

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06956

研究課題名(和文) ヒトORCのグアニン四重鎖結合活性の複製開始点形成における役割の解明

研究課題名(英文) The roles of the G-quadruplex-binding activity of human ORC in replication origin establishment

研究代表者

和賀 祥 (Waga, Shou)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：60222402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト複製開始因子ORCはグアニン四重鎖形成配列(G4モチーフ)をもつ1本鎖DNAやRNAに優先的に結合する活性を有する。その活性の生物学的意義を解明するため、同活性を有するORC1サブユニットの解析を行った。その結果、G4モチーフ1本鎖DNA結合活性を低下させたORC1は細胞核内の局在が異常になること、同活性をもつORC1のN末端側領域にDNA超らせん誘導活性をもつ領域も存在することが明らかになった。この結果は、ORCのG4モチーフ1本鎖DNA結合活性は、ORCの適正なクロマチン結合に関わり、さらに複製開始点のDNA構造変化に関わる可能性を示す。

研究成果の概要(英文)：Human ORC, one of the replication initiation proteins, exhibits preferential binding to G-quadruplex (G4)-formable single-stranded DNA (ssDNA) or RNA. To elucidate the biological roles of this activity, we analyzed the function of the human ORC1 subunit, which is known to possess the activity. We have found that the mutated ORC1, in which G4-motif ssDNA binding activity is reduced, exhibits abnormal localization in human cell nuclei and also that the N-terminal region, in which G4-motif ssDNA binding domains exist, has DNA supercoiling activity. These suggest that G4-motif ssDNA binding activity may be required for proper chromatin binding of ORC and involved in some structural changes of origin DNA during replication initiation.

研究分野：DNA複製の分子生物学

キーワード：DNA複製 ORC グアニン四重鎖

### 1. 研究開始当初の背景

DNA複製の一連の過程は、複製開始点への特定の複製開始タンパク質の結合から始まる。例えば、大腸菌では、DnaAというタンパク質が複製開始点である oriC 領域に、塩基配列特異的に結合して、複製開始が始まる。また真核生物では、DnaA と同等の働きをするタンパク質として origin recognition complex (ORC)が存在し、この ORC が複製開始点に結合して、DNA複製の一連の過程が始まる。このように複製開始点とそれに結合する複製開始タンパク質からなる DNA複製開始に関わる基本的な仕組みは生物種間で保存されている。

しかし、複製開始タンパク質による複製開始点の認識の仕組みは生物種間で比べてみると、大きな違いが見られる。例えば、出芽酵母の ORC は、大腸菌 DnaA と同様に、複製開始点に塩基配列特異的に結合する。一方、ヒトなどの高等真核生物における複製開始タンパク質の複製開始点への結合は、複製開始点を規定する共通塩基配列はないため、出芽酵母や大腸菌での仕組みとは異なる仕組みで行われると考えられている。

近年、ヒトの複製開始点に関して重要な発見がなされた。フランスの研究グループによって、ヒトゲノムには約25万箇所の複製開始点となりうる箇所があり、そのうちの約1割が実際に複製開始点となっていること、さらに、その多くにグアニン四重鎖(G4)を形成しうる G-rich な配列(G4モチーフ)が存在することがあることが報告された。この G4モチーフは複製開始点を規定する配列という訳ではないが、高等真核生物の複製開始点での仕組みを重要な役割を持つものとして注文される。この G4モチーフと関連して、我々は、ヒト ORC は G4モチーフをもつ一本鎖 DNA や RNA に優先的に結合する活性をもつことを見出した。さらに、限定された複製開始点の解析ではあるが、複製開始点にある G4モチーフの複製開始における重要性を示す結果も他のグループから報告された。

このように、高等真核生物の複製開始点の多くに見られる G4モチーフと複製開始との関係に注目されるようになった。

これまでの我々のヒト ORC の解析から、少なくとも ORC1 サブユニットが G4モチーフ一本鎖 DNA/RNA 結合活性を有することが見出された。さらに、ORC1 の N 末端側領域に同活性を有する、少なくとも2つのドメイン(ドメイン A : 51-250 領域とドメイン B : 413-511 領域)が存在することが見出された。さらに、ORC の G4モチーフ一本鎖 DNA 結合活性の特異性を検討した結果、テロメアリピート配列からなる G4モチーフに比べて、c-myc プロモーターにある G4モチーフをもつ一本鎖 DNA に対し、より強く ORC は結合したことから、G4モチーフの中にも ORC の結合特異性があることが示された。

### 2. 研究の目的

本研究の目標は、どのような仕組みによって複製開始点がヒトゲノムの特定の領域に規定されるのかを明らかにすることである。特に、その仕組みの中で、複製開始点にある G4モチーフの果たす役割に注目する。本研究では、ヒト ORC の G4モチーフ(あるいは G4構造)への選択的な結合が、ヒト複製開始点の確立に直接的に関与するという仮説を立て、その検証を行う。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト ORC1 サブユニットの G4モチーフ結合ドメインと G4モチーフ一本鎖 DNA との複合体の構造解析

ORC1 の N 末端側にある2つの結合ドメインに着目し、そのドメインを含むポリペプチドと G4モチーフ一本鎖 DNA との複合体に関する NMR による構造解析を進めることとした。その解析に先立ち、各ドメインを含むポリペプチドの精製法の確率、解析で使用する一本鎖 DNA の選定、さらに、複合体形成条件の最適化を進めた。

なお、この構造解析には片平博士(京都大学エネルギー理工学研究所)に連携研究者として参加いただいた。

(2) ORC1 ドメインの細胞への導入実験による、ORC1 の G4モチーフ結合活性の役割の解析

ORC1 のドメイン A とドメイン B を含む N 末端側領域をヒト培養細胞で発現させ、その時の細胞の BrdU の取り込みを調べることによって、ORC1 N 末端側領域発現が DNA 複製活性に及ぼす影響を調べた。

(3) 変異 ORC1 の細胞への導入実験による、ORC1 の G4モチーフ結合活性の役割の解析

ORC1 の G4モチーフ結合活性を担うドメイン A と B にアミノ酸置換変異を導入して、同活性を低下させた変異 ORC1 を作成した。その変異 ORC1 を細胞で発現させ、変異 ORC1 の細胞内局在について野生型 ORC1 との比較解析を行った。

なお、上記の変異 ORC1 の作製の際、導入するアミノ酸置換変異の選択において、連携研究者である由良博士(お茶の水女子大学)に協力をいただいた。

(4) R ループ形成が ORC の DNA 結合に及ぼす影響の in vitro 解析

G4構造が誘導される要因の一つとして、G-rich 領域での R ループ形成があげられる。そこで、磁気ビーズに固定化した DNA (G4モチーフを含む)で転写を行い、その後、精製 ORC を加えて ORC の DNA への結合を調べた。その際、転写の有無によって、ORC の DNA への結合量に変化がみられるかを調べた。

(5) RNaseHI の発現に伴う ORC1 の細胞内局在の変化の解析

ヒト細胞に、活性型あるいは不活性型（ただし R ループ結合活性はある）の RNaseHI と蛍光タンパク質融合 ORC1 を共発現させ、RNaseHI の発現が ORC1 の細胞内局在に及ぼす影響を調べた。なお、活性 RNaseHI は R ループの破壊、そして本研究で用いた不活性型 RNaseHI は R ループの安定化を引き起こすことが期待された。

#### 4. 研究成果

(1) ヒト ORC1 の G4 モチーフ一本鎖 DNA 結合活性ドメインと一本鎖 DNA との複合体の NMR による構造解析

G4 モチーフ一本鎖 DNA 結合活性ドメインを含むポリペプチドと一本鎖 DNA プロープとの複合体形成における条件の検討を進め、複合体形成の最適化はほぼ達成できた。しかし、用いたポリペプチドの構造不安定性のため、構造決定に至る解析データを得ることはできなかったが、複合体の中で G4 構造が保持されていることが示唆された。この結果は、ORC の G4 モチーフ一本鎖への優先的な結合を理解する上での重要な知見である。

(2) ORC1 N 末端側領域の過剰発現が細胞の DNA 複製活性に及ぼす影響

G4 モチーフ結合活性ドメインを含む ORC1 N 末端側領域をヒト培養細胞で発現させ、その細胞での BrdU の取り込みを調べた。その結果、ORC1 の同領域の発現に伴い、BrdU ポジティブの細胞が減少することが示された。この解析は一過性の発現を利用して行われたため、DNA 複製活性の低下を引き起こす要因の特定には至らなかったが、DNA 複製活性の低下は ORC1 の N 末端側領域の G4 モチーフ結合活性による可能性も考えられ、興味深い結果であると判断している。

(3) G4 モチーフ結合活性を低下させるアミノ酸置換を導入した変異 ORC の細胞内局在の変化

ORC1 のドメイン A とドメイン B それぞれに、G4 モチーフ結合活性を低下させるアミノ酸置換を導入した変異 ORC1 を作製した。そして、その変異 ORC1 ならびに野生型 ORC1 をヒト細胞で発現させ、その細胞内局在を調べた。その結果、野生型 ORC1 は典型的なヘテロクロマチン局在のパターンを示したのに対し、変異 ORC1 は細胞核内に比較的均一に散在するパターンを示すという際立った違いが観察された。後者の局在パターンは、N 末端側領域のおよそ半分の領域を欠如した ORC1 の局在パターンと類似したことから、ORC1 の N 末端側領域は、ORC1 の正常な細胞核内の局在に関わると推定される。さらに、この変異導入に伴う ORC1 局在の変化は、G4 モチーフ結合活性が、ORC1 の正常な局在に関わる可能性を示唆する。

(4) 転写を経験した DNA 鋳型への ORC の結合

の解析

遺伝子のプロモーター領域に見られる CpG アイランドを含む領域に複製開始点が形成される傾向がある。さらに、CpG アイランドのような G-rich 領域が転写されると、R ループが形成した際に G4 構造が形成される可能性がある。そこで、実際に遺伝子近傍に形成される複製開始点に着目し、この複製開始点を含む DNA を鋳型に転写を行い、その時の ORC の DNA 結合に及ぼす影響を調べた。

磁気ビーズに固定化した DNA を鋳型に用いて転写を行い、その後、精製 ORC を加え、DNA に結合した ORC 量を調べたところ、転写後、ビーズを洗浄したにも関わらず、転写をした場合に DNA への ORC の結合量が増加する傾向がみられた。この結果は、転写によって ORC がより強く結合するような DNA の構造に変化する可能性を示唆する。RNaseHI 処理などを含めた解析による検証はできなかったが、検出された ORC の結合増加が R ループ形成による可能性も考えられる。

(5) RNaseHI の発現が ORC1 の局在に及ぼす影響

ORC1 の細胞内局在に R ループが関与しているかを明らかにするために、ヒト細胞に RNaseHI を発現させ、その時の mCherry-ORC1 の細胞核内の局在に及ぼす影響を調べた。その結果、活性型 RNaseHI を発現させた際には、ほとんど影響は観察されなかったが、不活性型 RNaseHI を発現させた場合は、ORC1 の局在に変化が観察された。ここで利用した不活性型 RNaseHI は、R ループを特異的に結合する活性を保持している。そのため、不活性型 RNaseHI の R ループへの結合が、ORC の R ループ領域における G4 構造への結合を阻害した可能性も考えられた。今後、この可能性を検証する解析が必要であると考えている。

以上のように、本研究によって、ヒト ORC1 の G4 モチーフ結合活性ならびにその活性を持つ N 末端側領域の機能に関する重要な知見を得ることができた。特に、本研究によって、ORC1 の N 末端側領域が ORC の細胞核内の正常な局在に重要であることが明らかになったことは、大きな成果と考える。今後、同領域のゲノムでの結合領域を同定する解析が必要であると考えている。

#### 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)

Magda Budzowska, Thomas G.W. Graham, Alexandra Sobock, Shou Waga, Johannes C. Walter. Regulation of the Rev1-Pol zeta complex during bypass of a DNA interstrand crosslink. EMBO J. 34, 1971-1985 (2015) 査読あり

〔学会発表〕(計 10 件)

石川友紀、由良敬、小布施力史、和賀祥: ヒトおよびアフリカツメガエル ORCA と ORC との結合に関する解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017 年)  
青木麻央、島田真衣、斎藤靖史、和賀祥: 複製開始因子 / 転写抑制因子 AIF-C2 の転写依存的な DNA 結合の解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017 年)  
中塚萌、堀之内遥香、溝部彩子、由良敬、和賀祥: ヒト ORC1 の N 末端側領域の機能解析. 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (2017 年)

Shou Waga, Moe Nakatsuka, Haruka Horinouchi, Shoko Hoshina: Further characterization of the binding of human ORC to G-quadruplex-formable single-stranded DNA. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (2017 年)

女部田寛子、保科祥子、寺西帆奈美、山崎翠、橋本麻美子、太田黒恵美、由良敬、和賀祥: ヒト ORC1 サブユニットの N 末端側領域の機能解析. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年)

石川友紀、及川郁子、坂井実華、由良敬、小布施力史、和賀祥: ヒト ORC2 における ORCA 結合領域の同定. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年)

保科祥子、和賀祥: アミノ末端側領域を欠いた ORC1 サブユニットを含む変異 ORC の一本鎖 DNA 結合活性の解析. 第 39 回日本分子生物学会年会 (2016 年)

山崎翠、保科祥子、弓井絵利夏、和賀祥: ヒト ORC の DNA 結合に及ぼす転写の影響の in vitro 解析. 第 38 回日本分子生物学会年会 (2015 年)

塚澤真衣、中島ゆいな、星野宏味、斎藤靖史、堤賢一、和賀祥: 複製開始因子 / 転写抑制因子 AIF-C2 の DNA 結合における転写の影響. 第 38 回日本分子生物学会年会 (2015 年)

和賀祥、山崎翠、塚澤真衣、鈴木香菜、女部田寛子、寺西帆奈美、太田黒恵美、弓井絵利夏、由良敬、保科祥子: 動物細胞の DNA 複製開始点の確立機構の解明に向けて. 第 38 回日本分子生物学会年会 (2015 年)

〔その他〕

ホームページ等

<http://mcm-www.jwu.ac.jp/~waga/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和賀 祥 (WAGA, Shou)

日本女子大学・理学部・教授

(2) 連携研究者

片平 正人 (KATAHIRA, Masato)  
京都大学・エネルギー理工学研究所・教授  
研究者番号: 7 0 2 1 1 8 4 4

由良 敬 (YURA, Kei)  
お茶の水女子大学・大学院人間文化創成科学研究科・教授  
研究者番号: 5 0 2 5 2 2 2 6