

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06638

研究課題名(和文) DNA再複製の回避・修復に関するゲノム安定性維持機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanisms that prevent rereplication-induced genome instability

研究代表者

津山 崇 (TSUYAMA, Takashi)

東邦大学・薬学部・助教

研究者番号：70436096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNA複製制御機構の破綻により生じる再複製はゲノムの不安定化を引き起こす。研究代表者はこれまでにCdt1がDNA複製を抑制することでゲノム安定性維持に寄与する可能性を見出してきた。本研究では、ゲノムDNAの再複製によって誘発されるゲノム不安定化を回避するためのゲノム安定性維持機構の同定および、Cdt1によるDNA複製阻害機構の解明を目的とした。その結果、1) Cdt1が複製フォークの進行を阻害することで新生鎖伸長反応を抑制すること、2) この阻害作用にはCdt1の255-289アミノ酸領域が必要であること、3) Cdt1のライセンス化活性はDNA複製抑制作用には必要でないことを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Deregulation of DNA replication causes rereplication, which is involved in the genome instability. We have found that Cdt1 contributes to the maintenance of genome stability by suppressing DNA synthesis. In this study, we aimed to identify the pathway that prevents rereplication-induced genome instability, and to elucidate the mechanisms of replication inhibition by Cdt1. We found that 1) Cdt1 inhibits nascent strand elongation by suppressing the progression of replication forks, 2) amino acids 255-289 have a crucial role in Cdt1's inhibitory activity, and 3) Cdt1's licensing activity is not essential for replication inhibition.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 再複製 Cdt1 ゲノム安定性維持

1. 研究開始当初の背景

高等真核生物において、DNA複製は一回の細胞周期につき一度しか起こらないように厳密に制御されており、その制御機構の一つとしてDNA複製ライセンス化が存在する。ライセンス化は細胞周期のM期後期からG1期初期にかけて起こるが、その実態は染色体上の複製起点における複製前複合体(pre-RC)の構築である。染色体上の複製起点へORC、Cdc6、Cdt1が順次結合し、これらのタンパク質を介してDNAヘリカーゼであるMCM複合体がクロマチン上に導入されpre-RCの構築が完了する。この段階は種々の細胞周期調節機構による制御を受けている。高等真核生物では特にCdt1がDNA複製開始制御機構の主要な標的となっており、タンパク質分解やGemininとよばれる阻害因子との結合によってその機能が抑制される。これらの制御機構が破綻することによりゲノムDNAの再複製が生じる。再複製は、遺伝子の増幅やゲノム倍数性の増大など、がん細胞で見られるゲノム構造異常の一因となると考えられており、近年、がん化学療法の新たな標的としても注目されている。実際に、Cdt1の機能を亢進させることにより再複製が惹起されること、Cdt1の過剰発現が正常細胞をがん化させる一因となりうること、pre-RC構成因子の発現が多くのがん細胞で極めて高いことなどが指摘されている。

一方、再複製により生じたゲノム構造の異常に対する修復機構については、ゲノム不安定化を防ぐために重要な機構であると考えられるにも関わらず、いまだ不明な点が多く存在する。Cdt1の亢進によりDNA二本鎖切断が生じることから、再複製により複製フォークの停止と崩壊が起こり、停止または崩壊した複製フォークにおいてチェックポイント機構、相同組換え修復、非相同末端結合修復など種々のゲノム安定性維持機構が密接に連携して機能することが推測される。これに関連して、研究代表者によるこれまでのアフリカツメガエル卵抽出液を用いた解析から、以下のことが明らかとなっていた。

(1) Cdt1の組換えタンパク質を過剰に卵抽出液へ添加するとDNA複製が阻害される。

(2) Cdt1によるDNA複製の阻害はGemininを同時に添加することで抑制される。Cdt1との結合性は野生型と大きく変わらないがライセンス化阻害活性を欠失したGeminin変異体(マウスGemininの79-130アミノ酸領域)でもCdt1によるDNA複製阻害を抑制できる。

(3) Cdt1は再複製の開始に非依存的に、新生鎖伸長反応を阻害する。

Cdt1によるDNA複製の抑制は、再複製の進行を抑制することでゲノム安定性維持に寄与する可能性が考えられたが、その詳細なメ

カニズムについては不明であった。

2. 研究の目的

上記の学術的背景とこれまでの研究成果を踏まえ、本研究では再複製の回避・修復に関与するゲノム安定性維持経路の同定およびCdt1による複製フォーク停止機構との連携について解析することを目的とし、生化学的解析と、培養細胞を用いた遺伝学的解析や細胞生物学的解析を密接に組み合わせながら研究を進展させることを計画した。最終的にはこれらの解析から得られる成果を統合したうえで、DNA複製開始制御機構とゲノム安定性維持機構の連携の一端を分子レベルから解明し、その生理的な重要性について明確に提示することを目指した。

3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)卵抽出液は種々の細胞周期阻害剤や細胞周期で機能するタンパク質の導入などにより、DNA複製の諸段階を高精度に操作し、生化学的に解析することができる無細胞実験系を提供する。卵抽出液を用いた実験系は、多くのタンパク質が複雑に連携した細胞周期を無細胞的に再現できる唯一の実験系であり、細胞周期研究に大きく貢献してきた。卵抽出液中に精子核DNAを加えると核形成、DNA複製、染色体分配など細胞周期の一連の反応が引き起こされる。また、特異的抗体を用いることで特定のタンパク質を卵抽出液中から除去することができ、タンパク質レベルでのノックアウトが可能となる。各種の組換えタンパク質を卵抽出液へ添加したときのDNA複製への影響について、DNA合成量の測定、アルカリアガロースゲル電気泳動による新生DNA鎖の検出、イムノプロットングによるクロマチン結合タンパク質の検出などの手法を用いて解析した。

Xenopus laevis Cdt1をグルタチオン-S-転移酵素(GST)融合タンパク質として大腸菌で発現させ、グルタチオン-セファロースに結合させた。その後、結合タンパク質をPreScission Protease(GE Healthcare)と反応させることによりGST部分を切断し、Cdt1の精製画分を得た。種々の欠失変異体や点変異体Cdt1も同様の方法で発現、精製した。

*Xenopus laevis*の精子核DNAをビオチン化dATPと精製した種々の組換えタンパク質を含む卵抽出液へ添加し、反応させることでDNA複製をおこなわせた。DNA合成量を検出する場合には、反応停止後にRNase A+T1およびProteinase K処理をおこなってから、DNAをナイロン膜に固定化し、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにより検出、定量した。新生DNA鎖を検出する場合には、DNAをアルカリアガロースゲル電気泳動により分離後、ナイロン膜へ転写し、ペルオキ

シダーゼ標識ストレプトアビジンにより検出した。

(2) Cdt1 過剰発現による再複製誘発時にゲノム安定性維持に寄与する反応経路を特定するため、種々の遺伝子を破壊したニトリ DT40 細胞を用いて Cdt1 誘導発現株を作製し、複製ストレスとの関連を視点においた検討を目指した。ヒト *CDT1* cDNA が挿入された pTetOne ベクター (Clontech) を PCR を用いて線状化した後、ピューロマイシン耐性遺伝子とともにエレクトロポレーション法により DT40 細胞へ導入し、安定発現細胞株を得た。作製した細胞株に Cdt1 を強制発現させたときの細胞の動態をフローサイトメトリーでの細胞周期解析などの手段により評価検討した。

4. 研究成果

(1) Cdt1 による DNA 複製抑制作用の詳細な分子機構についての知見を得るため、*Xenopus* 卵抽出液に過剰量の Cdt1 組換えタンパク質を添加したときの新生鎖伸長反応をアルカリアガロースゲル電気泳動法により調べた。DNA ポリメラーゼ阻害剤であるアフィディコリンを添加した卵抽出液中で精子核 DNA をインキュベートした後に、単離したクロマチンを CDK インヒビターである p27 を添加した卵抽出液で再度反応させることで、再複製の開始が起こらない条件下で DNA 鎖伸長反応を再開させた。このとき過剰量の Cdt1 を添加することにより、新生鎖伸長反応の顕著な抑制が観察された。これは Cdt1 による新生鎖伸長反応の阻害が再複製の開始に非依存的に起こることを示している。また、Cdt1 の添加が一本鎖 DNA 結合タンパク質である RPA のクロマチン結合に与える影響について調べた。アフィディコリンを添加した卵抽出液で複製反応を進行させると、DNA ポリメラーゼによる DNA 鎖の合成がおこなわれないうまま DNA ヘリカーゼによる二本鎖 DNA の巻き戻しが進行するため、一本鎖 DNA の蓄積が起こり、RPA のクロマチン結合の増加が観察される。このとき、過剰量の Cdt1 を添加すると、アフィディコリンによって誘導される RPA のクロマチン上への蓄積が顕著に抑制されることを見出した。この結果は、Cdt1 が複製フォークの進行を阻害することで新生鎖伸長反応を抑制することを示唆している (図 1、発表論文 1)。

(2) Cdt1 による複製フォークの停止が、どの機能領域に基づくものかを明らかにすることで、原因となる活性またはタンパク質間相互作用の同定を目指した。*Xenopus* Cdt1 は全長 620 アミノ酸からなるタンパク質であり、193-447 アミノ酸領域に Geminin との結合領域が、447-620 アミノ酸領域に MCM 複合体との結合領域が存在する。また、243-620 アミノ酸領域が DNA 複製の開始に必要な領域

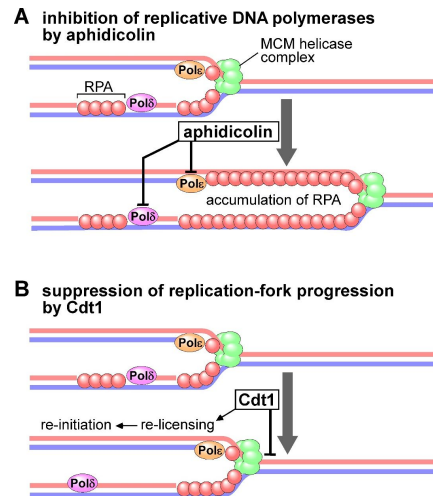


図 1. Cdt1 による DNA 複製抑制のモデル図

であることが知られている。DNA 複製の抑制に関与する Cdt1 の機能領域を同定する目的で、種々の N 末端および C 末端欠失変異体 Cdt1 を作製し、それらの DNA 複製に与える影響について *Xenopus* 卵抽出液を用いて調べた。その結果、N 末端側 254 アミノ酸を欠失した変異体でも全長の Cdt1 と同様の DNA 複製阻害作用が観察されたが、N 末端側 289 アミノ酸を欠失した場合には DNA 複製阻害作用が顕著に減弱した (図 2)。この結果は 255-289 アミノ酸領域に DNA 複製の抑制に必要な機能が存在することを示唆している。一方、C 末端側を欠失した場合には、欠失領域の長さに応じて DNA 複製抑制作用の減弱が観察され、明確に機能領域を同定することは出来なかった。

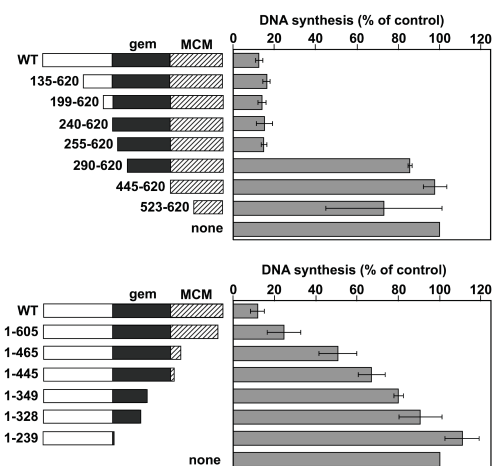


図 2. Cdt1 の各種欠失変異体の DNA 複製阻害効果

(3) Cdt1 のライセンス化活性が DNA 複製の抑制に関与するか調べるため、ライセンス化

活性が著しく減弱するアミノ酸点変異体 (R285A) を作製し、DNA 複製に与える影響について検討した。その結果、R285A も野生型 Cdt1 と同等の複製阻害活性を示すことを見出した。

(4) Cdt1 による複製阻害の抑制に関わる Geminin の機能領域の同定を目指して、*Xenopus* Geminin (全長 219 アミノ酸) の種々の C 末端欠失変異体 (1-141 アミノ酸、1-150 アミノ酸、1-160 アミノ酸、1-170 アミノ酸部分) を作製した。作製した欠失変異体を *Xenopus* 卵抽出液へ添加し DNA 複製への影響を調べたところ、C 末端側の欠失領域が長くなるにつれて DNA 複製阻害の程度が次第に減弱し、1-141 アミノ酸部分では明確な阻害作用が観察されなかった。今後、それぞれの欠失変異体が Cdt1 による DNA 複製の抑制に対して与える影響について検討する予定である。

(5) 培養細胞を用いた解析では、再複製誘発時に機能するゲノム安定性維持機構の同定を目的として、ニワトリ DT40 細胞でドキシサイクリンの添加で発現誘導可能な CDT1 の安定発現株の樹立をおこなった。野生型 DT40 細胞へヒト CDT1 cDNA を挿入した TetOne ベクターを導入し、安定発現株を得た。作製した細胞株にドキシサイクリンを添加して Cdt1 を強制発現させ、48 時間後にフローサイトメトリーにより細胞の DNA 含量を測定したところ、再複製によるものと思われる 4N 以上の DNA 含量を有する細胞集団の出現が観察された。今後、ゲノム安定性維持に関与する遺伝子を破壊した種々の DT40 細胞株を用いて CDT1 安定発現株の作製を進めていく予定である。また、CDT1 による DNA 複製抑制作用を培養細胞でも確認する目的で、DT40 細胞とヒト細胞を用いて種々の CDT1 変異体発現株の作製をおこなう予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Nakazaki Y, Tsuyama T, Seki M, Takahashi M, Enomoto T, Tada S. Excess Cdt1 inhibits nascent strand elongation by repressing the progression of replication forks in *Xenopus* egg extracts. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (査読有). vol. 470, pp405-410, 2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.01.028.

〔学会発表〕(計 4 件)

後藤勇貴、井堀康太、山内直之、森洋介、中崎祐太、津山崇、東祐太郎、多田周右: DNA 複製阻害タンパク質 Geminin の構造と機能に関する解析. 日本薬学会第 137 年会、2017 年 3 月 25 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

中崎祐太、津山崇、東祐太郎、高橋美樹子、多田周右: アフリカツメガエル卵抽出液を用いた DNA 複製における Cdt1 の新生鎖伸長抑制作用のメカニズムの解析. 第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 2 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

津山崇、中崎祐太、東祐太郎、多田周右: DNA 複製ライセンス化機構におけるタンパク質間相互作用の生化学的解析. 日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

中崎祐太、津山崇、東祐太郎、高橋美樹子、多田周右: 新生鎖伸長反応の抑制に関する Cdt1 の機能領域とその作用機序に関する検討. 日本薬学会第 136 年会、2016 年 3 月 29 日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者
津山 崇 (TSUYAMA, Takashi)
東邦大学・薬学部・助教
研究者番号: 70436096

(2) 研究分担者
無し ()

研究者番号:

(3) 連携研究者
無し ()

研究者番号：

(4)研究協力者
無し ()