

されるシャペロンタンパク質 (CpkB) の発現量が減少したことに起因していることが示唆された。Eサブユニット遺伝子は、様々な方法で破壊を試みたが、欠損させることができなかった。

おわりに

古細菌由来 RNAP は、大腸菌発現系を利用して発現・精製したそれぞれのサブユニットを組み合わせることで、生体外において再構成され得る。しかし、真核生物の PolIII はそのように再構成することができない。すなわち、古細菌では、古細菌由来 RNAP の構造情報を基に、変異体構築による RNAP の機能解析が可能である。したがって、古細菌の RNAP は、そのような変異体解析を真核生物で行うのに優れた代替モデルといっても過言ではない。古細菌は、真核生物の TFIIF に相同性がある遺伝子をゲノムにコードせず、上述したように TBP および TFB のみでプロモーター依存型の転写を開始する。おそらく、古細菌の RNAP は自らがヘリカーゼ様の活性をもち、DNA の二重鎖をほどくことで転写を開始していることが考えられる。近い将来、DNA がほどこれた状態の転写開始複合体 (transcription initiation complex) の X 線結晶構造解析が古細菌の RNAP を用いて行われれば、我々ヒトを含む真核生物の転写研究の発展に多大に貢献するだろうと期待される。

謝辞

今回、紹介した筆者の研究成果は、米国ペンシルバニア州立大学の村上勝彦博士の研究室で得られたものであり、助言・指導して下さった村上博士に感謝致します。また、Fサブユニットの遺伝子欠損株の作成にご助力を頂いた京都大学の旧今中研究室の金井保博士に感謝いたします。

- 1) Woese, C.R., Kandler, O., & Wheelis, M.L. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4576–4579.
- 2) Hirata, A., Klein, B.J., & Murakami, K.S. (2008) *Nature*, **451**, 851–854.
- 3) Hirata, A., Kanai, T., Santangelo, T.J., Tajiri, M., Manabe, K., Reeve, J.N., Imanaka, T., & Murakami, K.S. (2008) *Mol. Microbiol.*, **70**, 623–633.
- 4) Werner, F. (2007) *Mol. Microbiol.*, **65**, 1395–1404.
- 5) Kwapisz, M., Beckouet, F., & Thuriaux, P. (2008) *Trends Genet.*, **24**, 211–215.
- 6) Bell, S.D. & Jackson, S.P. (1998) *Trends Microbiol.*, **6**, 222–228.
- 7) Orphanides, G., Lagrange, T., & Reinberg, D. (1996) *Genes Dev.*, **10**, 2657–2683.

- 8) Takagi, Y. & Kornberg, R.D. (2006) *J. Biol. Chem.*, **281**, 80–89.
- 9) Grunberg, S., Bartlett, M.S., Naji, S., & Thomm, M. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 35482–35490.
- 10) Lange, U. & Hausner, W. (2004) *Mol. Microbiol.*, **52**, 1133–1143.
- 11) Geiduschek, E.P. & Ouhammouch, M. (2005) *Mol. Microbiol.*, **56**, 1397–1407.
- 12) Zhang, G., Campbell, E.A., Minakhin, L., Richter, C., Severinov, K., & Darst, S.A. (1999) *Cell*, **98**, 811–824.
- 13) Cramer, P., Bushnell, D.A., & Kornberg, R.D. (2001) *Science*, **292**, 1863–1876.
- 14) Miyao, T., Barnett, J.D., & Woychik, N.A. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 46408–46413.
- 15) Pillai, B., Verma, J., Abraham, A., Francis, P., Kumar, Y., Tatu, U., Brahmachari, S.K., & Sadhale, P.P. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 3339–3346.
- 16) Sato, T., Fukui, T., Atomi, H., & Imanaka, T. (2003) *J. Bacteriol.*, **185**, 210–220.

平田 章

(愛媛大学大学院理工学研究科物質生命工学専攻)

Archaeal transcriptional machinery

Akira Hirata (Department of Material Science and Biotechnology, Graduate School of Science and Engineering, Ehime University, Bunkyo 3, Matsuyama 790–8577, Japan)

細胞運動関連遺伝子群のゲノムワイドスクリーニング法の開発

1. はじめに

細胞観察技術の向上によってライブセルイメージングは容易な手段となり、モニター上で細胞がいつも簡単に動き回るのを目のあたりにすると、誰もがそのダイナミックな運動に驚かされる。しかし細胞が運動し前進する過程は非常に複雑であり、運動中の細胞内で起きている様々な素過程がどのように制御・統括されているのかは未だよく分かっていない。現在一般的に受け入れられている細胞運動のプロセスは次のとおりである。i) 細胞の前後 (極性) の決定, ii) 前端部における仮足の形成・伸長と新たな接着斑の構築, iii) 後端部での接着斑の解除, iv) 後端部における細胞の収縮。このように細胞の運動には、時系列に沿ったこれらのステップが継続的に繰り返されることが必要である (図 1)。そして各ステップでは様々な素過程 (細胞膜のリン脂質代謝, 細胞骨格の再構成, 細胞内小胞輸

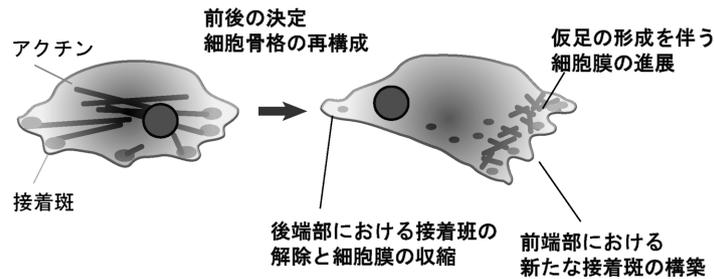


図1 基質上における細胞運動のプロセス

基質上に張り付いている細胞が運動を開始するには、細胞運動を誘発する様々な刺激により、まず細胞の前後が決定される。その後、細胞骨格の再構成や接着斑の解除、再構築、仮足の形成等を繰り返すことで継続的な運動が行われる。

送、細胞-基質間の接着制御、細胞内情報伝達等)が高度に協調されている。運動中の細胞内において、各素過程は時空間的に制御されており、細胞の運動メカニズムを分子レベルで明らかにするためには、これらの素過程がどのように協調的制御を受けているのかを包括的に理解する必要がある。この包括的理解にまず必要なことは細胞運動に関わる役者の洗い出しであり、表現型に基づいた遺伝子スクリーニングは細胞運動関連遺伝子群の同定に有効な手段である。そこで、本稿では既存の細胞運動関連遺伝子群のスクリーニングシステムと最近、我々が開発した二つのゲノムワイドスクリーニング法について紹介したい。

2. 既存の細胞運動評価システムを用いたハイスループットスクリーニング

個々の細胞運動関連遺伝子の機能を解析するために創傷治癒法 (wound-healing assay)、ボイデンチャンバー法、ファゴキネティックトラック法といった評価法が行われている。これらを多数検体に適用することによって、網羅的に遺伝子スクリーニングを行うことが幾つかの研究グループで試みられているので以下に紹介する。

創傷治癒法は培養ディッシュ上で単層に増殖した細胞の一部を引っ掻いて物理的に除去することで溝を作成し、この溝へ細胞が運動し再び埋まる過程を観察する実験法である。Yarrowらは創傷治癒法をマルチウェルディッシュで行う大規模なスクリーニングシステムを開発した¹⁾。そして約1万6千種の化学物質からなるライブラリーに対してこのスクリーニング法を適用し、新規のRhoキナーゼ阻害剤を同定している²⁾。その翌年、同様なアプローチによってCollinsらはヒトの約5,000遺伝子を標的としたsiRNA (small interfering RNA) ライブラリーに対してスク

リーニングを行っている。彼らは、さらに解析の自動化をすすめることでスクリーニング過程の省力化にも成功しており、MAP4K4 (mitogen-activated protein 4 kinase 4) 等の4遺伝子を同定している³⁾。また、昨年Simpsonらはキナーゼ、ホスファターゼと運動や接着に関与する既知遺伝子のsiRNA (1081種)を用いて同様なスクリーニングを行うことで細胞運動の抑制、亢進に関与する遺伝子をそれぞれ同定している⁴⁾。

一方、ボイデンチャンバー法はフィルターで仕切られた2層構造のディッシュを用いる。上層のディッシュに細胞、下層に誘因物質を入れ、誘因物質に反応して二つのディッシュを隔てているフィルターを通過する細胞数を計測することで細胞運動を評価する。Suyamaらはリボザイムライブラリーを用いることによって、ミオシン調節軽鎖ホスファターゼ様のタンパク質をコードした遺伝子を含む八つの遺伝子の同定に成功している⁵⁾。また、Gunawardaneは同様のシステムを用いてMCF7細胞のcDNA発現ライブラリーに対するスクリーニングを行うことで、PDEF (prostate derived Ets factor) を単離している⁶⁾。

ファゴキネティックトラック法とは微小粒子を均一にコートしたディッシュ上に細胞を播種し、細胞が運動時に粒子を剥がす作用を利用して、細胞の軌跡をディッシュ上に記録する測定法である。このシステムを用いることで乳がんcDNAライブラリーから、過剰発現によって運動能を亢進させる因子としてPKC ζ (protein kinase C ζ) 等四つの遺伝子が同定されている⁷⁾。

3. 個体レベルにおけるスクリーニング

線虫⁸⁾やショウジョウバエ⁹⁾のような多細胞生物をモデル系として、発生過程における生体内細胞の運動を指標にス

クリーニングを行うことも試みられている。紙面が限られているため、線虫を用いたスクリーニングについて簡単に紹介する。

Cramらは、線虫の発生過程において観察されるDTC (distal chip cell) の移動をスクリーニングの指標として用いている。線虫の発生過程において正常な組織形成、器官形成を進めるためには様々な細胞が時空間的に制御された細胞移動を行う必要がある。DTCは線虫の生殖巣形態形成を誘導する細胞であり、体壁内面をU字型に移動する。この現象は光学顕微鏡下で容易に確認できる。そこで線虫にdsRNA (double-stranded RNA) を発現する大腸菌ライブラリーを与えることで (RNAi-feeding 法)、細胞運動関連遺伝子群の網羅的なスクリーニングを試みている。そして、約1万7千種のdsRNAを含むライブラリーから、代謝酵素、転写因子等、様々な機能カテゴリーに分類される99の遺伝子を同定するに至っている⁸⁾。

4. 細胞性粘菌を用いた REMI 法による ゲノムワイドスクリーニング

細胞性粘菌は真核単細胞であり酵母のような堅い細胞壁を持たないため、様々な細胞イベントのモデル生物として世界中で広く用いられている。また、細胞性粘菌は半数体であるため遺伝子破壊株の作成が容易であり、さらに分子

生物学的ツールも整備されている。我々は細胞性粘菌から細胞運動関連遺伝子を同定するために、細胞運動亢進株である *amiB* 遺伝子欠損株¹⁰⁾を用いた。*amiB* 遺伝子はもとと走化性変異株として同定された遺伝子で、酵母の転写因子 (Srb9) のホモログをコードしている。この *amiB* 遺伝子のノックアウト細胞は野生株と比較して高い細胞運動能を有している。そのため、増殖過程において個々の細胞が高いアメーバ運動能により散逸してしまい、明瞭なコロニーを形成することができない¹¹⁾。そこで REMI (Restriction enzyme-mediated integration) 法を用いて、*amiB* 遺伝子欠損細胞から変異体ライブラリーを作成し、再びコロニー形成能を獲得したクローン、すなわち細胞運動能が低下した株を単離することで細胞運動遺伝子の同定を試みた。

REMI 法とは、制限酵素と薬剤耐性遺伝子をエレクトロポレーションにより細胞内に導入することで、効率よくゲノム DNA 上に挿入変異を起こさせる方法である。細胞内に導入された制限酵素によりゲノム DNA が切断され、その切断箇所に薬剤耐性遺伝子が挿入されるため、原理的にはゲノム中にランダムに挿入変異を起こさせることが可能である。また、挿入変異箇所は挿入された薬剤耐性遺伝子を手がかりにインバース PCR 法によって容易に同定することが可能である (図2)。我々はこのスクリーニングシ

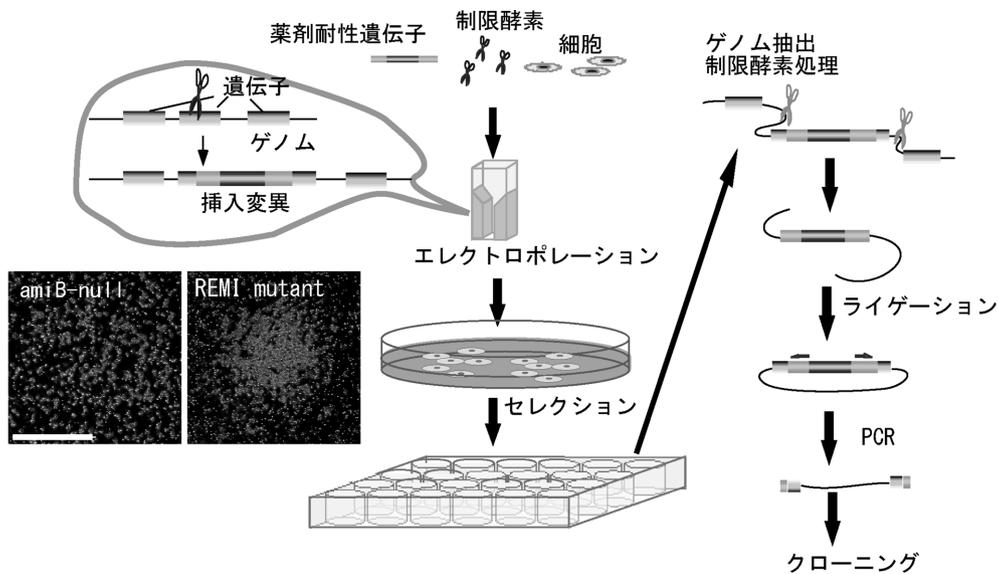


図2 細胞性粘菌を用いた細胞運動関連遺伝子のスクリーニング法

REMI 法により得られた変異株ライブラリーよりコロニー形成能が回復した細胞を単離する (写真左)。変異株よりゲノム DNA を抽出後、適当な制限酵素で DNA を断片化し、リガーゼで環状化する。環状化 DNA をタグ内に設計したプライマーで外側に向かって PCR を行い、タグの挿入領域を回収する。バー; 100 μm

表1 *amiB* 遺伝子欠損細胞のサプレッサー変異体から同定した遺伝子群

カテゴリー	変異体名	DictyBase ID	遺伝子産物	遺伝子名	制限酵素	挿入部位
転写	Sab1/2	DDB0217344	CTD ホスファターゼ	—	<i>EcoRI</i>	ORF
	Sab12	DDB0216340	myb	<i>mybN</i>	<i>MunI</i>	ターミネーター
転写/細胞接着	Sab6	DDB0191132	β -カテニン	<i>aardvark</i>	<i>EcoRI</i>	ORF
	Sab21	DDB0232115	ヒストン H2A バリエーション	<i>H 2Av 3</i>	<i>MunI</i>	ORF
核タンパク質 キナーゼ	Sab4/5	DDB0185194	ヒスチジンキナーゼ	<i>dokA</i>	<i>EcoRI/BclI</i>	ORF
	Sab11/22	DDB0231984	ヒスチジンキナーゼ	<i>dhkl</i>	<i>BclI/EcoRI</i>	ORF
代謝	Sab3	DDB0185347	カルボキシルエステラーゼ	—	<i>EcoRI</i>	ORF
	Sab10	DDB0189019	ポリケチドシンターゼ	—	<i>EcoRI</i>	ORF
	Sab14	DDB0231419	プロトポルフィリノーゲンオキシダーゼ	<i>hemG</i>	<i>EcoRI</i>	ORF
	Sab16	DDB0231507	ホスホリパーゼ D	<i>pldB</i>	<i>SpeI</i>	ORF
トランスポーター	Sab13	DDB0214899	ABC トランスポーター	<i>abcG 22</i>	<i>HindIII</i>	プロモーター
	Sab7/8	DDB0216824	hypothetical protein	—	<i>MunI</i>	ORF
機能未知	Sab9	DDB0206126	膜貫通タンパク質	—	<i>MunI</i>	ターミネーター
	Sab15	DDB0202597	hypothetical protein	—	<i>EcoRI</i>	プロモーター
	Sab17	DDB0217202	hypothetical protein	—	<i>BclI</i>	ORF
	Sab18	DDB0203439	hypothetical protein	—	<i>MunI</i>	ターミネーター
	Sab19	DDB0218260	hypothetical protein	—	<i>MunI</i>	ORF
	Sab20	DDB0186205	膜貫通タンパク質	—	<i>ClaI</i>	ORF

細胞性粘菌データベースに登録してある ID と遺伝子名については上記のとおり。制限酵素はインバース PCR 法によって挿入領域が回収できたものについて記載しており、タグの挿入部位はその回収領域から決定した。

ステムにより 22 個の変異体を単離し 18 の変異遺伝子 (*sab* 遺伝子) を同定することに成功した (表 1)。これらの遺伝子群には転写因子、膜タンパク質、代謝酵素、キナーゼ、機能未知タンパク質等、様々な素過程に関わる遺伝子が含まれており、この結果から、細胞運動は様々な素過程が関与していることが改めて確認された¹²⁾。

次に、細胞性粘菌で同定された *sab* 遺伝子群の機能を高等動物の培養細胞で評価するため、その一つであるホスホリパーゼ D (PLD) に関して培養細胞系を用いて検証を行った。PLD は細胞膜の主要構成成分であるホスファチジルコリンを加水分解することによって、セカンドメッセンジャーであるホスファチジン酸を産生する酵素である。RNAi や阻害実験から高等真核細胞においても PLD が細胞運動に関与していることを確認し、細胞性粘菌を用いた本スクリーニング法により得られた結果が培養細胞においても有効であり、その普遍性を実証することができた¹³⁾。また興味深いことに PLD の活性化因子の一つが PIP₂ であり、一方で PLD によって産生されるホスファチジン酸によって PI-5 キナーゼが活性化される。すなわち、PLD は二つのリン脂質代謝経路の結節点に存在することになり、細胞運動を制御する様々な素過程を調節する因子の一つである可能性が考えられる。

5. 細胞運動評価チップを用いたスクリーニング

トランスフェクションマイクロアレイ (TMA) を用いたスクリーニングはハイスループット性が高く、表現型に基づいたスクリーニングを行う上で有効なアプローチである^{14,15)}。TMA はガラス基板上に特定の核酸 (siRNA や発現ベクター) とリポフェクション試薬、ゼラチン、フィブロネクチンをスポット状に配置し乾燥固化したものであり、ここに細胞を播種することによって各スポットに異なる核酸を導入することが可能となる技術である。我々はこの TMA 法を改変し細胞運動を評価するシステムの構築を行った¹⁶⁾。

まず、各スポット領域を規定するためのローダミンラベルしたフィブロネクチン、核酸の徐放性を高めるゼラチン、形質転換細胞を可視化するための蛍光タンパク質発現ベクター、各 siRNA、リポフェクション試薬の混合物をカラーゲンコートしたガラス基板上にプリントし、ラット膀胱がん由来の NBT-II 細胞を播種した。本スクリーニング法において NBT-II 細胞を選択した理由は、この細胞が魚の鱗細胞 (ケラトサイト) のような特徴的な細胞運動能を有しているからである。チップという極小空間でアッセイを行う場合、時間経過とともに細胞密度が増加してしまうため、各細胞の運動能に影響を与えてしまう。しかし、NBT-II 細胞はカラーゲン基質上に播種されると 100 μm /

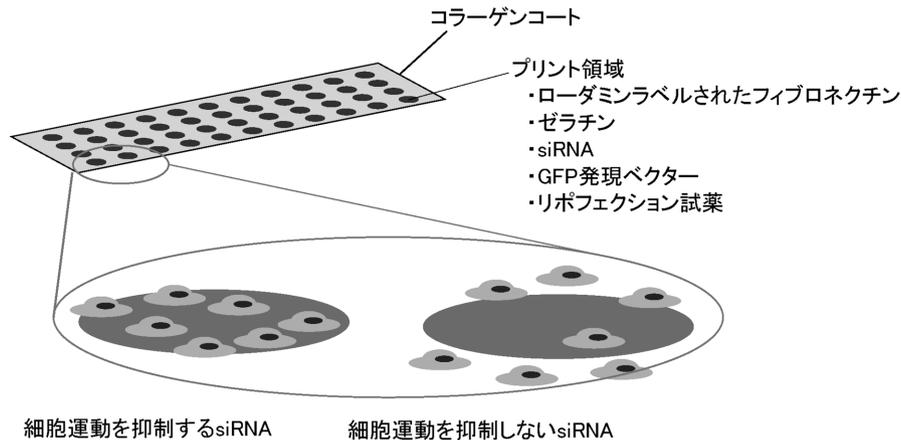


図3 トランスフェクションアレイによる細胞運動評価セルチップ
スポット領域のローダミンラベルしたフィブロネクチンと形質転換細胞を識別する GFP
蛍光の2色の蛍光シグナルから細胞運動能を評価する。

時間という高速でかつ直進性の高い運動を行うため測定時間が短時間ですみ、上記の問題点を避けることが可能となった。評価法はシンプルで各スポット上の細胞が運動したか否かである。siRNAが細胞運動を抑制しない場合、GFPが発現した細胞はランダムに直進運動を行うため、時間経過とともに赤くラベルされたスポット領域から外れていく。一方、細胞運動に関わる遺伝子をノックダウンした場合では細胞はスポット領域にとどまるであろうと期待した(図3)。このように2色の蛍光で細胞とスポット領域を標識したことにより、長時間撮影を行うこともなく顕微鏡写真によって細胞運動を評価することが可能となった。この手法を用いて細胞の運動に直接関与すると考えられているいくつかの遺伝子に関してテストを行ったところ良好な結果が得られ¹⁶⁾、現在はラットの全キナーゼ(約800遺伝子)に対してスクリーニングを行っている。

6. おわりに

ゲノムプロジェクトの終了後、ポストゲノムとしての研究は各遺伝子の機能解析に移行している。そうしたなか、機能未知遺伝子の役割を知るうえでゲノムワイドなスクリーニングは強力なツールであることから、細胞運動研究の分野においても様々なモデル細胞を用いたスクリーニング法が開発されてきた。さらに、スクリーニングによって同定された遺伝子の機能解析もイメージングに関する装置や蛍光タンパク質、siRNAといったツールの充実によって細胞レベルでの機能解析が容易になっている。今後、大規模な表現型解析による遺伝子のスクリーニングと解析技術

の自動化、そして個々の遺伝子に関する詳細な機能解析によって、細胞運動の全貌が明らかになっていくことを期待したい。

- 1) Yarrow, J.C., Perlman, Z.E., Westwood, N.J., & Mitchison, T. J. (2004) *BMC Biotechnol.*, 4, 21.
- 2) Yarrow, J.C., Totsukawa, G., Charras, G.T., & Mitchison, T.J. (2005) *Chem. Biol.*, 12, 385–395.
- 3) Collins, C.S., Hong, J., Sapinoso, L., Zhou, Y., Liu, Z., Micklash, K., Schultz, P.G., & Hampton, G.M. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 3775–3780.
- 4) Simpson, K.J., Selfors, L.M., Bui, J., Reynolds, A., Leake, D., Khvorova, A., & Brugge, J.S. (2008) *Nat. Cell Biol.*, 10, 1027–1038.
- 5) Suyama, E., Kawasaki, H., Nakajima, M., & Taira, K. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 5616–5621.
- 6) Gunawardane, R.N., Sgroi, D.C., Wrobel, C.N., Koh, E., Daley, G.Q., & Brugge, J.S. (2005) *Cancer Res.*, 65, 11572–11580.
- 7) Naffar-Abu-Amara, S., Shay, T., Galun, M., Cohen, N., Isakoff, S.J., Kam, Z., & Geiger, B. (2008) *PLoS ONE*, 3, e1457.
- 8) Cram, E.J., Shang, H., & Schwarzbauer, J.E. (2006) *J. Cell Sci.*, 119, 4811–4818.
- 9) Moore, L.A., Broihier, H.T., Van Doren, M., Lunsford, L.B., & Lehmann, R. (1998) *Development*, 125, 667–678.
- 10) Kon, T., Adachi, H., & Sutoh, K. (2000) *Genes Cells*, 5, 43–55.
- 11) Asano, Y., Mizuno, T., Kon, T., Nagasaki, A., Sutoh, K., & Uyeda, T.Q. (2004) *Cell Motil. Cytoskeleton*, 59, 17–27.
- 12) Nagasaki, A. & Uyeda, T.Q. (2008) *Exp. Cell Res.*, 314, 1136–1146.
- 13) Nagasaki, A., Inotsume, K., Kanada, M., & Uyeda, T.Q. (2008) *Cell Struct Funct*, 33, 27–33.
- 14) Ziauddin, J. & Sabatini, D.M. (2001) *Nature*, 411, 107–110.

- 15) Yoshikawa, T., Uchimura, E., Kishi, M., Funeriu, D.P., Miyake, M., & Miyake, J. (2004) *J. Control Release*, 96, 227–232.
- 16) Onuki-Nagasaki, R., Nagasaki, A., Hakamada, K., Uyeda, T.Q., Fujita, S., Miyake, M., & Miyake, J. (2008) *Lab. Chip*, 8, 1502–1506.

長崎 晃, 長崎 玲子, 藤田 聡史, 上田 太郎
(産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門)

Genome-wide screening methods for genes involved in cell migration

Akira Nagasaki, Reiko Nagasaki, Satoshi Fujita, and Taro Q. P. Uyeda (Research Institute for Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8562, Japan)

真核生物の染色体複製における多重クランプ・クランプローダー系の役割

1. はじめに

真核生物の染色体複製では、クランプである増殖細胞核抗原 (PCNA) とそれを DNA に結合させるクランプローダー (以下ローダーと略す) の複製因子 C (RFC) が対となって機能し、複製フォーク進行の中心的役割を果たしている。さらに、PCNA の多くの機能因子との結合や修飾による機能変換により、PCNA を足場とした染色体の維持伝達に機能する様々な反応が複製フォークの進行と連係して行われている。また PCNA 以外のクランプとしてチェックポイント応答で機能する Rad9-1-1, RFC 以外のローダーとしてチェックポイントの Rad17-RFC, 娘染色体接着の Ctf18-RFC, 染色体構造維持の Elg1-RFC など様々な反応に要求される複合体が存在する。これら複数のクランプとローダーは、それぞれに特異的な DNA 構造に対応して機能し、正常な複製フォーク進行のキープレイヤーとして働くと考えられている。

ここでは、我々がこれまでに PCNA・RFC の解析を足がかりとして研究してきた、染色体の複製から分配に至るまでの維持伝達機構における多様なクランプ・ローダー系の特性と機能連係について話を進めたい。特に、これまで積極的に解析を進めてきた Rad17-RFC と Ctf18-RFC, そして最近報告したローダーと DNA ポリメラーゼ間の相互作用を中心に紹介する。

2. 複製系の PCNA と RFC

PCNA に代表されるクランプは真核生物だけでなく、大腸菌の β サブユニット, T4 ファージの gp45, 古細菌の PCNA と生物種を超えて存在する。複製に必須なこれらのタンパク質は、アミノ酸配列レベルでは相互に類縁性が低いにも関わらず、その立体構造は全て特徴的なリング構造をとっている^{1,2)}。そしてこのリングの中央に DNA を通す様式で結合し、その上を自由にすべるため DNA スライディングクランプとも呼ばれる。我々が解析対象にしているヒト PCNA は、単一サブユニットが head-to-tail 様式で相互作用し形成される三量体のリングで、複製型 DNA ポリメラーゼ (Pol) δ/ϵ と結合し活性促進因子として機能する。これに加えて染色体の複製, 修復, 組換え, 接着, 分配, 再構築と修飾などに機能する 50 をこえる様々なタンパク質と結合することが明らかにされており³⁾、複製から始まる一連の染色体維持伝達機構において中枢的な機能を担っている。さらに PCNA は、DNA 損傷に応答してユビキチン化や SUMO 化の修飾を受ける。この修飾により、複製型 Pol から DNA 損傷に対応した Pol への変換が起こり、フォークを進めることが示唆されている⁴⁾。さらに、特定のユビキチン化酵素の活性化に関与することで、いくつかのタンパク質の安定化制御も行っており⁵⁾、PCNA の多機能性はこれからも拡大していくと考えられる。

このような PCNA の機能は DNA に結合していることで発揮されるが、その結合には PCNA の閉じたリングを一時的に開く必要がある。しかしながら、PCNA それ自身にはこの機能はなく、ローダーがこの反応を触媒する。

ローダーも大腸菌の γ 複合体, T4 ファージの gp44/62 複合体, 古細菌と真核生物の RFC というようにそれぞれのクランプに対応して生物種を超えて存在する²⁾。ヒトのローダーである RFC は、AAA+ATPase ファミリーに属する大サブユニット (RFC1) と四つの小サブユニット (RFC 2-5) から成るヘテロ五量体で、DNA と PCNA に依存して促進される ATPase 活性、鋳型 DNA 上のプライマー 3' 末端に特異的に結合する活性を持ち、ATP 加水分解依存的に PCNA を鋳型 DNA に結合させる。我々はこれら PCNA と RFC の解析で、従来の生化学的解析に加えて電子顕微鏡, 原子間力顕微鏡を用いた分子形態の直接観察を行った。その結果、RFC は五つのサブユニットがリング状に集合した分子形態を持つこと、さらにこの構造が ATP 添加時に変化することを見いだした。このことから、この構造変化を通して PCNA リングの一時的な開環を仲