

平成 22 年 5 月 27 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17080001

研究課題名（和文） 複製停止複合体による S 期と M 期の連携機構の解明

研究課題名（英文） Links Between S-phase and M-phase Mediated by Fork Protection Complex

研究代表者

白髭 克彦 (SHIRHIGE KATSUHIKO)

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・連携教授

研究者番号：90273854

研究成果の概要（和文）：

複製チェックポイントシグナル伝達系はゲノム情報の恒常性維持のために必須の機構である。本研究では複製チェックポイントのメディエーターとしての役割を持つ Tof1、Mrc1、Csm3 による 3 者複合体が DNA 2 本鎖の巻き戻し酵素であるヘリカーゼと DNA 合成酵素であるポリメラーゼを連結し、複製装置全体の構造を維持しつつ、複製過程を監視していることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

DNA replication checkpoint plays a crucial role for the maintenance of genome integrity. With the help of research grant, we have found that replication checkpoint mediator complex (that consists of Tof1, Mrc1, and Csm3) is a key linker between DNA polymerase and helicase. This function as a linker is important for proper mediator function to sense different types of replication stress for the activation of the DNA replication checkpoint and protection of the replisome.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	12,700,000	0	12,700,000
2006 年度	12,700,000	0	12,700,000
2007 年度	17,000,000	0	17,000,000
2008 年度	25,500,000	0	25,500,000
2009 年度	17,000,000	0	17,000,000
総計	84,900,000	0	84,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA チップ、染色体分配、染色体動態、染色体複製、複製チェックポイント

## 1. 研究開始当初の背景

細胞周期における S 期は単に正確に染色体 DNA を複製するだけでなく、正確な染色体分配の為に必要な構造-染色分体間接着(コヒージョン)-を複製された染色体の上に構

築していく時期でもある。私は複製チェックポイント因子である、Tof1、Mrc1、Csm3 が複製過程にあらかじめ複製装置の一部として組み込まれており、複製異常の際にはまず、複製フォークを停止させること、この停止そ

のものが複製チェックポイントの活性化に必要であることを見いだしてきた。興味深いことにこの3つの因子はいずれも姉妹染色分体間接着に必要であった。当時、これらの因子に加え、Ctf4、Ctf18等、姉妹染色分体間接着確立に必要である因子が逆に複製因子と共精製されてくることが明らかとなっており、複製と姉妹染色分体間接着の分子的分離機構の解明が染色体複製分野での大きなトピックの一つとなりつつあった。

## 2. 研究の目的

複製チェックポイント制御機構はゲノム情報の忠実な複製を保証するために必須の機構である。複製チェックポイント制御機構の活性化は複製ストレスが生じた際、まず、複製伸長因子の一部である Mrc1、Tof1 および、Csm3 蛋白により複製伸長反応が抑制されることにより誘導されるが、その分子的作用機序は明らかでない。本研究の目的は、複製停止および複製チェックポイントの活性化に必要なこれらタンパクそれぞれの機能構造及び、相互作用因子を明らかにし、何が複製異常時の直接的なシグナルとなり、これらの因子によって複製フォークは停止するのか、その結果いかなる構造がフォークに形成されチェックポイントの活性化につながるのか、さらには、チェックポイント活性化の結果、複製伸長因子の安定化はどのような分子的分離機構によって誘導されるのか、この一連の反応を明らかにすることにある。さらに、これらの因子の欠損が示す姉妹染色分体形成不全、逆に姉妹染色分体間接着確立因子の欠損が示す複製チェックポイント欠損についてもその原因を究明する。

## 3. 研究の方法

手法としては、標準的な遺伝学的、生化学的手法に加え、染色体上でのタンパクの動きをありのままに詳細に解析可能な ChIP-chip 技術を用いた。この方法論により約 100 塩基対の解像度で、タンパク局在を検出するとともに、BrdU の取り込みにより、複製領域も検出し、DNA 複製過程と複製チェックポイント機構の分子的分離、DNA 複製と姉妹染色分体間接着確立の分子的分離について解析した。

## 4. 研究成果

複製チェックポイントシグナル伝達系において、メディエーターとしての役割を持つ Tof1、Mrc1、Csm3 を中心に、その機能解析を行った。まず、Mrc1、Tof1、Csm3 の大量発現系をバキュロウイルスを用い構

築した。これら3者の精製タンパクを用い、Tof1、Mrc1、Csm3 が *in vitro* で複合体を形成していることを明らかにした。*in vitro* での Tof1-Csm3 の相互作用は非常に強かった。そこで、*in vivo* での3者おのおのの複製フォークへの結合の依存性を ChIP-chip 法により検証したところ、Tof1、Csm3 のフォークへの結合は各々相互に依存していること、さらに Tof1-Csm3 複合体が足場となり、Mrc1 のフォークへの結合を安定化することが明らかとなった。

さらに、この3者からなる複合体がいかなる複製因子と相互作用し、複製進行のどの側面を監視し、複製チェックポイントの活性化を誘導するのかを明らかにすべく、それぞれのタンパクに GST を融合し、これを発現する酵母細胞を得た。グルタチオンカラムにより共精製されてくるタンパクを検索した。さらに、複製に必須の MCM ヘリカーゼ、DNA ポリメラーゼにも FLAG タグを付加し、これらを、GST を融合した Tof1、Csm3、Mrc1 それぞれと酵母細胞中で共発現させることで、相互作用するタンパクを検索した。その結果、Tof1 と Csm3 については候補タンパクを得ることができなかったが、Mrc1 については Pol $\epsilon$ 、Mcm6 と特異的に相互作用することが判明した。Pol $\epsilon$  は Mrc1 の N 末および C 末と、Mcm6 は中央部とそれぞれ相互作用しており、この相互作用が失われると、前者の場合はヒドロキシウレアによる複製ストレスに対して、後者の場合はメチルメタンスルホン酸による DNA 損傷ストレスに対して感受性が高くなった。すなわち、この相互作用は、複製進行のモニタリング、そして、複製チェックポイントの活性化に必要であり、少なくとも複製フォークが2つの複製因子を通して異なる種類の複製ストレスをモニターしていることが示唆された。

このメディエータータンパク群の解析と平行して、姉妹染色分体間接着確立に必要である Ctf4 の機能解析も行った。ChIP-chip 解析の結果、Ctf4 は少なくとも複製フォークに局在していることが明らかとなった。さらに、ctf4 欠損株を用い、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$ 、MCM ヘリカーゼの進行を解析したところ、ctf4 が存在しないと、フォークの進行が非常に非同調的になることが判明した。面白いことに ctf4 非存在下では Pol $\alpha$  複合体と MCM ヘリカーゼの結合が失われていた。以上の結果から、Ctf4

がラギング鎖合成 DNA ポリメラーゼ複合体とヘリカーゼを連結させるタンパクであり、Ctf4 欠損下では、ラギング鎖合成とヘリカーゼの進行が部分的に共役していないことが明らかとなった。この連結機能は Ctf4 に特異的なものであり、複製装置の全体の安定化に重要であると考えられている Mrc 1、Tof 1、Csm 3 の欠損株ではポリメラーゼ、ヘリケース間の相互作用は全く影響を受けない。今後の大きな課題は、チェックポイント欠損により引き起こされると考えられている複製フォークの不安定化という現象が一体具体的には何をさすのか（複合体の安定性か、DNA-タンパク相互作用の不安定化か）を明らかにすることであろう。特に、チェックポイントメディエーターを介した複製装置の安定化という現象を分子レベルで明らかにできれば、癌化のメカニズム腫瘍悪性化のメカニズムを解明する上で大きな一歩となるに違いないだろう。

#### 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 20 件)

1. S. Mimura, M. Komata, T. Kishi, K. Shirahige, T. Kamura SCF(Dia2) regulates DNA replication forks during S-phase in budding yeast. **EMBO J.** 28, 3693-3705 (2009) 査読有

2. M. Bando, Y.M. Katou, M. Komata, H. Tanaka, T. Itoh, T. Sutani, and K. Shirahige Csm3, Tof1, and Mrcl form a heterotrimeric mediator complex that associates with DNA replication forks. **J Biol Chem.** 284, 34355-34365 (2009) 査読有

3. R. Bermejo, Y. M. Katou, K. Shirahige, and M. Foiani ChIP-on-Chip Analysis of DNA Topoisomerases. **Methods Mol Biol.** 582, 103-118, (2009) 査読無

4. K. B. Falbo\*, C. Alabert\*, Y. Katou\*, S. Wu, J. Han, T. Wehr, J. Xiao, X. He, Z. Zhang, Y. Shi, K. Shirahige, P. Pasero, and X. Shen Involvement of a chromatin remodeling complex in damage tolerance during DNA replication **Nat. Struct. Mol. Biol.** 16, 1167-1172 (2009) 査読有

5. R. Bermejo, T. Capra, V. Gonzales-Huici, D. Fachinetti, A. Cocito, G. Natoli, Y. Katou, H. Mori, K. Kurokawa, K. Shirahige, and M. Foiani Genome-Organizing Factors Top2 and Hmo1 Prevent Chromosome Fragility at Sites of S phase Transcription **Cell**, 138, 870-884, (2009) 査読有

6. M. Komata, M. Bando, H. Araki, and K. Shirahige The Direct Binding of Mrcl, a Checkpoint Mediator, to Mcm6, a Replication Helicase, is Essential for Replication Checkpoint Against Methyl Methanesulfonate-induced Stress. **Mol. Cell. Biol.** 29, 5008-5019 (2009) 査読有

7. K. Kugou, T. Fukuda, S. Yamada, M. Ito, H. Sasanuma, S. Mori, Y. Katou, T. Itoh, K. Matsumoto, T. Shibata, K. Shirahige, and K. Ohta Rec8 guides canonical Spoll distribution along yeast meiotic chromosomes. **Mol Biol Cell.** 20, 3064-3076, (2009) 査読有

8. H. Tanaka, Y. Katou, M. Yagura, K. Saitoh, T. Itoh, H. Araki, M. Bando#, and K. Shirahige# Ctf4 coordinates the progression of helicase and DNA polymerase alpha. **Genes Cells.** 14, 807-820, (2009) (#Shared Corresponding Author) 査読有

9. T. Sutani, T. Kawaguchi, R. Kanno, T. Itoh, and K. Shirahige Budding Yeast Wpl1(Rad61)-Pds5 Complex Counteracts Sister Chromatid Cohesion-Establishing Reaction. **Curr. Biol.** 19, 492-497, (2009) 査読有

10. K. Nakamura, A. Okamoto, Y. Katou, C. Yadani, T. Shitanda, C. Kaweeteerawat, T.S. Takahashi, T. Itoh, K. Shirahige, H. Masukata, and T. Nakagawa Rad51 suppresses gross chromosomal rearrangement at centromere in *Schizosaccharomyces pombe*. **EMBO J.** 27, 3036-3046 (2008) 査読有

11. M. Sadaie, R. Kawaguchi, Y. Ohtani, F. Arisaka, K. Tanaka, K. Shirahige, J. Nakayama Balance between distinct HP1 family proteins controls heterochromatin assembly in fission yeast. **Mol Cell Biol.** 28, 6973-6988 (2008) 査読有

12. H. Lou, M. Komata, Y. Katou, Z. Guan, C. C. Reis, M. Budd, K. Shirahige, J. L. Campbell, Mrcl and DNA polymerase  $\epsilon$  function together in linking DNA replication and the S phase checkpoint **Mol. Cell** 32, 106-117 (2008) 査読有

13. S. Ide, K. Watanabe, H. Watanabe, **K. Shirahige**, T. Kobayashi, and H. Maki Abnormality in initiation program of DNA replication is monitored by the highly repetitive rDNA array on chromosome XII in budding yeast, **Mol. Cell. Biol.**, 27, 568-578 (2007) 査読有

14. M. Hayashi, Y. Katou, T. Itoh, M. Tazumi, Y. Yamada, T. Takahashi, T. Nakagawa, K. Shirahige, and H. Masukata Genome-wide localization of pre-RC sites and identification of replication origins in fission yeast. **EMBO J.**, 26, 1327-1339 (2007) 査読有

15. M. T. Ocampo-Hafalla, Y. Katou, **K. Shirahige**, F. Uhlmann Displacement and re-accumulation of centromeric cohesin during transient pre-anaphase centromere splitting. **Chromosoma.** 116, 531-544 (2007) 査読有

16. D.Q. Ding, N. Sakurai, Y. Katou, T. Itoh, K. Shirahige, T. Haraguchi, and Y. Hiraoka. Meiotic cohesins modulate chromosome compaction during meiotic prophase in fission yeast. **J Cell Biol.**, 174, 499-508 (2006) 査読有

17. A. Lengronne, J. McIntyre, Y. Katou, Y. Kanoh, K. P. Hopfner, K. Shirahige, and F. Uhlmann Establishment of Sister Chromatid Cohesion at the S. cerevisiae Replication Fork. **Mol Cell.**, 23, 787-799 (2006) 査読有

18. Y. Katou, K. Kaneshiro, H. Aburatani, and **K. Shirahige** Genomic Approach for the Understanding of Dynamic Aspect of Chromosome Behavior. **Methods in Enzymology**, Elsevier Life Sciences (CA), vol. 409, chapter 23, 389-410 in "DNA Repair" (edited by J. Campbell) (2006) 査読無

19. Y. Kanoh, K. Tamai, and **K. Shirahige**. Different requirements for the

association of ATR-ATRIP and 9-1-1 to the stalled replication forks. **Gene.**, 377, 88-95 (2006) 査読有

20. Y. Tonami, H. Murakami, **K. Shirahige**, and M. Nakanishi. A checkpoint control linking meiotic S phase and recombination initiation in fission yeast. Proc. **Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, 102, 5797-801 (2005) 査読有

[学会発表] (計1件)

平成21年11月10日白髭克彦、信州大学 遺伝学会シンポジウム 「複製と分配の連携機構の解明」

[ホームページ等]

<http://www.iam.u-tokyo.ac.jp/chromosomeinformatics/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白髭 克彦 (SHIRAHIGE KATSUHIKO)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・  
連携教授  
研究者番号：90273854

### (2) 研究代表者

なし

### (3) 連携研究者

なし