

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目： 特定領域研究
 研究期間： 2005～2009
 課題番号： 17080008
 研究課題名（和文） 複製複合体の形成制御機構とチェックポイント・細胞分裂への関与の解明
 研究課題名（英文） Regulatory mechanism of replication complex formation and relationship between the complex, checkpoints and cell division
 研究代表者 荒木 弘之 (ARAKI HIROYUKI)
 国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授
 研究者番号： 20151160

研究成果の概要（和文）： 遺伝情報を担う染色体 DNA は、一度の細胞分裂に一度だけ複製されるよう、細胞の分裂周期により厳密に制御されている。これはタンパク質をリン酸化する酵素、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）が染色体 DNA の複製の開始を制御しているためである。我々は出芽酵母を用いて、CDK が Sld2 と Sld3 タンパク質をリン酸化し Dpb11 タンパク質に結合させることにより、DNA の複製を開始させることを明らかにした。またこの結合により複製が開始する機構の一端を解明した。

研究成果の概要（英文）： Chromosome DNA replication is strictly regulated by the cell division cycle, so that chromosome DNA replicates once per cell cycle. This is mainly because the cyclin-dependent protein kinase (CDK), a protein phosphorylating enzyme, regulates the initiation step of chromosome DNA replication. Using budding yeast, we revealed that CDK phosphorylates Sld2 and Sld3 proteins, both phosphorylated proteins bind to the Dpb11 protein and these bindings promote DNA replication. We also found a clue how these bindings function for the initiation of DNA replication.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	12,400,000	0	12,400,000
2006年度	12,400,000	0	12,400,000
2007年度	16,600,000	0	16,600,000
2008年度	19,900,000	0	19,900,000
2009年度	19,900,000	0	19,900,000
総計	81,200,000	0	81,200,000

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 複製、染色体、細胞周期、サイクリン依存性キナーゼ、真核生物、酵母

1. 研究開始当初の背景

真核生物染色体の DNA 複製機構には未だに明らかでない部分が多い。最も単純な真核生

物である酵母では、2003 年の我々による GINS 複合体の報告により、全ての複製因子が見つかり、それらの分子機作の解明がその

後の課題とされてきた。特に複製の開始は細胞周期により厳密に制御されており、真核生物特有の制御機構があるものと考えられた。真核生物の染色体 DNA 複製の開始領域には、複数の因子が集合し、DNA 合成を開始する。我々が同定・分離した複製因子、GINS, Dpb11, Sld2, Sld3 はこの複製開始領域に結合し複製開始に関与していることが推察された。また、複製開始に必須であるサイクリン依存性キナーゼ (CDK) の複製開始での基質の 1 つが Sld2 であり、CDK によりリン酸化された Sld2 が Dpb11 と結合することが複製開始に必須であることを示していた。しかし、Sld2 のリン酸化型変異を細胞に導入しても、CDK 活性がなければ複製は開始しない。従って、複製開始に関与する CDK 基質が Sld2 以外にあるものと思われた。さらに、Dpb11 は複製のみではなく細胞周期チェックポイントに関与していること、また新たに我々が分離した複製因子 Sld7 の欠失株では、細胞分裂阻害剤に感受性になり、複製以外での機能を示唆するものであった。

2. 研究の目的

1) CDK キナーゼによる複製開始制御機構の解明。

染色体複製開始が S 期に一度だけおこるには、CDK による巧妙な制御が必要である。Sld2 の CDK によるリン酸化が、複製開始に必須であることを示したが、これ以外にも未同定の CDK 基質が複製開始を促進していると考えられた。そこで、遺伝的手法を駆使して新たな CDK 基質を見出し、CDK による複製開始の全容を解明することを目指した。さらに、CDK によるリン酸化がどのような反応を制御しているのかを明らかにすることとした。

2) 複製因子の複製以外の機能。

Dpb11 は複製の開始とチェックポイントに関与している。また最近我々が Dpb11 と遺伝的相互作用がある因子として新たに分離した Sld7 は、核と中心体に局在するため、細胞分裂に関与することが示唆された。そこでこれら因子の機能を複製に限らず広く調べ、複製因子と他の細胞周期との関連を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

1) CDK キナーゼによる複製開始制御機構の解明。

Sld2 のリン酸化型変異 (CDK によるリン酸化可能部位の S/T を D に変えたもの) は野生型と置き換えることは出来るが、CDK 活性なしに複製を開始させることは出来なかった。このことは、Sld2 以外にも CDK の正の制御が働いていることを示している。CDK の活性に依

存せず複製を開始することができれば、細胞周期と DNA 複製が同調せず、染色体 DNA 量が変動し、致死になることが予想された。そこで、sld2 のリン酸化型変異と組み合わせると細胞が致死になる変異をスクリーニングすることにより、新たな CDK 基質を見出すことにした。

また上述の手法とは独立に、遺伝的に同定した CDK 基質候補タンパク質のリン酸化可能部位の変異を作成し、細胞増殖能がなくなるものを探した。

さらに、リン酸化 Sld2 が Dpb11 と結合することにより何が起きているのか、in vivo および in vitro で結合を調べた。

2) 複製因子の複製以外の機能。

細胞周期チェックポイントにも関与する Dpb11 と結合するタンパク質を in vivo から部分精製し、同定を試みた。

新たに分離した Sld7 については、相互作用する因子を捜すとともに、欠失株の性質を調べることにより、機能を推察した。

4. 研究成果

1) CDK キナーゼの複製開始に於ける基質の同定。

既に CDK の基質として同定していた Sld2 のリン酸化型変異 (Sld2-11D) と同時に発現すると致死になる変異とし *JET1* (Jumping CDK essentiality with Sld2[two]-11D) 変異を分離した。*JET1* は複製に関与する *CDC45* 遺伝子の優性変異であった。Sld2-11D と *Jet1* を同時に持った細胞は予想通り CDK 活性がなくても複製を行う。さらに、一度の細胞周期に複数回の DNA 複製が起こっていることも分かった。これは CDK が複製開始を誘導するとともに重複した複製開始を抑えることを意味している。

Cdc45 タンパク質には CDK リン酸化部位が複数あるが、それらの部位を非リン酸化型 (アラニン置換) にしても染色体 DNA 複製は起こり、細胞は増殖する。従って、*JET1* 変異が *Cdc45* に起こったにも関わらず、*Cdc45* は CDK の複製に必須な基質ではない。

我々はこの遺伝学的解析と平行して、複製因子の CDK リン酸化部位に変異を導入した。

1 2 個の CDK リン酸化モチーフを持つ Sld3 のリン酸化部位のセリン・スレオニンをアラニンに変えたところ細胞は致死となった。さらに必須なリン酸化部位を限定すると、Thr600 と Ser622 を同時にアラニンに置換したときのみ細胞が致死になることが分かった。そして、このリン酸化により Sld3 は Dpb11 と結合することが明らかになった。Dpb11 は 4 つのタンデムに並んだ BRCT (BRCA1 C-Terminal repeat) ドメインを持ち、前述の Sld2 はリン酸化されると C 末の一对の

BRCT ドメインに結合する。リン酸化された Sld3 は Dpb11 の N 末の一对の BRCT ドメインに結合した。Sld3 は Cdc45 と結合することを我々は以前に報告しており、Jet1 との関係性を調べた。その結果、Thr600 と Ser622 をアラニンに置換した *sld3* 変異でも Jet1 を同時に持つ細胞は増殖することができた。これは Jet1 により、Sld3 のリン酸化によらず Dpb11 と Sld3 の結合が起こるようになったためである。この詳細な機構はまだ分からない。

以上のことから我々は、出芽酵母では CDK が Sld2 と Sld3 をリン酸化し、これらが Dpb11 タンパク質に結合することが複製開始に必須で且つ十分であると結論した。これは CDK による複製開始の機構を初めて明らかにしたものである。

一方、Sld2 と Sld3 のアミノ酸配列からは、高等真核生物に対応する因子を見つけることは出来ない。しかし、BRCT ドメインを 8 個持つ高等動物の TopBP1 / Mus101 / Cut5 が、Sld2、Sld3 の結合する Dpb11 と同じように複製開始に働くことが分かってきている。また、TopBP1 と結合し Sld2 と部分的に相同領域を持つ RecQL4 も Sld2 の高等動物版であろうと考えられている。さらに最近の研究から、Sld3 の機能に対応する TopBP1 結合タンパク質として Treslin/Ticrr, GEMC1, DueB が報告されており、これら全部あるいは一部が Sld3 と同じ機能を高等動物で担っていると考えられる。このように、酵母だけでなく高等真核生物に於いても、我々が明らかにしてきた機構と同様な機構が働いていることが示唆されている。今後の更なる研究によりこの機構が真核生物一般に受け入れられることを期待している。

2) Sld2 の CDK によるリン酸化機構。

前述のように Dpb11 の C 末のタンデム BRCT ドメインには Sld2 が結合する。この結合には Sld2 の Thr84 がリン酸化されることが必須であることが分かった。Sld2 は CDK によるリン酸化モチーフを 11 個持つ。そして、Thr84 をアラニンに置換した変異を持つ細胞は致死になる。しかし、Thr84 はそのまま、他のリン酸化部位を複数個アラニンに置換すると細胞が致死になるものがある。この際、Thr84 をリン酸化型のアスパラギン酸 (D) に置換すると、たとえ残り 10 個のリン酸化部位をアラニンに置換しても細胞は増殖する。このことは、Thr84 のリン酸化が他の部位のリン酸化の影響を受けていることを示唆する。また、精製した Sld2 タンパク質を CDK キナーゼにより *in vitro* でリン酸化し、個々のリン酸化部位のリン酸化を認識する抗体を用いて調べると、Thr84 のリン酸化が最後に起こることが分かった。さらに Thr84 周辺のアミノ酸配列を CDK ではなく DNA 依存性キ

ナーゼによりリン酸化される配列に換え、Thr84 のリン酸化を調べると、CDK キナーゼにより他の CDK 部位をリン酸化させたものだけが、DNA 依存性キナーゼによりリン酸化された。細胞内に於いても、Thr84 以外の CDK リン酸化部位を複数アラニンに置換したものでは Thr84 のリン酸化は検出できない。これらのことは、Thr84 以外の CDK によるリン酸化がまず起こり、これらのリン酸化により初めて Thr84 が CDK によりリン酸化されるようになることを意味している。

この機構は、CDK 活性が一定量を超えないと複製を開始させないスイッチの働きをしていると考えられる (図 1)。複製開始領域には、CDK 活性の低い M 期後期から G1 期に pre-RC (pre-Replicative Complex) が形成される。CDK が G1 期後期に活性化されると、この pre-RC の形成された複製開始領域へ複製因子が集合して複製が開始する。そして複製の開始された複製開始領域から pre-RC は消失する。一方、pre-RC の構成因子は CDK によりリン酸化されて、再度 pre-RC の形成が出来ないように制御されている。従って、低い CDK 活性では複製を開始せず、まず十分に pre-RC 構成因子をリン酸化し重複して複製が起こらないようにしてから複製を開始するようになっていると考えられる。この機構が複製開始に同調性を与え、S 期の時間を調整するのではないかというシステム生物学による他のグループの研究も報告されており、今後の研究の発展が期待される。

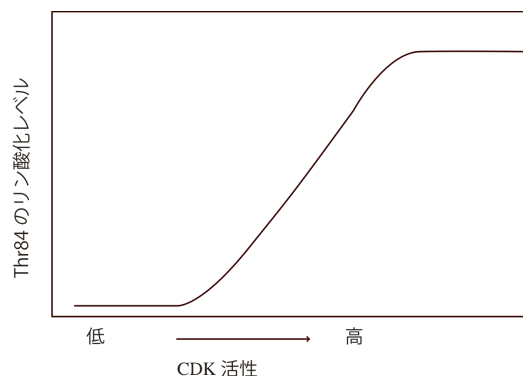


図 1 Sld2 Thr84 のリン酸化と CDK 活性

3) Dpb11 とリン酸化 Sld2 の結合により起こる複製開始反応に必要な複合体の形成。

Dpb11, Sld2, Sld3 の CDK によるリン酸化に依存した結合が複製を開始させる機構の全貌は未だに分からない。しかし、Sld2 と Dpb11 の結合が pre-Loading Complex (pre-LC) の形成を介して複製開始に寄与していることを明らかにした。即ち、*in vivo* 及び *in vitro* のタンパク質複合体の解析から、Dpb11 とリン酸化 Sld2 の結合に依存して Dpb11, Sld2, Pol ϵ , GINS を含む複合体 pre-LC が形成されることを示した。この pre-LC は、複製開始

領域に結合することなく形成される。Sld3 は S 期初期に活性化する複製開始領域には G1 期から結合するので、染色体上の Sld3 が CDK によりリン酸化され、Dpb11 を介して CDK 依存的に形成した pre-LC と結合するというモデルを提案した (図 2)。複製フォークにおいては、Cdc45, Mcm, GINS が CMG 複合体を形成し、DNA ヘリカーゼとして働く。Mcm, Cdc45 はともに G1 期に複製開始領域に結合するので、CDK 依存的に形成した pre-LC は GINS を複製開始領域に呼び込む働きをし、CMG 形成を促進していると考えている。

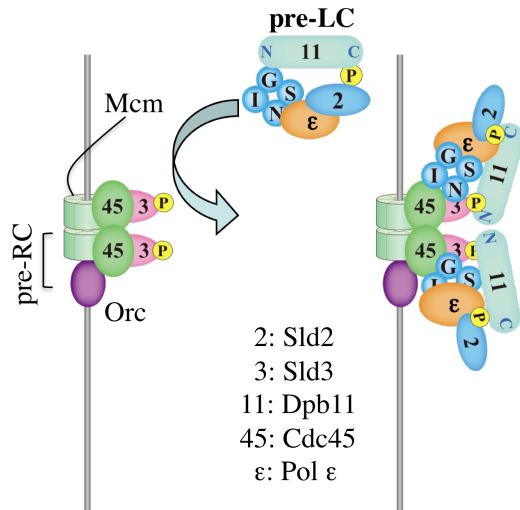


図 2 CDK リン酸化による pre-LC の形成

今後この pre-LC がどのように複製開始領域に結合するのかを明らかにする必要がある。特に、現在のモデルである複製開始領域上 Sld3 を介した結合が実際起こるのか、Sld2, Sld3 と Dpb11 の結合の機序等は重要な課題となる。

4) 複製因子の複製以外での機能

Dpb11 と結合する因子の検索は困難を極め、新たな因子の発見には繋がらなかった。他の研究グループからチェックポイントキナーゼである Mec1 の活性化部位が Dpb11C 末にあることが示されたが、この部位の変異を持つ細胞の表現型は曖昧で、今後も解析を続ける必要がある。

一方、Sld3 は細胞内では新規因子 Sld7 との複合体として存在することを見いだした。Sld7 は細胞の増殖に必須ではないが、Sld7 を欠失すると S 期の開始が遅れ、複製阻害剤であるヒドロキシ尿素に感受性になる。そして、Sld7 欠失株では Sld3 の量が減少していた。また、CDK 活性化に伴って複製開始領域に結合する GINS の結合も変化する。これらのことから、Sld3 の構造が Sld7 の結合により変わっているのではないかと考えている。さらに、Sld7 欠失株では微小管重合阻

害剤であるノコダゾールにも感受性を示す。この感受性は Sld3 量を増加して複製が野生株と同じレベルで起こる状態にしても、完全には消失しない。従って、Sld7 が Sld3 を介さず細胞分裂に関与している可能性もあるが、現段階では明らかではない。今後の解析が必要である。

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 11 件)

- ① Muramatsu S, Hirai K, Tak Y-S., Kamimura Y, Araki H. CDK-dependent complex formation between replication proteins, Dpb11, Sld2, Pol ε and GINS in budding yeast. *Genes & Dev.* 査読有, 24: 602-612, 2010.
- ② Araki H. Regulatory mechanism of the initiation step of DNA replication by CDK in budding yeast. *Biochimica et Biophysica Acta*, 査読有, 1804: 520-523, 2009.
- ③ Komata M, Bando M, Araki H., Shirahige K. The direct binding of Mrcl1, a checkpoint mediator, to Mcm6, a replication helicase, is essential for the replication checkpoint against methyl methanesulfonate-induced stress. *Mol. Cell. Biol.* 査読有, 29: 5008-5019, 2009.
- ④ Tanaka H, Katou Y, Yagura M, Saitoh, Itoh T, Araki H., Bando M, Shirahige K. Ctf4 coordinates the progression of helicase and DNA polymerase α. *Genes to Cells*, 査読有, 14: 807-820, 2009.
- ⑤ Tanaka S, Tak Y-S, Araki H. The role of CDK in the initiation step of DNA replication in eukaryotes. *Cell Division*, 査読有, 2:16, 2007.
- ⑥ Tanaka S, Umemori T, Hirai K, Muramatsu S, Kamimura Y, Araki H. CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature*, 査読有, 445: 328-332, 2007.
- ⑦ Tak Y-S, Tanaka Y, Endo S, Kamimura Y, Araki H. (2006) A CDK-catalysed regulatory phosphorylation for formation of the DNA replication complex Sld2-Dpb11. *EMBO J.* 査読有, 25: 1987-1996, 2006.

〔学会発表〕(計97件)

- ① Araki H., CDK-dependent assembly of replication proteins at the initiation step of chromosomal DNA replication, Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance, September 1, 2009, Cold Spring Harbor, USA.
- ② Araki H., CDK-dependent assembly of replication proteins at the initiation step of chromosomal DNA replication, Inhibitors of Protein Kinases, June 29, 2009, Warsaw, Poland.
- ③ Araki H., The initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast, Annual Meeting of American Society of Biochemistry and Molecular Biology, April 19, 2009, New Orleans, USA.
- ④ Araki H., CDK-dependent assembly of replication proteins to initiate chromosomal DNA replication, DNA Replication and Genome Integrity, July 19, 2008, La Jolla, USA.
- ⑤ Araki H., Molecular mechanism of the initiation step of chromosomal DNA replication in budding yeast, XX International Congress of Genetics, July 13, 2008, Berlin, Germany.
- ⑥ Araki H., CDK-dependent regulation of chromosomal DNA replication, Yeast Chromosome Structure, Replication & Segregation, June 25, 2008, Carefree, USA.
- ⑦ Araki H., CDK-dependent initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast, The Cell Cycle, May 15, 2008, Cold Spring Harbor, USA.
- ⑧ Araki H., CDK-dependent initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast, Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance, September 6, 2007, Cold Spring Harbor, USA.
- ⑨ Araki H., CDK-mediated regulation of chromosomal DNA replication in budding yeast, DNA Replication and Genome Integrity, August 15, 2006, La Jolla, USA.
- ⑩ Araki H., CDK-dependent initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast, 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, June 23, 2006, Kyoto.
- ⑪ Araki H., CDK-dependent assembly of

replication proteins at origins, 5th International 3R Symposium, November 17, Awaji, 2005.

- ⑫ Araki H., CDK-dependent reactions at the initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast, Eukaryotic DNA Replication, September 8, 2005, Cold Spring Harbor, USA.

〔図書〕(計3件)

- ① 荒木弘之 真核生物染色体 DNA の複製開始を担う複製蛋白質複合体の形成蛋白質核酸酵素 増刊号「染色体サイクル」(正井久雄、升方久夫、釣本敏樹、仁木宏典、篠原彰編集)、54巻、pp350-355、2009、共立出版
- ② 荒木弘之、酵母の染色体 DNA 複製の分子機構、pp232-236、酵母のすべて(大隅良典・下田親 編)、2007、シュプリンガー・ジャパン
- ③ Walter J C, Araki H. Activation of pre-replication complexes. In DNA Replication and Human Disease (ed. DePamphilis, M. L.), pp. 89-104, 2006, Cold Spring Harbor Laboratory Press

〔その他〕

ホームページ

<http://www.nig.ac.jp/labs/MicGen/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 弘之 (ARAKI HIROYUKI)
国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・
教授
研究者番号：20151160