

平成23年5月16日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005 ～ 2009

課題番号：17080015

研究課題名（和文）Cdc7 キナーゼによる染色体機能制御機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of chromosome regulation by Cdc7 kinase

研究代表者

正井 久雄 (MASAI HISAO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・参事研究員

研究者番号：40229349

研究成果の概要（和文）：

Cdc7 キナーゼは、複製開始に必須なキナーゼであるが、減数分裂期の組換え（遺伝的多様性を与える）、DNA 損傷乗り越え合成（DNA の傷を修復することなくバイパスする）、DNA 複製チェックポイント（複製停止した際、最終的に複製を再開できるための細胞応答機構）などに関与する。これらのステップにおける Cdc7 によるリン酸化の標的を同定した。又分裂酵母を用いて Cdc7 の複製開始における機能をバイパスする変異体を同定し、これらの解析から可塑性をもつ複製プログラムの制御機構に関して新規の知見を得た。

研究成果の概要（英文）：

Cdc7 kinase plays critical roles in initiation of DNA replication. Additional important functions of Cdc7 in other chromosome transactions have been suggested. This includes meiotic recombination, DNA damage bypass (Trans-leision synthesis), and DNA replication checkpoint and so forth. We identified critical substrates of Cdc7 kinase in these processes. We also identified novel fission yeast mutations that can bypass the requirement of Hsk1 kinase for the growth. Characterization of these mutants lead to identification of some of the novel mechanisms that contribute to the plastic regulation of timing and site selection of origin firing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	34,800,000	0	34,800,000
2006 年度	30,400,000	0	30,400,000
2007 年度	40,400,000	0	40,400,000
2008 年度	30,400,000	0	30,400,000
2009 年度	30,400,000	0	30,400,000
総計	166,400,000	0	166,400,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学（5802）および分子生物学（5804）

キーワード：DNA 複製・Cdc7 キナーゼ・リン酸化・組換え開始・染色体サイクル・複製フォーク停止・DNA 修復・染色体分配

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

Cdc7 キナーゼは複製複合体をリン酸化することにより、複製開始を制御することが知られているが、本研究課題申請時に、広範な染色体機能を制御している可能性が示唆されていた。(1)減数分裂期の組換え開始に必須な二重鎖 DNA 切断 (DSB)。(2)染色体分配あるいは細胞分裂の過程。(3)姉妹染色分体の接着。(4)HP1 との相互作用を通じてセントロメア近傍のヘテロクロマチン形成。(5)Swi1, Swi3, Mrc1 など複製フォーク安定化因子との相互作用を介した、停止複製フォークの安定化ならびに、チェックポイント反応の誘導。(6)乗り越え DNA 合成 (紫外線誘導変異に関与するから)。しかし Cdc7 のこれらの過程における役割の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

上記に記載したように Cdc7 は染色体 DNA の複製、組換え、分配、変異など多様な染色体機能制御に関与する可能性が高い。そこで本申請研究では、分裂酵母および動物細胞を用いて、Cdc7 のこれらの多様な制御の分子機構を明らかにすることを目的とした。具体的には、(1) 減数分裂期の Cdc7 キナーゼの標的を含め、Cdc7 の多様な基質を遺伝学的、生化学的に網羅的に同定する。(2)Cdc7 の複製開始の機能をバイパスするが染色体分離や細胞分裂の異常は相補されないような分裂酵母変異体、あるいは複製開始は正常であるが、姉妹染色分体の接着あるいは細胞分裂に異常を来しているような Cdc7 変異体を探索し、これを用いて、複製以外の機能に関与する因子を遺伝学的に同定する。(3)Swi1, Swi3, Mrc1 と Cdc7, MCM などとの物理的相互作用を *in vitro* で検討する。さらに Cdc7 による MCM のリン酸化や MCM のヘリカーゼ活性にこれらの因子が及ぼす影響を検討する。(4) (1) で同定した Cdc7 キナーゼの基質のリン酸化部位を同定し、そのリン酸化の意義を遺伝学的、生化学的手法で明らかにする。

3. 研究の方法

分裂酵母と動物細胞を用いて相互の系の利点を生かしつつ有機的に連携しつつ研究をすすめる。具体的には分裂酵母での遺伝学的アプローチにより、Cdc7 経路に関与する因子を同定し、その機能解析を行なう。さらに、動物細胞においてこれらの因子が保存された機能を有するかどうかを細胞生物学的手法、siRNA を用いた手法、さらに重要な因子については変異マウス、変異細胞を樹立し解析する。リン酸化部位の同定については MASS

による解析と主に酵母における変異解析を併用して同定する。

4. 研究成果

Cdc7 の機能に関して下記の事実を明らかにした。

(1) 減数分裂期における機能

Cdc7活性減弱変異マウスは不妊で、生殖細胞の発生に異常を呈する。分裂酵母においても *hsk1* 変異株は減数分裂に進行できず、1核で停止する。予想に反して、*hsk1* 変異株でも減数分裂前DNA複製は完了していたが、組換え開始に必須なDSB(二本鎖DNA切断)の導入が著しく減少していた。また、*ade6-M26*組換えホットスポットにおいて組換えに先立って誘導されるクロマチン再編成が起こっていなかった。また、これらの異常は既知のチェックポイント経路には依存していない。これらの事実から、Cdc7キナーゼは減数分裂期の組換え開始を直接制御する可能性が示唆された。出芽酵母でもCdc7は複製組換えに必要であるが、我々はその標的のひとつがDSB導入複合体の形成に必要なMer2タンパクであることを証明し、そのリン酸化部位も同定した。さらに分裂酵母における基質はRec7であることを見出した。

(2) 複製チェックポイントにおける機能

分裂酵母および動物細胞において複製フォーク停止により誘導される Cds1 および Chk1 キナーゼの活性化が *hsk1* および Cdc7 変異株でそれぞれ欠損していることが明らかとなった。動物細胞においては Cdc7 欠損下で、複製フォーク停止に反応した ATR の活性化は起こるが、Claspin(Mrc1 ホモログ)のリン酸化およびクロマチン結合に異常があることが明らかになった。分裂酵母の解析から、Hsk1 は Cdc45 の chromatin loading を介して Checkpoint の活性化を制御する可能性が示唆された。一方 Cdc7 はチェックポイントの標的である可能性も明らかになった。後述のように Mrc1 は複製開始に先立って複製起点に結合し、Cdc7 による複製起点活性化を誘導すると考えられるが、Cdc7 と Mrc1 の結合はチェックポイント経路により阻害されることを示した。また Hsk1 の活性も Cds1 により阻害されることから、Cdc7/Hsk1 は二種類の経路でチェックポイントにより制御される可能性を提示した。

(3) DNA 損傷乗り越え修復における機能

ヒト細胞において Cdc7 は Rad18 の C 端領域をリン酸化することにより、バイパス DNA ポリメラーゼ pol η の停止複製フォークへの集合を促進する。

(4) Rad9 を標的とした DNA 損傷応答制御

分裂酵母において Hsk1 は Rad9 をリン酸化し、これにより損傷部位から Rad9 を release させ、DNA 修復を促進する。

標的タンパク質	生物種	リン酸化		リン酸化の機能	リン酸化部位
		<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>		
MCM2	出芽酵母	Yes	Yes	Cdc45 タンパク質のクロマチンへの loading	
MCM2	分裂酵母	Yes	Yes	同上	
MCM2	カエル卵抽出液	NA	Yes	同上	
MCM2	ヒト	Yes	Yes	同上	S26, S27, S40, S41, S53, S108, S139
MCM4	出芽酵母	Yes	Yes	同上	
MCM4	分裂酵母	Yes	Yes	同上	
MCM4	カエル卵抽出液	NA	Yes	同上	
MCM4	ヒト	Yes	Yes	同上	S6
MCM6	出芽酵母	?	Yes	同上	
MCM6	分裂酵母	Yes	Yes	同上	
MCM6	ヒト	Yes	Yes	同上	
Mrc1	分裂酵母	Yes	Yes	複製チェックポイント活性化	
Claspin	ヒト	Yes	Yes	同上	
Mer2	出芽酵母	Yes	Yes	減数分裂期 組換え開始、DSB 形成	S29 および他の N 端の S 残基
Rec7	分裂酵母	Yes	Yes	減数分裂期 組換え開始、DSB 形成	C 端領域
Caf-1 p150	ヒト	Yes	Yes	複製と共役したクロマチン形成 (PCNA との結合)	
Swi6	分裂酵母	No	Yes	セントロメアのヘテロクロマチン形成、姉妹染色分体接着	
Sec2	カエル	No	No	Cohesin 複合体 (Sec2-Sec4 複合体) のクロマチンへの結合	
Rad18	ヒト	Yes	Yes	DNA polh の Rad18 への結合	S434
Rad9	分裂酵母	Yes	Yes	Rad9 の損傷部位からの解離	S319/S320/T321

表 Cdc7 キナーゼの基質とそのリン酸化についてのまとめ。太字は本研究で明らかになったもの。

(5) Cdc7 キナーゼの生化学的解析：活性化因子・活性化の分子機構

ヒトおよび分裂酵母の Cdc7 キナーゼは、*in vitro*において spermine などの polyamine により著しく活性化をうけることを発見した。また Cdc7 上に Dbf4/ASK への結合に関与する 2 個のモチーフ、DAM-1 および DAM-2 を同定し、これらはそれぞれ ASK 上の保存モチーフ Dbf4-motif-M および motif-C と相互作用することにより、活性をもつ複合体を形成することを見出した。また複合体形成により ATP 結合および基質認識が促進されることを発見した。

(6) Cdc7 阻害によるがん細胞死の誘導

子宮頸癌細胞 HeLa において Cdc7 を減少させると、CyclinB が細胞質に蓄積し、最終的に異常な M 期に進行することにより細胞死が誘導されることを示した。また p53+細胞では Cdc7 阻害と S 期障害因子を組み合わせることにより効率よく細胞死を誘導できることを見出した。

(7) Hsk1 機能のバイパス変異

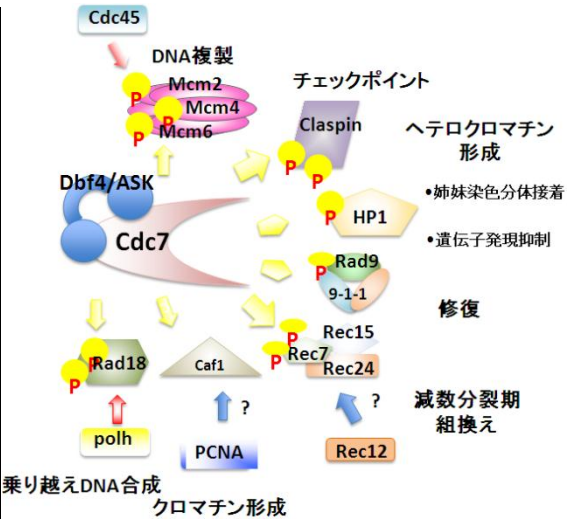


図 1 これまでに同定された Cdc7 キナーゼの基質とそのリン酸化が関与する染色体動態。Cdc7 は種々の基質のリン酸化を介して多様な染色体動態を制御する。

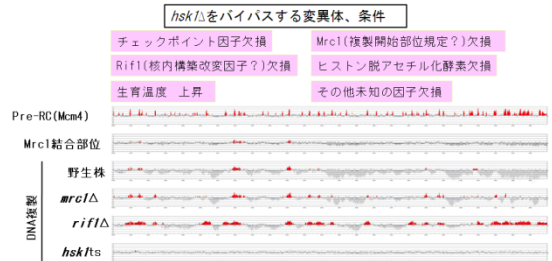


図 2 *hsk1Δ* をバイパスする変異体、条件と、それらの変異体における preRC の形成と DNA 複製開始部位のゲノムワイド解析

preRC (潜在的複製起点) は 10kb に 1 個くらいの頻度で存在するが実際はその一部が初期複製開始に使用される。しかし、*mrc1Δ* 株や *rif1Δ* 株では通常使用されない部位から開始する。一方、*hsk1Δ* 変異株では開始頻度が減少する。なお、上記は HU 存在下での複製開始のシグナルである。Mrc1 は初期複製開始部位に選択的に結合する。

hsk1 あるいは *him1* の欠損が *mrc1* の欠損により相補されることを発見した。Mrc1-3 あるいは *cds1Δ* も *hsk1Δ* を Mrc1 は何らかの機構で複製開始あるいは複製フォーク形成を阻害しており、Cdc7 はその阻害を解除するために機能している可能性が示唆された。実際複製中間体の解析から Mrc1 は複製起点での bubble 形成を阻害していること、また ChIP 解析から Mrc1 は Cdc7/Hsk1 に依存せずに起点に結合し、Cdc7/Hsk1 に依存して複製フォークとともに移動することが明らかとなった。これらの結果から Mrc1 は複製起点に結合し、二本鎖の開裂に阻害的に機能し Cdc7 がこの阻害を解除する可能性が示唆された。遺伝学的スクリーニングにより、*hsk1* 機能をバイパスする変異体を網羅的にスクリーニ

ングした。その結果、テロメア結合因子 *rif1* が同定された。*rif1Δ*は *hsk1Δ*を効率よく相補した。*rif1Δ*株では複製起点の大規模な脱制御が起こっていることが示された。*Rif1*はテロメアのみでなく染色体アーム領域にもゲノムワイドに結合する。テロメア結合は *Taz1*に依存するがアーム結合が *Taz1*非依存的である。一方、動物細胞においても *Rif1*の抑制により複製開始部位およびタイミングのゲノムワイドの変化が誘導されることが示された。さらに遺伝子発現プロファイルも影響を受けることから、*Rif1*はクロマチン構造あるいは核内染色体ドメインを制御する可能性が示唆された。

(8)その他の *Cdc7* バイパス

*hsk1Δ*は 30C では生存できないが 37C では生存できることを発見した。また、*mrc1Δ*バイパス株も高温の方が生育がよかった。高温では複製起点の firing が促進されている。このように *hsk1Δ*のバイパスを指標に複製プログラムの制御因子、条件の同定が可能である可能性を示唆した。

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 47 件)

● 正井久雄

原著論文(計 33 件)

Hayano, M., Kanoh, Y., Matsumoto, S., Kakusho, N. and Masai, H. (2011) "Pre-firing binding of *Mrc1* defines the early-firing origins which are selectively hyper-activated upon loss of fork stabilizing factors in fission yeast."

Mol. Cell Biol. 31, 2380-2391

Ryo Kitamura, Rino Fukatsu, Naoko Kakusho, Yong-Soon Cho, Chika Taniyama, Satoshi Yamazaki, Gaik-theng Toh, Kazuo Yanagi, Naoko Arai, Ho-Jin Chang, and Hisao Masai (2011) "Molecular mechanism of activation of human *Cdc7* kinase: Bipartite interaction with *Dbf4/ASK* stimulates ATP binding and substrate recognition."

J. Biol. Chem. In press

Uno, S. and Masai, H. (2011) "Efficient expression and purification of human replication fork-stabilizing factor, Claspin, from mammalian cells: DNA binding activity and novel protein interactions."

Genes to Cells. In press

Furuya, K., Miyabe, I., Tsutsui, Y., Paderi, F., Kakusho, N., Masai, H., Niki, H. and Carr, A. M. (2010) "DDK phosphorylates checkpoint clamp *Rad9* and promotes its release from damaged Chromatin."

Mol. Cell 40, 606-618.

Day, T.A., Palle, K., Barkley, L.R., Kakusho, N.,

Zou, Y., Tateishi, S., Verreault, A., Masai, H. and Vaziri, C. (2010) "Cdc7-Mediated *Rad18* Phosphorylation Directs the Accumulation of DNA Polymerase η at Sites of Stalled Replication."

J. Cell Biol. 191, 953-966.

Matsumoto, S., Shimmoto, M., Kakusho, N., Yokoyama, M., Russell, P., and Masai, H. (2010) "Hsk1 kinase and *Cdc45* regulate replication stress-induced checkpoint responses in fission yeast."

Cell Cycle 9, 4627-4637.

Shimmoto, S., Matsumoto, S., Hayano, M., Yokoyama, M., Noguchi, E., Russell, P. and Masai, H. (2009) "Interactions between *Swi1-Swi3*, *Mrc1* and S phase kinase, *Hsk1* may regulate cellular responses to stalled replication forks in fission yeast."

Genes to Cells 14, 669-682.

Tanaka, T., Yokoyama, M., Matsumoto, S., Fukatsu, R., You, Z. and う. (2010) "Fission yeast *Swi1-Swi3* complex facilitates DNA binding of *Mrc1*."

J. Biol. Chem. 285, 39609-39622.

Kim, J-M., Kakusho, N., Yamada, M., Kanoh, Y., Takemoto, N., and Masai, H. (2008) "Cdc7 kinase is required for Claspin phosphorylation in DNA replication checkpoint."

Oncogene 27, 3475-3482.

Sasanuma, H., Hirota, K., Fukuda, T., Kakusho, N., Kugou, N., Kawasaki, Y., Shibata, T., Masai, H., and Ohta, K. (2008) "Cdc7-dependent phosphorylation of *Mer2* facilitates initiation of yeast meiotic recombination."

Genes & Dev. 22, 398-410.

Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Imamura, T., Ogawa, M., Masai, H., and Miyawaki, A. (2008) "Spatio-temporal dynamics of multicellular cell cycle progression."

Cell 132, 487-498.

Featured on the cover of the issue

Kakusho, N., Taniyama, C., and Masai, H. (2008) "Identification of stimulators and inhibitors of *CDC7* kinase *in vitro*."

J. Biol. Chem. 283, 19211-19218.

Yoshizawa-Sugata, N. and Masai, H. (2007) "Human *Tim/Timeless*-interacting protein, *Tipin*, is required for efficient progression of S phase and DNA replication checkpoint."

J. Biol. Chem. 282, 2729-2740

Ogino, K., Hirota, K., Matsumoto, S., Takeda, T., Ohta, K., Arai, K. and Masai, H. (2006) "Hsk1 kinase is required for induction of meiotic double-stranded DNA breaks without involving checkpoint kinases in fission yeast."

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103, 8131-8136.

Masai, H., Taniyama, C., Ogino, K., Matsui, E., Kakusho, N., Matsumoto, M., Kim, J.-M., Ishii, A., Tanaka, T., Kobayashi, T., Tamai, K., Ohtani, K., and Arai, K. (2006) "Phosphorylation of MCM4 by Cdc7 kinase facilitates with Cdc45 on the chromatin."

J. Biol. Chem., 281, 39249-32961.

This paper was selected as "JBC paper of the week" and was featured in the cover of December 22 issue of JBC.

Yoshizawa-Sugata, N., Ishii, A., Taniyama, C., Matsui, E., Arai, K., and **Masai, H.** (2005) "A second human Dbf4/ASK-related protein, Drf1/ASKL1 is required for efficient completion of S and M phases."

J. Biol. Chem. 280, 13062-13070.

Yamashita, N., Kim, J.-M., Koiwai, O., Arai, K. and **Masai, H.** (2005) "Functional analyses of mouse ASK, an activator subunit for Cdc7 kinase, using conditional ASK knockout ES cells."

Genes to Cells 50, 551-563.

Todorovic, V., Giadrossi, S., Pelizon, C., **Masai, H.** and Giacca, M. (2005) "Novel human origins of DNA replication selected from a library of nascent DNA."

Mol. Cell 19, 567-575.

Matsumoto, S., Ogino, K., Noguchi, E., Russell, P. and **Masai, H.** (2005) "Hsk1-Dfp1/Him1, the Cdc7-Dbf4 Kinase in *Schizosaccharomyces pombe*, associates with Swi1, a component of the replication fork protection complex."

J. Biol. Chem., 280, 42536-42542.

他 14 件

英文総説 (計 14 件)

Masai, H. (2011) "RecQL4: a helicase linking formation and maintenance of a replication fork."

J. Biochem. In press (commentary)

Toh G.-T. and **Masai, H.** (2011) "Cdc7L1." **UCSD-Nature Molecule Pages**, in press (Review)

Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N. and Oda, M. (2010) "Eukaryotic DNA replication; where, when and how?"

Annual Rev. Biochem. 79, 89-130.

Masai, H., Tanaka, T. and Kohda, D. (2010) "Stalled replication forks: Making ends meet for recognition and stabilization."

Bioessays 32, 687-697. (Review)

Vaziri, C. and **Masai, H.** (2010) "Integrating DNA replication with Trans-Lesion Synthesis via Cdc7."

Cell Cycle Dec 15; 9(24). [Epub ahead of print] PMID: 21150323

Sawa, M., and **Masai, H.** (2009) "Drug Design with Cdc7 kinase, a potential novel cancer therapy target."

Drug Design, Development and

Therapy 2, 255-264.

Toh, G.K., and **Masai, H.** (2009) "ASK"

UCSD-Nature Molecule Pages,

Published online: 25 Feb 2009 |

doi:10.1038/mp.a000345.01 (Review)

Ito, S., Taniyama, C., Arai, N. and **Masai, H.** (2008) "Cdc7 as a potential new target for cancer therapy."

Drug News and Perspectives 21,

481-488. **Featured on the cover of the issue**

他 6 件

[学会発表] (計約 100 件 内 35 件が招待) 詳細省略

[図書] (計 24 件)

正井久雄 (2010) なぜ親子は似るの? 「なぜなぜ生物学」(MBSJ 日本分子生物学会編)、pp31-45、東京化学同人

正井久雄 (2010) 生物学辞典 (分担) 東京化学同人

正井久雄 (2009) 序 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)、pp307、共立出版

正井久雄 (2009) 序論 染色体サイクルの基礎。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)、pp311-316、共立出版

正井久雄 (2009) 染色体サイクルの連係制御機構 概論 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)、pp521-523、共立出版

正井久雄 (2009) Cdc7キナーゼによる染色体サイクル制御。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)、pp524-530、共立出版

阪上-沢野朝子、**正井久雄**、宮脇敦史 (2008) 細胞周期をリアルタイムに可視化する技術。実験医学、増刊号「生命現象の動的理解を目指すライブイメージング」(宮脇敦史 編集) 26, 148-155, 羊土社

正井久雄 (2008) 序 DNA複製研究の過去、現在、未来。細胞工学「細胞増殖とゲノム安定性維持のかなめ、DNA複製のメカニズム解明に迫る」(**正井久雄** 編集) 27, 962-966, 秀潤社
加納豊、**正井久雄**、白髭克彦 (2008) DNA複製開始と進行のゲノムワイドのプロファイル解析。細胞工学「細胞増殖とゲノム安定性維持のかなめ、DNA複製のメカニズム解明に迫る」(**正井久雄** 編集) 27, 1008-1012, 秀潤社

正井久雄 (2007) 「染色体サイクル: 複製・

分配・組換え・修復・クロマチン制御のメカニ
ズムとその異常による疾患」序文 実験医学
増刊号（羊土社）

正井久雄、渡邊嘉典（2007） 概論“染色体
サイクル制御の分子メカニズム” 実験医学
増刊号「染色体サイクル」（羊土社） pp16-23.

You Zhiying, **正井久雄**（2007） “MCM タン
パク質の DNA 複製における役割” 実験医学
増刊号「染色体サイクル」（羊土社） pp37-41.

正井久雄、松本清治（2007） “Cdc7 キナ
ーゼによる複製フォーク制御” 実験医学増
刊号「染色体サイクル」（羊土社） pp78-85.

正井久雄（2007） 生化学辞典（分担）第
4版 東京化学同人

他12報

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rinshoken.or.jp/org/CB/index-jp.htm>

6. 研究組織

研究代表者

正井 久雄(MASAI HISAO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床
医学総合研究所・参事研究員

研究者番号：40229349