

平成 29 年 4 月 23 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18504

研究課題名(和文)複製開始高次複合体のDNA認識と機能スイッチングの構造特性及び制御動態

研究課題名(英文)Structure-function relationship of a high-order replication initiator complex in DNA recognition and functional switching

研究代表者

川上 広宣(Kawakami, Hironori)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：50403952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は出芽酵母の染色体複製起点DNAを特異的に認識するORC複合体に着目し、変異型ORCの高速精製法を確立することで、従来実現困難だったアミノ酸残基レベルでの体系的機能構造解析を容易に実現可能とした。実際に、複製起点の走査・探索・認識に関わる機能構造をORC内に複数特定し、複数の機能構造からなる高度な反応素過程の一端が明らかとなった。また、この手法をORCの複数のサブユニットやパラログに発展的に展開した。更に、このうちの特定のアミノ酸残基を介した相互作用ネットワークの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The origin recognition complex, an initiator of eukaryotic DNA replication, was extensively analyzed in vitro and in vivo. Certain structure-function relationships were identified and a novel multifaceted DNA recognition mechanism was proposed.

研究分野：生物学

キーワード：染色体複製 ORC 機能構造解析 DNA結合 制御因子

1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA の特定領域に種々の蛋白質が次々と結合し、高次複合体を形成することは、細胞内の普遍的なプロセスである。このうち、染色体上の複製起点 DNA に作られる高次複合体は、細胞周期の制御の要である。代表者は、真核生物において複製起点 DNA と蛋白質との結合メカニズムという根本的問題すら未解明なことに着目し、これまでに発芽酵母染色体 DNA 上の複製起点 DNA を認識する ORC とアクセサリ蛋白質 Cdc6 を含む超高次複合体の独自の構造モデルを提唱している(Structure 2012; Nat. Struct. Mol. Biol. 2013)。構造情報が明らかになってきた一方、複製起点の認識機構についての実験的証拠がこれまで皆無であった。また、ORC 機能がどのように制御されるかについての構造的基盤やその動態についての知見も無かった。

2. 研究の目的

本研究では、まず、ORC のアミノ酸残基レベルでの機能構造解析を実現し、実際に複製起点の認識機構についての実験的証拠を得ることを第 1 の目的とする。また、ORC 機能がどのように制御されるかについての構造的基盤やその動態について明らかにすることを第 2 の目的とする。

3. 研究の方法

(1) ORC 簡便精製法の評価

バキュロウイルスや発芽酵母株を用いない発現システムを用い、更に伝統的なカラム分画を最小限にした ORC 高速精製システム(未発表)の有用性を評価するため、ORC を実際に精製し、複製起点 DNA に依存して ATPase 活性が抑制されることを指標に判断する。

(2) ORC 6 量体の機能構造解析

代表者独自の構造情報(Structure 2012; Nat. Struct. Mol. Biol. 2013)や情報解析を元に変異導入部位を決定し、部位特異的変異導入法を活用した発芽酵母の遺伝学実験や FACS 解析・クロマチン免疫沈降法(ChAP 法)を組み合わせ、細胞内の表現型を追究する。部位特異的変異導入法を用いて ORC 発現プラスミドに簡便に変異を導入し、変異 ORC を多量生産する。上述の ORC 簡便精製法を用いて高

速精製する。ATP 結合能、ATPase 結合能、DNA 結合能を用いて、表現型を評価する。重要なモチーフが見出された場合は、必要に応じてそのモチーフを含む部分ペプチドを精製し、試験管内における DNA 結合能を直接的に調べる。当初は最大サブユニット Orc1 の解析からはじめ、その後、他のサブユニットや Cdc6 に発展させる。

(3) 細胞内制御経路の探索・解析

細胞が致死になるような強い表現型が生じる場合は、この表現型を利用してマルチコピーサプレッサーを分離し、ORC 機能を中心とした細胞周期制御への関連を調べる。

4. 研究成果

まず、上述のような機能構造解析を実現するため、以前から開発していた体系的機能構造解析に適した ORC 簡便精製法を論文発表した。従来の ORC 精製法は、多量生産用のバキュロウイルスの構築・増幅・感染あるいは発芽酵母株の構築といった律速過程や、多段階の伝統的なカラム分画を含み、変異 ORC を多数精製して解析することが事実上困難であった。また、発芽酵母を用いた変異 ORC の発現システムにおいては、内在性の野生型 ORC の共精製が避けられないため、野生型 ORC を特異的に除去する工程も律速となった。一方、本手法は、His タグ融合型 ORC 発現プラスミドに部位特異的変異を導入し、哺乳動物細胞へトランスフェクトするため、上述の律速過程を多数カットすることができた。トランスフェクションは高効率であり、野生型 ORC の混入も無い。野生型 ORC と 3 種類の変異型 ORC に本手法を適用し、精製標品が想定通りの活性を示すことを見出した(Front. Microbiol. 2016)。

また、この簡便精製法と従来独自に見出していた構造モデルを実際に組み合わせ、ORC の機能構造解析を論文発表した。まず、独自に見出していた、細胞増殖に必須な *orc1* 変異を子細に追究した。変異アミノ酸残基は最大サブユニット Orc1 上の塩基性パッチ領域に位置し、このパッチは従来 DNA 結合ドメインと予想されていたモチーフと異なる。まずこのパッチが細胞内における Orc1 と代表的な複製起点との結合に必須なことを見出した。上述の高速精製法を用いて変異 ORC 6 量体を精製・解析し、

実際に ORC 6 量体が複製起点と結合できないことを見出した。このパッチを含む部分ペプチドは試験管内において低親和性ながらも単独で複製起点を認識し、パッチ内の機能性残基はこのペプチドの低親和性結合の特異性を高めた。即ち、ORC が複製起点と結合する際は、Orc1 塩基性パッチを介した複製起点の走査探索過程の後、他のドメイン・サブユニットと協調した高親和性結合に転ずると示唆される。情報解析から真核生物に特有の共通原理が示唆されたため、この塩基性パッチを eukaryotic origin sensor (EOS) と命名した (Sci. Rep. 2015)。なお、本研究を含めた成果により、生化学会九州支部学術奨励賞を受賞した。

EOS 欠損型の ORC は複製起点と結合できないのに対し、前述の EOS を含む部分ペプチドは EOS 変異を導入しても非特異的に DNA と結合する。すなわち、EOS の実体はあくまで複製起点の認識に関わるモチーフであり、DNA の走査探索過程は別のモチーフを介していることが示唆される。そこで上述の部分ペプチドの更なる体系的欠失解析と部位特異的変異導入を行い、非特異的にすら DNA と相互作用できなくなるような新たな変異を同定した。また、この部位が細胞内での Orc1 機能に必要な機能を有することを見出した。これらの部位が EOS と共同して機能することで複製起点の特異的な走査・探索・認識がなされると思われる (国際学会等で発表済み)。

また、EOS ならびに EOS 近傍領域とは異なる DNA 結合モチーフを見出すため、Orc1 の計 13 アミノ酸をカバーする機能構造解析を行った。その結果、細胞内の Orc1 機能に必要な新たな機能構造を見出した。変異蛋白質は細胞内で安定に存在したため、変異 Orc1 蛋白質の分解ではなく特異的機能欠損による表現型と示唆された。上述の高速精製法を用いて変異 ORC 6 量体を精製・解析し、ORC 機能が異常となることを見出した (学会発表済み)。

この他、ORC サブユニットならびにパラログ Cdc6 の機能構造解析を更に高速化するシステムを確立し、このシステムを利用して解析対象を Orc1 以外にも広げた。その結果、実際に細胞増殖に必要な領域を Orc1 以外にも特定した。また細胞内において EOS を必要としない ORC 結合領域の同定に成功し、細胞内における ORC 機能構造

の高度な使い分けが予想された (学会発表済み)。更に、ORC 制御因子の探索を遺伝学・生化学的に進め、想定外のパスウェイに関わる因子を同定した (学会発表済み)。

以上をまとめると、本研究によって出芽酵母 ORC の機能構造解析を迅速に行う手法が確立し、真核生物における複製起点の認識機構についての直接的な実験的証拠を得ることができた。これにより、ORC の複数の機能構造が協働したメカニズムであることが示唆された。また、既存の ORC 機能とは無関係と推定される重要な機能構造や、ORC 制御因子の探索・同定にも至った。これらの成果は、ORC の複製起点 DNA と蛋白質との結合メカニズムという根本的問題の理解において重要な内容を含むことに加え、機能制御における構造的基盤やその動態の理解をもたらすと思われる。以上を踏まえ、当初の目的を十分達成することが出来たと判断した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kawakami, H. (co-corresponding author), Ohashi, E., Tsurimoto, T., and Katayama, T. (2016) Rapid purification and characterization of mutant origin recognition complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front. Microbiol.*, 7, 521 (9 pages) 査読有り doi: 10.3389/fmicb.2016.00521

Kawakami, H. (co-corresponding author), Ohashi, E., Kanamoto, S., Tsurimoto, T., and Katayama, T. (2015) Specific binding of eukaryotic ORC to DNA replication origins depends on highly conserved basic residues. *Sci. Rep.* 5, 14929 (14 pages) 査読有り doi: 10.1038/srep14929

〔学会発表〕(計 11 件)

川上 広宣, 千々布 壮陽, 金本 祥太, 大橋 英治, 釣本 敏樹, 片山 勉, 複製起点認識蛋白質 ORC の一本鎖 DNA 結合能と生物ドメインを超えた保存性, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016 年 11 月 30 日 ~ 12 月 2 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

千々布 壮陽, 金本 祥太, 川上 広宣, 片山 勉, 真正細菌オーソログとの配列比較に基づく真核生物 ORC および Cdc6 の一

本鎖 DNA 結合モチーフの探索、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日～12 月 2 日、パシフィコ横浜(横浜市)

Hironori Kawakami, Takeaki Chichibu, Eiji Ohashi, Shota Kanamoto, Toshiki Tsurimoto, and Tsutomu Katayama. Multifaceted approach of Orc1 to DNA is the primary determinant of specific recognition of replication origins by ORC. The 10th 3R symposium, November 13–17, 2016, Hotel Ichibata (Matsue, Japan).

川上 広宣、千々布 壮陽、金本 祥太、川畑 健太、大橋 英治、釣本 敏樹、片山 勉、真核生物の複製起点認識蛋白質 ORC による多角的な DNA 探索認識機構、第 89 回日本生化学会大会、2016 年 9 月 25～27 日、東北大学川内北キャンパス(仙台市)

川畑 健太、千々布 壮陽、川上 広宣、片山 勉、真核生物の複製起点認識に必須な ORC 複合体における DNA 結合性モチーフ様配列の探索と変異体解析、第 13 回 21 世紀大腸菌研究会、2016 年 6 月 2～3 日、グリーンピア南阿蘇(熊本県南阿蘇村)

川上 広宣、大橋 英治、金本 祥太、釣本 敏樹、片山 勉、出芽酵母 ORC 複合体による染色体認識機構とその多様性、平成 28 年度日本生化学会九州支部例会、2016 年 5 月 14～15 日、鹿児島大学都元キャンパス(鹿児島市)

川西 智人、川上 広宣、片山 勉、ゲノミクス的アプローチによる出芽酵母 ORC 制御因子の探索、BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会、2015 年 12 月 1～4 日、神戸ポートアイランド(神戸市)

川上 広宣、大橋 英治、金本 祥太、釣本 敏樹、片山 勉、ORC による DNA 認識機構とその多様性、第 23 回 DNA 複製・組換え修復ワークショップ、2015 年 10 月 19～21 日、焼津グランドホテル(焼津市)

川上 広宣、川西 智人、大橋 英治、金本 祥太、釣本 敏樹、片山 勉、出芽酵母染

色体における複製起点の認識機構と制御ネットワーク解明の試み、日本遺伝学会第 87 回大会ワークショップ WS5「多角的アプローチによるゲノム維持継承研究の最前線」(世話人:古郡麻子、川上広宣)、2015 年 9 月 24～26 日、東北大学川内北キャンパス(仙台市)

川上 広宣、大橋 英治、釣本 敏樹、片山 勉、出芽酵母 ORC の特異な染色体認識様式、平成 27 年度日本生化学会九州支部例会、2015 年 5 月 16～17 日、九州大学箱崎キャンパス(福岡市)

川上 広宣、染色体 DNA 複製開始複合体の分子機構の解明、平成 27 年度日本生化学会九州支部例会、2015 年 5 月 16～17 日、九州大学箱崎キャンパス(福岡市)(学術奨励賞受賞特別講演)

{図書}(計 0 件)

{産業財産権}

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

{その他}

ホームページ等

<http://bunsei.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

川上 広宣 (KAWAKAMI, Hironori)
九州大学・大学院薬学研究院・助教
研究者番号: 50403952

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし

(4)研究協力者

該当なし