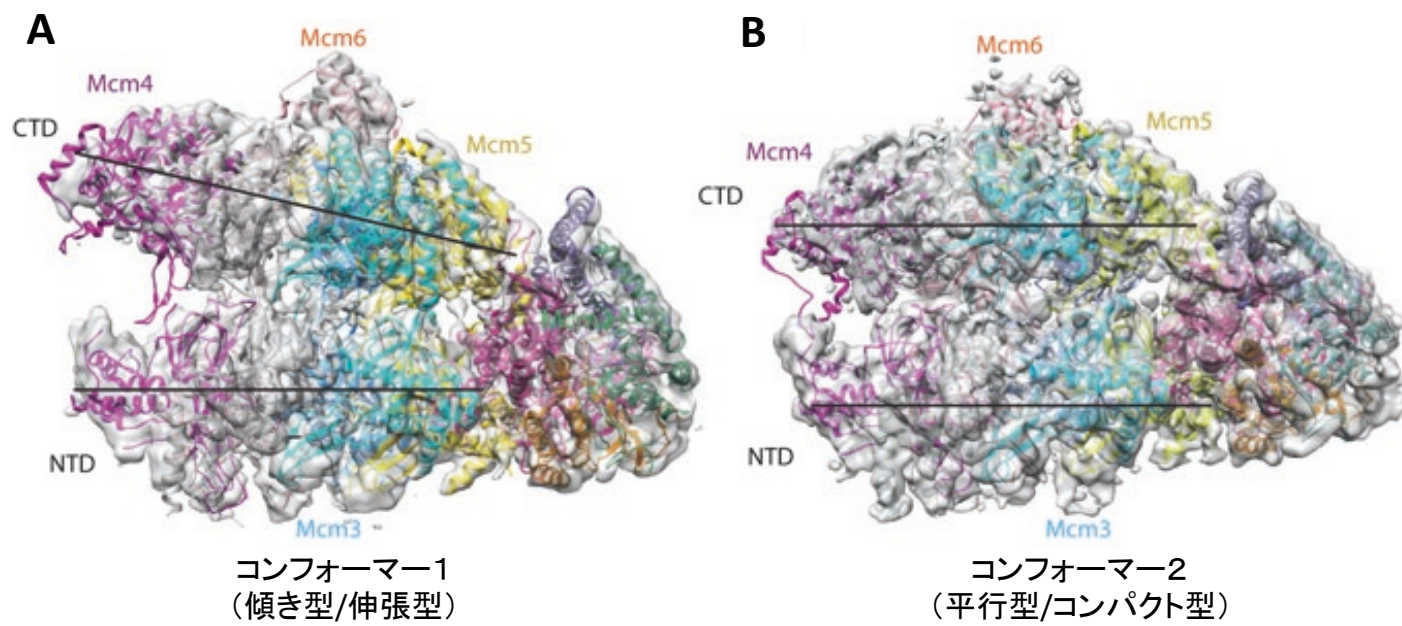
活性化サブユニット

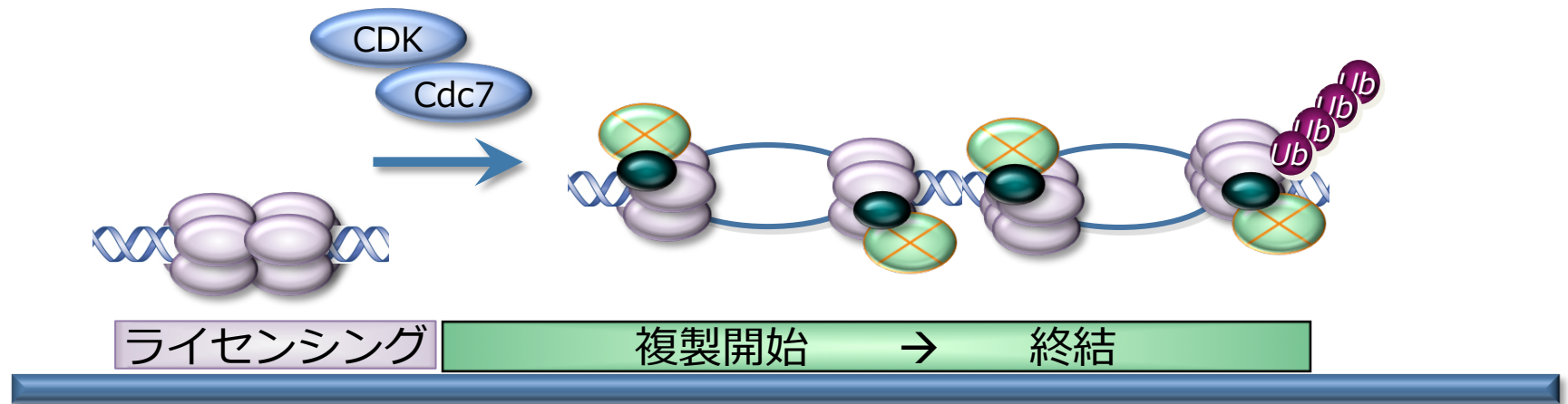
Cdc7

触媒サブユニット



複製フォーク形成

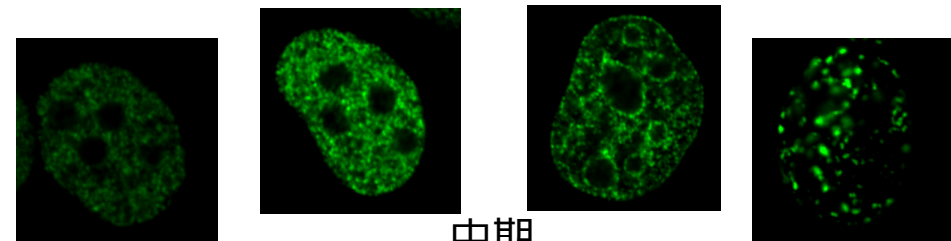
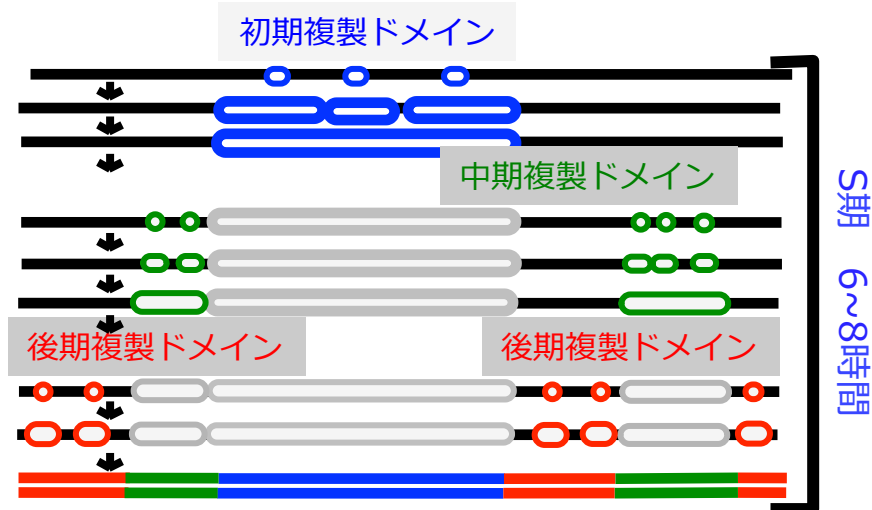




複製起点の決定

複製開始シグナル
=Cdc7(DDK)

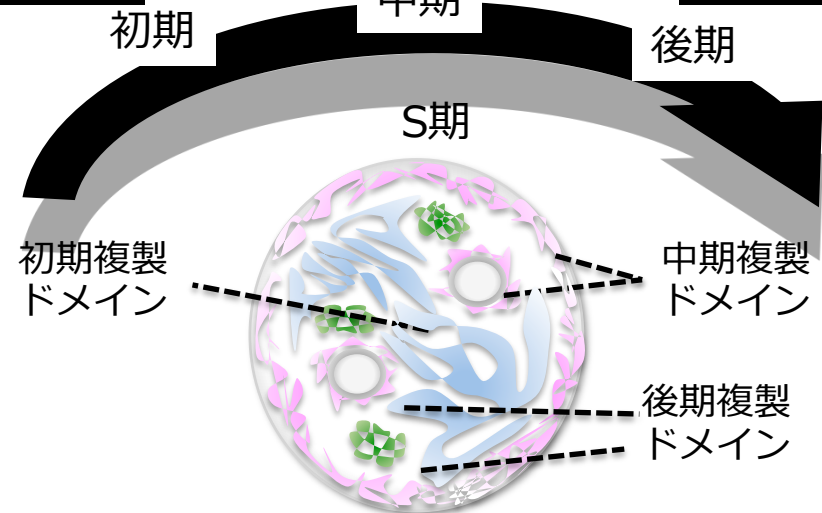
複製タイミングの決定
=TDP?



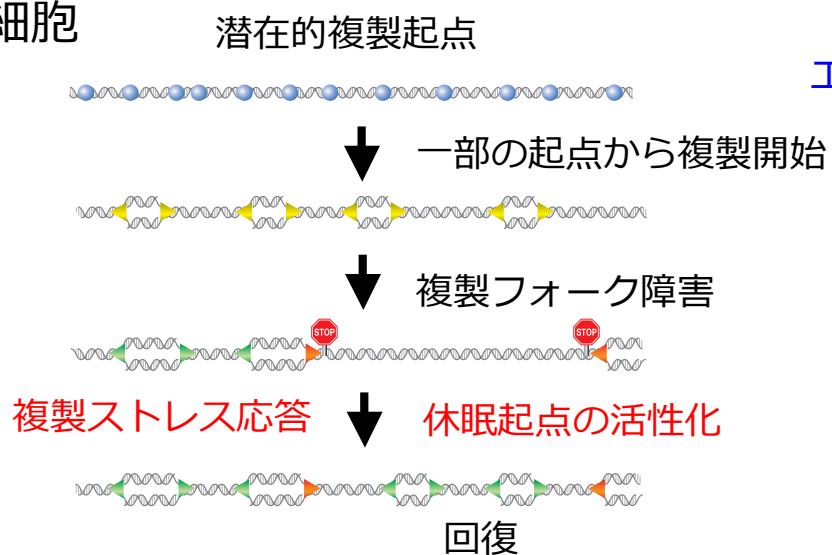
初期

中期

後期



原核細胞



複製停止・障害

