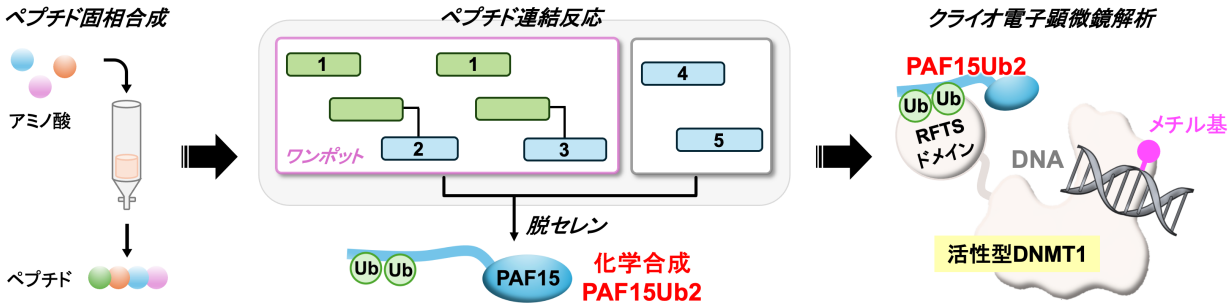
化学合成タンパク質で DNA 複製の記憶に迫る
―DNMT1 が目覚める瞬間を可視化―

概要

細胞が分裂するとき、遺伝子の使い分けを決める「DNA メチル化」※1 という目印も、正しく娘細胞へ受け継がれる必要があります。この引き継ぎを担う酵素 DNMT1※2 は、普段は、自分自身の一部である RFTS ドメイン※3 が DNA と結合する場所にふたをしており、働きが止められています。細胞は、PAF15※4 というタンパク質に小さなタンパク質ユビキチン※5 が 2 つ付いた目印（PAF15Ub2）を使って、このふたを外すと考えられてきましたが、その瞬間の姿はこれまで確かめられていませんでした。PAF15Ub2 は細胞から均一な状態で取り出すことが難しく、研究の壁となっていたためです。

京都大学医生物学研究所 林剛介 教授、徳島大学先端酵素学研究所 有田恭平 教授、名古屋大学大学院工学研究科 鈴木沙依 博士後期課程学生および同村上裕 教授らの研究グループは、アミノ酸 262 個からなる PAF15Ub2 を、6 つの断片を順につなぎ合わせる手法で人工的につくり出すことに成功しました。合成したタンパク質を用いてクライオ電子顕微鏡※6 で観察したところ、DNMT1 のふたが外れて働ける形に変わる様子をとらえることができました。DNA メチル化の異常は、がんや細胞の老化とも関わることから、本研究はその仕組みの理解を深める成果といえます。本研究成果は、2026 年 11 月 10 日に国際学術誌「*Advanced Science*」にオンライン掲載されました。



PAF15Ub2 の化学合成、および活性型 DNMT1 のクライオ電子顕微鏡解析

作成者：村上研究室　鈴木沙依

１．背景

私たちの体はおよそ 37 兆個の細胞からできていますが、そのすべてが同じ遺伝情報（DNA）を持っています。それでも皮膚や神経、肝臓といった異なる細胞になれるのは、どの遺伝子を使い、どの遺伝子を使わないかという「使い分け」の情報が、DNA そのものとは別に記録されているからです。その記録方法のひとつが、DNA の特定の場所に小さな目印（メチル基）を付ける「DNA メチル化」です。

細胞が分裂するとき、DNA は複製されて 2 本に増えますが、新しくつくられた DNA にはこの目印がまだ付いていません。そこで、片側にだけ目印が残った状態の DNA を見つけて、もう片側にも同じ目印を付け直す酵素が働きます。これが DNA メチル化酵素 DNMT1 です。この働きが乱れると、本来使われるはずの遺伝子が止まったり、止まっているはずの遺伝子が動き出したりして、がんをはじめとするさまざまな病気につながることが知られています。

ところが DNMT1 は、いつでも働けるわけではありません。普段は、自分自身の一部である RFTS ドメインが DNA の結合部分にふたをしており、働きが止められています。間違った場所に目印を付けてしまうことを防ぐための、安全装置のような仕組みです。では、この安全装置はいつ外れるのでしょうか。

鍵を握るのが、PAF15 というタンパク質です。DNA 複製が始まると、PAF15 の 2 か所（15 番目と 24 番目のリジン残基）に、ユビキチンという小さなタンパク質が 1 つずつ取り付けられます。この「ユビキチン 2 つ付き PAF15（PAF15Ub2）」が DNMT1 のふたの部分に結合することで安全装置が外れ、DNMT1 が働けるようになると考えられてきました。しかし、その瞬間に DNMT1 がどのような形に変化しているのかは、これまで直接確かめられていませんでした。

そこで本研究では、天然と同じ構造の PAF15Ub2 を化学合成によってつくり出すことに挑みました。均一な試料を用いることで、DNMT1 の安全装置が外れた瞬間の姿を直接とらえ、活性化の仕組みを原子レベルで明らかにすることを目指しました。

２．研究手法・成果

PAF15Ub2 がこれまで調べられてこなかったのは、必要な試料を十分な純度で手に入れることが難しかったためです。細胞の中でユビキチンを取り付ける酵素を試験管内で再現しても、狙った 2 か所以外にもユビキチンが付いたり、逆に 1 つしか付かなかったりと、さまざまな分子が混ざった状態になってしまいます。そこで研究グループは、タンパク質を一から人工的につくる「タンパク質化学合成」※7 という手法を用いました。タンパク質化学合成では、アミノ酸を 1 個ずつつなげた短い断片を用意し、それらを特殊な化学反応でつなぎ合わせて大きなタンパク質を組み立てます。PAF15Ub2 は、PAF15（110 アミノ酸）に 76 アミノ酸のユビキチンが 2 つ付いた、合計 262 アミノ酸からなる大きな分子です。研究グループはこの分子を 6 つの断片に分け、順につなぎ合わせる計画を立てました。

ところが、最初に試した「端から順番につないでいく方法」では、最終的に得られたのは全体のわずか 0.07％で、純度も不十分でした。そこで、断片を 2 つのかたまりに分けて別々に組み立て、最後に合体させる「収束的」な方法に切り替えました。さらに、複数の反応を容器を替えずに連続して進める「ワンポット連結法」※8 と、硫黄のかわりにセレンを持つ特殊なアミノ酸を利用する手法を組み合わせました。この改良により収率は 2.7％まで向上し、最初の方法と比べて 30 倍以上となりました。こうして、天然とまったく同じアミノ酸配列を持つ PAF15Ub2 を、高純度で得ることに成功しました。

得られた PAF15Ub2 がきちんと機能するかを確かめたところ、DNMT1 のふたの部分（RFTS ドメイン）に非常に強く結合し（解離定数 0.14 nM）、ユビキチンが付いていない PAF15 はまったく結合しないことが分かりました。さらにこの結合に伴い、DNMT1 の DNA メチル化活性を大きく高めることも確認できました。

そこで、DNMT1、合成した PAF15Ub2、片側にだけ目印が付いた DNA を混ぜ合わせた複合体を、クライオ電子顕微鏡で観察しました。その結果、原子の配置が分かるほどの高い解像度で立体構造を把握することができ、ふたをしていた RFTS ドメインが DNMT1 本体から外れ、DNA が結合できる状態に変化していることが確かめられました。さらに、DNMT1 内部の「トグルポケット」※9 と呼ばれる部分にも、活性化したときに特徴的な構造変化が起きていました。これは、DNA 結合タンパク質であるヒストン H3 にユビキチンが 2 つ付いた場合に見られる活性化の様子とよく似ており、PAF15Ub2 もヒストン H3 と同じ仕組みで DNMT1 の安全装置を外していることが示されました。本研究は、化学合成でしか得られない天然構造のタンパク質を用いることで、長年推測にとどまっていた DNMT1 の活性化機構を原子レベルで明らかにしたものです。DNA メチル化が世代を超えて正確に受け継がれる仕組みの理解を深めるとともに、化学の力で生命現象の謎に迫る研究手法の有効性を示す成果といえます。

３．波及効果、今後の予定

この手法の応用先は、PAF15 に限りません。ユビキチンが複数取り付けられたタンパク質は細胞内に数多く存在し、その多くが同じ理由で解析の難しさを抱えています。本研究で確立した合成戦略は、そうしたタンパク質を均一な状態で手にするための一般的な道筋となり、これまで踏み込めなかった生命現象の解明につながることが期待されます。

一方で、課題も残されています。細胞の中で PAF15Ub2 は、DNA 複製を支える PCNA というタンパク質とともに働いていますが、DNMT1、PAF15Ub2、DNA、PCNA の 4 者が集まった複合体は壊れやすく、その立体構造はまだ得られていません。化学合成であれば、タンパク質の狙った位置に部品どうしをつなぎとめる仕掛けを組み込むことができます。今後はこの利点を生かして複合体を安定化させ、DNA 複製の現場で DNMT1 が働く姿そのものをとらえることを目指します。

４．研究プロジェクトについて

本研究は、科学研究費助成事業（科研費）学術変革領域 A「機動性ゲノム」（課題番号 25H01300、25H01301）、日本医療研究開発機構（AMED）（課題番号：JP22ama121009）」等の支援を受けて実施されました。また、クライオ電子顕微鏡による測定は、理化学研究所 生命機能科学研究センター（BDR）のクライオ電子顕微鏡施設において実施しました。

＜用語解説＞

※1　DNA メチル化：DNA を構成する塩基のひとつであるシトシンに、メチル基という小さな目印が付く化学変化。主に CpG 配列（シトシンとグアニンが並んだ場所）で起こり、その近くの遺伝子の働きを抑える役割を持つ。どの遺伝子を使うかという細胞ごとの使い分けを記録する仕組みの代表例であり、その異常はがんなどの疾患と関わることが知られている。

※2　DNMT1（DNA メチル化酵素 1）：DNA 複製後に、片側の鎖にだけ残ったメチル化の目印を手がかりとして、新しくつくられた側にも同じ目印を付け直す酵素。細胞分裂を経ても DNA メチル化のパターンが維持されるのは、この酵素の働きによる。

※3　RFTS ドメイン：DNMT1 を構成する部分のひとつ。普段は DNMT1 の触媒部位（DNA と結合して反応を行う部分）を覆い隠し、酵素の働きを抑える「ふた」として機能している。同時に、ユビキチンが付いた PAF15

やヒストン H3 を認識する役割も担う。

※4　PAF15：110 個のアミノ酸からなるタンパク質。特定の立体構造をとらない「天然変性タンパク質」で、DNA 複製を担う PCNA と結合して働く。DNA 複製の初期に 2 か所がユビキチン化され、DNMT1 を複製の現場へ呼び寄せる目印となる。

※5　ユビキチン：76 個のアミノ酸からなる小さなタンパク質。他のタンパク質に目印として取り付けられ、分解や細胞内の情報伝達などさまざまな過程を制御する。1 つだけ付く場合（モノユビキチン化）と、鎖状につながって付く場合がある。

※6　クライオ電子顕微鏡：試料を急速に凍らせ、電子線を当てて多数の分子を撮影し、その画像をコンピューターで重ね合わせることで立体構造を決定する手法。結晶をつくる必要がなく、大きく柔軟な分子複合体の構造を調べることができる。2017 年のノーベル化学賞の対象となった。

※7　タンパク質化学合成：細胞や酵素を使わず、化学反応によってタンパク質を人工的につくり上げる技術。アミノ酸を 1 個ずつつないだ短い断片を用意し、それらを「ネイティブケミカルライゲーション」と呼ばれる反応で結合させて大きなタンパク質を組み立てる。天然には存在しない修飾を狙った位置に正確に導入できる点が特長。

※8　ワンポット連結法：複数の連結反応を、途中で生成物を取り出して精製することなく、同じ容器の中で連続して進める手法。精製の回数を減らせるため、多数の断片からタンパク質を組み立てる際に収率の低下を抑えることができる。

※9　トグルポケット：DNMT1 の触媒部分にある小さなくぼみ。ここに入り込むアミノ酸が入れ替わることで、酵素が働く状態と働かない状態が切り替わる。活性のない状態では DNA 認識ヘリックスの側鎖が、活性化した状態では活性化ヘリックスの側鎖が、このくぼみを占める。

＜研究者のコメント＞

262 アミノ酸からなる PAF15Ub2 は、私たちがこれまでに合成した中で最大のタンパク質です。着手した当初は、本当にこれをきれいに作れるのかという疑問が常につきまといました。合成ルートを最適化した高橋さんと、研究を完成させた鈴木さんの努力のおかげで、合成をやり遂げることができました。この合成タンパク質が有田先生との共同研究で生命の謎解きに使えると分かったときの喜びは、今も忘れられません。

（林 剛介）

＜論文タイトルと著者＞

タイトル：Activation of DNMT1 by Chemically Synthesized Dual-monoubiquitinated PAF15 Protein（化学合成したジモノユビキチン化 PAF15 タンパク質による DNMT1 の活性化機構）

著　　者：Sae Suzuki, Yuya Takahashi, Amika Kikuchi, Satomi Kori, Fumika Yoshitomi, Hiroshi Murakami, Kyohei Arita, Gosuke Hayashi

掲 載 誌：*Advanced Science*　DOI：10.1002/advs.78636