

細胞内での蛋白-DNA及び蛋白-蛋白相互作用の同定によるヒトゲノム複製蛋白の解析

●藤田 雅俊

愛知県がんセンター研究所腫瘍ウイルス学部

背景と目的

複製動態を理解するためには、そのin vivoでの制御を知る必要がある。本研究の目的は、in vivoでの蛋白/染色体の相互作用を解析する方法論を確立し、ヒトDNA複製の細胞周期調節機構の研究を進めることである。

検討結果および考察

哺乳類体細胞における複製開始蛋白の核内構築とその細胞周期調節については、すでに仮説モデル図(添付図参照)を提唱しているが、本年度の結果も概ねこのモデルの妥当性を示唆する結果となった。in vivo cross-linkを用いた実験から、ORC/CDC6は非クロマチン核構造上に結合していることがより確かに示された。ORCに関しては、ORC1を含まないsubcomplexがあり、これらは核構造に結合していないことも示唆された。これらは複製以外で機能しているのかもしれない。ORC/CDC6がMCM6量体をG1期にクロマチンに結合させると考えられるが、これはORC/CDC6結合部位とは少し異なるnuclease感受性クロマチンだと考えられる。

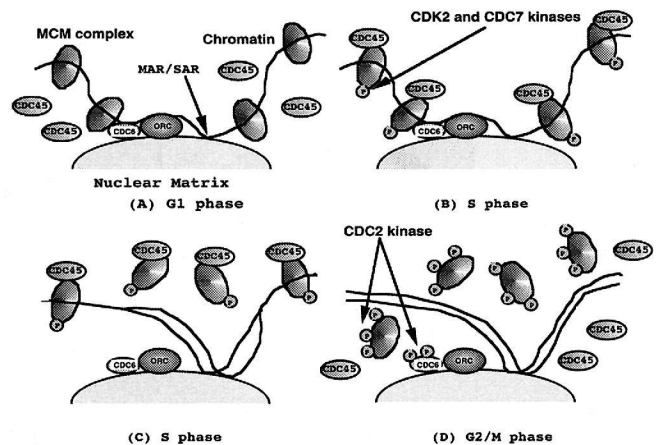
一方、我々は複製開始蛋白と相互作用している可能性がある蛋白として、RB/E2Fによる転写制御に関与していると考えられるクロマチンリモデリング複合体の一構成蛋白(核マトリックス蛋白でもある)を同定した。その研究は極めて興味深いと考えられたので、さらに進めることとした。機能解析のために、その蛋白の阻害物質を用いることを考え、その特異性を確実にするため、その阻害物質に抵抗性となる変異蛋白を作成し、発現する細胞株の樹立に成功した。今後これを用いて解析が進むものと期待している。これらのシス

テムを用いて、RB/E2Fによるcyclin EおよびAの転写制御での、この蛋白の役割も解析できると考えている。

ヒト細胞複製単位における複製開始蛋白の結合様式をクロマチン免疫沈降法で解析する計画については、MCMに関してはデータが得られつつあるが、最も重要であると考えているORC1蛋白に関しては、我々の抗体がクロマチン免疫沈降法にはやや適さないこともあり、まだ進捗していない。これに関してはtag付き蛋白を安定発現している細胞を樹立することが有用であると考え、その樹立に成功した。これを用いることで今後の解析が進むと期待している。

成果公表リスト

1. Arata, Y., Fujita, M., Ohtani, K., Kijima, S. and Kato, J.: Cdk2-dependent and independent pathways in E2F-mediated S phase induction. *J. Biol. Chem.* 275: 6337-6345, 2000.
2. Fujii, K., Yokoyama, N., Kiyono, T., Kuzushima, K., Homma, M., Nishiyama, Y., Fujita, M., and Tsurumi, T.: The Epstein-Barr virus pol catalytic subunit physically interacts with the BBLF4/BSLF1/BBLF2/3 complex. *J. Virol.* 74: 2550-2557, 2000.
3. Goto, H., Tomono, Y., Ajiro, K., Kosako, H., Fujita, M., Sakurai, M., Okigaki, T., Takahashi, T. and Inagaki, M.: Identification of a novel phosphorylation site on histone H3 coupled with mitotic chromosome condensation. *J. Biol. Chem.* 274: 25543-25549, 1999.
4. Fujita, M.: Cell cycle regulation of DNA replication initiation proteins in mammalian cells. *Frontiers in Bioscience* 4: 816-823, 1999.
5. Fujita, M., Yamada, C., Goto, H., Yokoyama, N., Kuzushima, K., Inagaki, M. and Tsurumi, T.: Cell cycle regulation of human CDC6 protein: intracellular localization, interaction with the human MCM complex and CDC2 kinase-mediated hyperphosphorylation. *J. Biol. Chem.* 274: 25927-25932, 1999.



ヒト細胞におけるDNA複製の細胞周期調節モデル