

高等真核生物の新規DNA複製因子の探索とin situ核内再構築

●水野 武

独立行政法人理化学研究所花岡細胞生理学研究室

〈研究の目的と進め方〉

高等真核生物の遺伝子は核内のreplication factoryと呼ばれる構造体に於いて複製される。しかし、巨大で複雑なゲノム構造を反映させながら核内の複製を検出する実験系は確立されておらず、複製研究の大きな障害となっている。本研究は新規複製関連因子、特に核骨格とのリンクに関わる因子をDNAポリメラーゼ結合因子として探索し、replication factoryに関わる蛋白質の同定と性質解析、及びin situでの再構築を目指す。培養細胞内の核を鋳型とした実験系の構築を通して、複雑な因子の集積である複製反応の再構築を試みる。

〈研究開始時の研究計画〉

染色体複製の中心に位置するDNAポリメラーゼを分子プローブとして、1) 酵母two-hybrid法により新規複製関連因子を系統的に探索する、2) クロマチン結合タンパク質分析法により、activeな複製前複合体や複製装置複合体に含まれる因子を絞り込む、3) 複製関連因子群の核内局在部位を共焦点レーザー顕微鏡により検出し、複製のタイミングや核内の領域との関係を明らかにする(図1)。

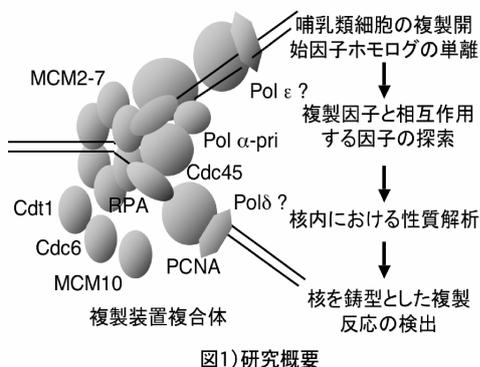


図1) 研究概要

〈研究期間の成果〉

DNAポリメラーゼ α 、 ϵ 、ORC、MCM、Cdc45を含めた20種類以上の複製因子間の相互作用を酵母two-hybrid法を用いて検討した。また、相互作用のネットワークを拡大する為に出芽酵母やアフリカツメカエル等で単離されてきた複製因子の哺乳類細胞ホモログのcDNAクローニングとその機能解析も試みた。出芽酵母のMcm10やORC、分裂酵母のCdt1、ツメカエルのgeminin等のマウスとヒトホモログを単離した。これらの因子は複製機構に於いて重要な役割を担うと考えられ、各因子の性状解析を詳細に検討し、以下の知見を得た。

1) Mcm10のヒトホモログをcDNAクローニングした。ヒトMcm10は874個のアミノ酸にコードされ、そのmRNA量はG1/S期に最大となった。酵母two-hybrid法により、ヒトMcm10がOrc2、Mcm2、Mcm6と相互作用することを見出した。さらに一過性過剰発現させたMcm10とOrc2が細胞核中でfociを形成する事を見出した。複製機構において重要な役割を担う新しい因子であることが示

唆された(文献9)。さらにマウスMcm10がORC、MCM4、MCM6、DNAポリメラーゼ α と相互作用する事を見出し、Mcm10を中心とした複製因子間の分子ネットワークが明らかとなった(図2)。

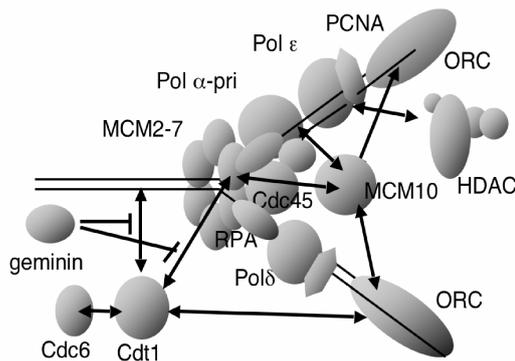


図2) 複製装置複合体中の分子間ネットワーク

2) 構築した様々なbaitを用いてマウス初期胚由来のcDNAライブラリーの検索を行った。機能未知因子に加え、核内アクチン結合タンパク質、クロマチンリモデリングタンパク質、転写装置複合体構成因子、等の多数の因子がポリメラーゼ、もしくは複製開始因子に結合するタンパク質として単離された。これらの複製因子候補群を系統的に絞り込み、機能解析を逐次展開した。個々の因子の機能解析の一例として、ヒストンデアセチラーゼ複合体の構成因子SAP18をDNAポリメラーゼ ϵ に結合する因子として同定した。DNAポリメラーゼ ϵ の第二サブユニットDPE2の中央領域がSAP18との相互作用に重要であることがin vitroの結合実験により判明した。さらにDPE2、SAP18に依存してヒストンデアセチラーゼ活性がDNA上に呼び込まれることを見出した。SIN3-SAP18複合体がS期において複製装置複合体と巨大な複合体を形成する事も見出した。DNAポリメラーゼを含む複製装置複合体とヒストンデアセチラーゼ複合体との相互作用を示唆する興味深い知見となり、replication factoryの全容理解に重要な手掛かりが得られた(文献7)。

3) ORCは複製前複合体の形成の足場として機能する重要な因子である。マウスORCサブユニットの機能解析を通じて、マウスORCには複数の選択的スプライシングによるバリエーションが存在することを見出した。Orc1には35アミノ酸、Orc2には28アミノ酸、Orc3には1アミノ酸が欠失したタンパク質が生じることが判明した。この中でOrc1のバリエーションOrc1Bに着目し、機能解析を進めた結果、Orc1Bは胸腺に特異的に発現すること、Orc1Bが欠失する領域には核移行シグナル、タンパク質分解に重要な領域、Cdk2によるリン酸化部位、等が集中し、ORCの機能を考える上で重要な領域であることが示された(図3、文献3)。

4) Cdt1はORC依存的にクロマチンへ結合し、その結合がMcm2-7のクロマチンへの結合に必要なことが示されてきた。また、gemininはCdt1と強固に結合し、Mcm

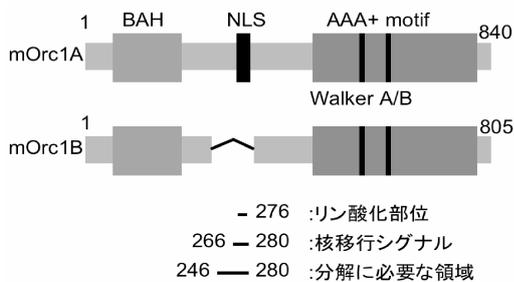


図3) Orc1のスプライシングバリエントが欠失する領域は核移行、リン酸化、分解に重要である

のクロマチンへの結合を阻害する。我々は、哺乳類細胞におけるCdt1-gemininシステムの分子機構を明らかにするため、マウスCdt1の機能解析を試みた。酵母two-hybrid法と共沈降実験による解析の結果、Cdt1は中央領域(177-380アミノ酸)を介してgemininと、C末端領域(407-477アミノ酸)を介してMcm6と相互作用することが示された。また、Orc2との相互作用も弱いながら検出された。一方、DNAセルロース及びゲルシフト法を用いた解析から、Cdt1のN末端領域(1-293アミノ酸)が配列、構造非特異的なDNA結合能を有することを見出した。さらに、geminin存在下ではCdt1とMcm6との相互作用及びCdt1のDNA結合活性が阻害された。以上の結果から、Cdt1が複製前複合体の中核を担うことが示唆されると共に、gemininによる再複製阻害の分子機構が示された。(文献6)。

5) Gemininは複製開始を負に制御する因子であると同時に、発生過程においても分化制御因子として機能することが示唆されている。一方、gemininは現在までに多細胞生物においてのみ同定されているが、線虫においては見出されていない。そこで、多細胞生物におけるgemininの機能をより理解するために、線虫gemininのcDNAクローニングと機能解析を試みた。線虫ゲノムデータベース中でショウジョウバエgemininと類似した遺伝子を検索し、180アミノ酸残基からなるタンパク質をコードする遺伝子を見出した。このタンパク質はC末端領域にgemininに特徴的なcoiled-coilモチーフを有していた。そこで、酵母two-hybrid法及び免疫共沈降実験によりタンパク質間相互作用を解析した結果、このタンパク質は線虫Cdt1だけでなくマウスCdt1とも結合し、Cdt1-Mcm6間の相互作用を阻害することが明らかとなった。これらの結果から、線虫においてもgemininが存在しており、gemininによるCdt1の阻害メカニズムは多細胞生物間で保存されていることが示唆された。次に、線虫gemininの生理機能を理解するためにRNAiによる解析を行った。GemininをノックダウンしたF1個体は生育可能であり、顕著に再複製した核は見出されなかった。しかし、約20%の個体が生殖細胞異常による不妊性を示した。さらに、不妊個体の腸細胞において顕著なchromosome bridgeが観察された(図4)。以上の結果から、線虫gemininは発生、分化のある特定の時期に働く細胞周期調節因子として機能することが示された(文献2)。

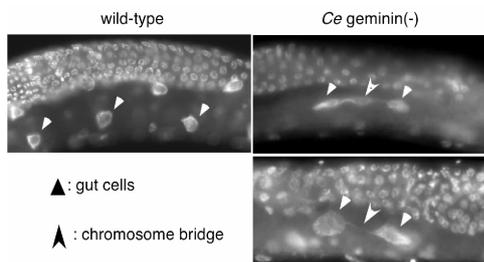


図4) 線虫gemininのRNAiによる細胞分裂異常

6) 真核生物の複製に働くヘリカーゼとして、Mcm2-7複合体が有力視されてきた。しかし、試験管内で検出されるヘリカーゼ活性はMcm4/6/7複合体のみであり、Mcm2-7複合体としてのヘリカーゼ活性は検出されていなかった。また、Mcm4/6/7の活性もSV40のT抗原や大腸菌のDnaB等他の複製ヘリカーゼに比べると極微弱なものであり、Mcm複合体が複製ヘリカーゼとして働くかどうか、解明されずにいた。マウスのMcm4/6/7の組換えタンパク質を用いてその生化学的性質を詳細に検討したところ、基質となるDNA側に重要な特異性が存在する事を見出した。即ち、チミンに富んだ配列が特異的にMcm4/6/7のヘリカーゼ活性を促進したのである。これまでに高等真核生物の複製開始点としての特異的な塩基配列や構造等是不明であった。チミンに富んだ配列がMcmヘリカーゼの活性促進効果を持つ事は、複製開始点の特異性を決定する一翼を担う可能性が示唆され、大変興味深い知見となった(文献5)。

7) 複製関連因子の機能解析を進める過程で、複製開始から伸長反応の中核を担うDNAポリメラーゼ α の機能解析にも取り組んだ。DNAポリメラーゼ α に特異的な阻害剤としてDehydroaltenuisinを同定した。Dehydroaltenuisinは魚類のPol. α , ラットPol. β , ウシPol. δ , ヒトPol. ϵ 等に対しては阻害効果を示さず、哺乳類細胞由来のPol. α に特異的な阻害剤であった。IC50はアフィディコリンよりも10倍以上低かった。Pol. α のコアドメインに結合し、template-primerとの結合を拮抗的に阻害した。 α 型ポリメラーゼの核内における機能分担を解明する上で強力なtoolとなることが期待された(文献8)。一方、DNAポリメラーゼ α の阻害効果が検出されたC18-飽和脂肪酸化合物(C18-SQMG)の細胞周期への影響を検討し、S期の進行を停めるメカニズムについて解析した(文献4)。さらに、マウスDNAポリメラーゼ α の温度感受性変異株tsFT20細胞では、半許容温度下でテロメア領域のクロマチン構造に変化が生じ、テロメア長の増加、及びRobertsonian chromosome fusionが観察されることを見出した(文献1)。以上のDNAポリメラーゼ α に関する知見は複製装置の形成機構解析の礎となり、今後の研究の進展に役立つと考えられた。

8) 以上の複製因子の解析を通じて、哺乳類細胞の複製関連因子の基本的性質が明らかとなった。さらに、複製関連因子間の分子ネットワークの全容が明らかとなりつつある。そして、複製装置複合体の形成、及び複製工場の構築にはMcm10が重要な鍵を握る分子であるとの結論に至った(図5)。そこで、マウスMcm10をEGFPと融合させ培養細胞内の局在部位を生細胞観察により解析した。PCNA-mRFPとの同時発現により、PCNAの形成する複製fociに先だってMcm10がfociを形成する分子はこれまでに報告されておらず、Mcm10が最初の例である。従って、Mcm10の局在部位の制御機構が複製工場の形成制御に直接繋がる事が強く示唆された。Mcm10はさまざまな複製因子と直接相互作用し、複製の開始から伸長反応に深く関わる事が示唆されてきた。Mcm10の細胞内局在の制御

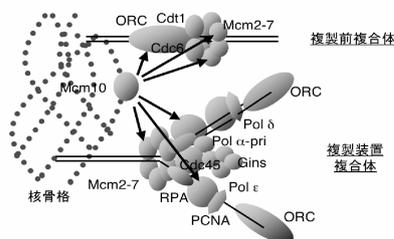


図5) Mcm10は複製前複合体と複製装置複合体の橋渡しをする

複製fociに先立ってfociを形成する分子はこれまでに報告されておらず、Mcm10が最初の例である。従って、Mcm10の局在部位の制御機構が複製工場の形成制御に直接繋がる事が強く示唆された。Mcm10はさまざまな複製因子と直接相互作用し、複製の開始から伸長反応に深く関わる事が示唆されてきた。Mcm10の細胞内局在の制御

を理解することで複製工場の解析が初めて可能になると考えられた。

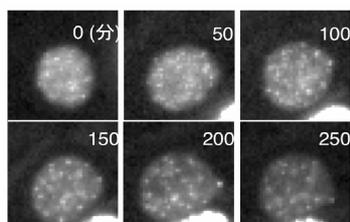


図6) GFP-Mcm10と mRFP1-PCNAの time-lapse 観察

〈国内外での成果の位置づけ〉

replication factoryに関わる解析はOxford Univ.のDr. Cook, SUNYのDr. Gilbert等が精力的に行ってきたが、Replication factoryに含まれる因子の系統的な分子レベルの解析は進んでいない。UC. BerkeleyのDr. Linnが複製後期にヘテロクロマチンにポリメラーゼ ϵ が局在することを2001年に報告したが、ポリメラーゼの局在部位に関しては未だに多くの点が不明である。Mcm2, Mcm3, Mcm4, Cdc45, プライマーゼ等が核内に共局在する測定系を樹立しているのは本研究が唯一であり、世界に先駆けた実験系の構築が可能となった。海外での学会に於いてもplatform presentationとして採択され、先駆的解析として評価されている(Cold Spring Harbor Laboratory Meeting,2003,2005, Salk Institute meeting, 2004)

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

当初、核内の局在部位を解析する為にセミインタクト細胞を用いた複製系の開発を予定していた。しかし、複製反応をモニターする為の因子を絞り込む事に労力を消費せざるを得なかった。最終的には複製工場の実体を握る因子としてMcm10が同定され、GFP融合タンパク質によるfociの形成を生細胞において検出する事に成功するに至っている。一方、核骨格とのリンクを分子レベルで明らかにする為にMcm10との相互作用を優先的に調べてきたが、未だ核骨格関連因子との直接的な相互作用を見出すに至っていない。Mcm10の局在部位を規定する因子を同定する事が複製工場の試験管内再構成の次なる鍵になると予測される。

〈今後の課題〉

複製fociに先行したMcm10のfoci形成機構の解明が最優先事項である。Mcm10のドメイン構造、細胞周期に呼応した翻訳後修飾、分子間相互作用等を徹底的に解析することで、複製工場の分子基盤が明らかになる。その上で、単離核、セミインタクト細胞核上でMcm10のfociを構築し、複製工場への変換を再構成する。replication factoryの形成機構、制御機構、複製機構との相関の分子レベルでの解明が期待される。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Mirai Nakamura, Akira Nabetani, Takeshi Mizuno, Fumio Hanaoka, and Fuyuki Ishikawa. (2005) Alterations of DNA and chromatin structures at telomeres, and genetic instability in mouse cells defective in DNA polymerase alpha. *Molecular and Cellular Biology*, 25. 11073-11088
2. Ken-ichiro Yanagi, Takeshi Mizuno, Takashi Tsuyama, Shusuke Tada, Yumi Iida, Asako Sugimoto, Toshihiko Eki, Takemi Enomoto, and Fumio Hanaoka. (2005) Caenorhabditis elegans geminin homologue participates in cell cycle regulation and germ line development. *The Journal of Biological Chemistry* 280. 19689-19694.
3. Yasuyuki Miyake, Takeshi Mizuno, Ken-ichiro Yanagi,

and Fumio Hanaoka. (2005) Novel splicing variant of mouse Orcl is deficient in nuclear translocation and resistant for proteasome-mediated degradation. *The Journal of Biological Chemistry*, 280. 12643-12652.

4. Chikako Murakami, Takeshi Mizuno, Fumio Hanaoka, Hiromi Yoshida, Kengo Sakaguchi, and Yoshiyuki Mizushina. (2004) Mechanism of cell cycle arrest by sulfoquinovosyl monoacylglycerol with a C18-saturated fatty acid (C18-SQMG). *Biochemical Pharmacology*, 67. 1373-1380.

5. Zhiying You, Yukio Ishimi, Takeshi Mizuno, Kaoru Sugawara, Fumio Hanaoka, and Hisao Masai. (2003) Thymine-rich single-stranded DNA sequences specifically activate mouse Mcm4/6/7 helicase on Y-fork and bubble-like substrates. *EMBO Journal*, 22. 6148-6160.

6. Ken-ichiro Yanagi, Takeshi Mizuno, Zhiying You, and Fumio Hanaoka. (2002) Mouse geminin inhibits not only Cdt1-MCM6 interactions but also a novel intrinsic Cdt1 DNA binding activity. *The Journal of Biological Chemistry*, 277. 40871-40880, [受付番号0303070924].

7. Masahito Wada, Hiroshi Miyazawa, Rui-Sheng Wang, Takeshi Mizuno, Akira Sato, Makoto Asashima, and Fumio Hanaoka. (2002) The second subunit of DNA polymerase epsilon, DPE2, interacts with SAP18 and recruits the Sin3 co-repressor protein to DNA. *Journal of Biochemistry*, 131. 307-311, [受付番号202250918].

8. Yoshiyuki Mizushina, Shinji Kamisuki, Takeshi Mizuno, Masaharu Takemura, Hitomi Asahara, Stuart Linn, Toyofumi Yamaguchi, Akio Matsukage, Fumio Hanaoka, Shonen Yoshida, Mineo Saneyoshi, Fumio Sugawara, and Kengo Sakaguchi. (2000) Dehydroaltenusin: A mammalian DNA polymerase alpha inhibitor. *The Journal of Biological Chemistry*, 275. 33957-33961, [受付番号202251030].

9. Masako Izumi, Ken-ichiro Yanagi, Takeshi Mizuno, Masayuki Yokoi, Yasuo Kawasaki, Kyeong-Yeop Moon, Jerard Hurwitz, Fumio Yatagai, and Fumio Hanaoka. (2000) The human homolog of Saccharomyces cerevisiae Mcm10 interacts with replication factors and dissociated from nuclease resistant nuclear structures in G2 phase. *Nucleic Acids Research*, 28. 4769-4777, [受付番号202250930].