

平成 21 年 6 月 10 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2005～2008

課題番号：17370059

研究課題名（和文）MCM ヘリカーゼ機能発現調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of mechanisms of MCM helicase function

研究代表者

石見 幸男 (Ishimi Yukio)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：80159772

研究成果の概要：真核細胞の DNA 複製ヘリカーゼである MCM 複合体に関して、次の点を明らかにした。(1)細胞周期やチェックポイント依存的な MCM4 のリン酸化、(2)MCM4/6/7 ヘリカーゼを抑制する MCM2 タンパク質の一本鎖 DNA 結合能の同定、(3)MCM と相互作用する因子と MCM2-7 間の結合様式、および(4)MCM4/6/7 を特異的に阻害する抗生物質であるヘリキノマイシンの同定、である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
17 年度	8,100,000	0	8,100,000
18 年度	2,200,000	0	2,200,000
19 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
20 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
総計	14,700,000	1,320,000	16,020,000

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、DNA ヘリカーゼ、MCM タンパク質

1. 研究開始当初の背景

MCM タンパク質は、様々な実験結果や観察から、DNA 複製フォークを進行させる、複製ヘリカーゼとして機能すると考えられている。このことを支持する結果として、私は MCM4/6/7 複合体が試験管内で 2 本鎖を巻き戻す DNA ヘリカーゼ活性を発揮することを見出している。一方で、MCM2-7 なる複合体がヘリカーゼとして機能することを示唆する細胞レベルの結果が報告されている。つまり、複製ヘリカーゼの本体がどの MCM 複合体であるのかは不明である。また、MCM ヘリカーゼの機能は様々な局面や要因によって制御されると考えられる。そのことを支持する結果

として、MCM2-7 タンパク質が様々な他のタンパク質と相互作用する可能性が示唆されている。しかし、その相互作用の詳細は不明である。

2. 研究の目的

MCM4/6/7 ヘリカーゼ活性の調節機構を理解するために、細胞周期と DNA 複製障害依存的に起こる MCM4 のリン酸化を明らかにするとともに、MCM4/6/7 ヘリカーゼの活性を制御すると考えられる MCM2 タンパク質の分子解剖を行い、さらに MCM 相互作用因子であるクラスピン、Rb および TIM-TIPIN タンパク質と MCM2-7 の直接的な結合を明らかにする。加え

て、MCM ヘリカーゼの特異的な阻害物質を同定するために、DNA ヘリカーゼを阻害することが知られているヘリキノマイシンのMCM4/6/7ヘリカーゼに対する感受性を、他の様々な酵素の感受性と比較することで、ヘリキノマイシンのMCMヘリカーゼ阻害剤としての可能性を追求する。

3. 研究の方法

MCM4 のリン酸化については、アミノ末端領域における部位特異的なリン酸化抗体を用いて、DNA 複製チェックポイント作動時や細胞周期特異的に起こるリン酸化を調べた。ヒト MCM2 タンパク質の構造ドメインを決定するために、小麦胚芽液を用いた無細胞タンパク質合成系で全長のヒト MCM2 タンパク質を発現させた。精製した MCM2 タンパク質を、タンパク質分解酵素であるトリプシンにより限定的に分解させ、生じた分解断片の由来を、アミノ末端からのアミノ酸配列の分析によって確定した。このようにして決定した MCM2 の構造ドメインの情報を基に、MCM2 の各部分断片を、小麦胚芽系により合成した。それらの断片の生化学的な性質 (MCM4/6/7 ヘリカーゼ阻害活性、一本鎖 DNA 結合活性、および MCM4/6/7 複合体形成の阻害活性など) を調べた。MCM4/6/7 のヘリカーゼ活性は、環状の一本鎖 DNA に相補的に結合した 17 マーオリゴヌクレオチドを、ATP 依存的に剥がす能力によって測った。

ヘリキノマイシンに対する MCM4/6/7 ヘリカーゼの感受性を調べる実験で、本薬剤の他の酵素活性に対する効果を調べた。その酵素には、ヒト DNA 合成酵素 α 、プライマーゼ、Werner ヘリカーゼ、RECQL4 ヘリカーゼ、および一本鎖 DNA 結合タンパク質 (RPA) などが含まれる。DNA 合成酵素 α の活性は、DNaseI 処理した活性化 DNA を鋳型プライマーとして用い、プライマーゼの活性は、polydT を鋳型として用いて測定した。ヘリキノマイシンのヒト細胞 DNA 複製に対する影響は、BrdU の細胞 DNA への取り込みへの効果を調べることにより決定した。DNA 中の BrdU は、特異抗体を使った免疫染色法によって検出し、その蛍光の程度を定量化することにより阻害効果を表した。

複製タンパク質間の相互作用を調べるために、2つのタンパク質を夜盗蛾由来細胞で共発現させ、片方のタンパク質を、特異抗体を用いて免疫沈降させる実験で、もう一方のタンパク質が共沈降するかどうかで結合を判定した。

4. 研究成果

(1)細胞周期やチェックポイント依存的な MCM4 のリン酸化

ヒトやマウスの MCM4 のアミノ末端領域

にはサイクリン依存性キナーゼによってリン酸化される部位が、少なくとも6カ所存在する。我々は、これまでに、それらの部位特異的なリン酸化を認識する抗体を用意している。一方で、MCM4 が、DNA 合成を阻害した時に作動する DNA 複製チェックポイント系でのリン酸化の基質になることを見出している。この状況で、DNA 複製チェックポイント作動時や通常の細胞周期進行時で、6カ所の内、どの部位のリン酸化が優先的に起こるのかを検討した。その結果、表1に示すように、7、19、32、54、および110位のリン酸化は細胞周期のM期に優先的に起こるが、その内54位のリン酸化は、CDK 以外のキナーゼが関与すると考えられた。7、19、および110位のリン酸化はチェックポイント作動時に特に亢進した。それらの部位でのリン酸化は、正常細胞に比べがん細胞において減少が見られ、方や、細胞老化に伴って増加したことから、細胞増殖と負に相関すると言える。よって、これら部位 (7、19、および110位)での MCM4 のリン酸化は、細胞増殖や DNA 複製に対し負に機能すると考えられる。一方で、クロマチン結合性の MCM4 でこれら部位でのリン酸化が亢進していることから、CDK は、クロマチン上の MCM4 を、これら部位でリン酸化することで、MCM 機能を抑制することが考えられる。このように、MCM4 の部位特異的なリン酸化が数種の異なる機能を果たすことを示唆したのは、本研究が初めてである。今後さらに詳細な研究が求められる。

リン酸化部位	3	54	7	19	110	32
M期での上昇	-	+	+	+	+	+
CDKの役割	-	-	+	+	+	+
クロマチン結合性との相関	+/-	+/-	+	+	+	+(核小体)
細胞増殖との相関	+/-	+	-	-	ND	+
チェックポイント反応性	+	+	++	++	++	+
EB感染宿主DNA合成阻害	ND	ND	ND	+	+	ND

表1. MCM4 の部位特異的なリン酸化の動態
各指標において、各部位でのリン酸化の度合いを、-, +/-, +, ++で表した。

(2)MCM4/6/7 ヘリカーゼを抑制する MCM2 タンパク質の一本鎖 DNA 結合能の同定

ヒト MCM2 の構造ドメインを明らかにする目的で、ヒト MCM2 をトリプシンで限定的に分解した。分解断片を、それらのアミノ末端側からの配列決定により、同定した。その結果、図1にあるように、主に3つのドメインから構成されることが明らかになった。

それは、1-147(#6-1), 148-677 (#1),そして678-895(#4)である。この構造情報を基に、様々な MCM2 断片を合成し、精製したものについて、MCM4/6/7 ヘリカーゼ阻害活性、一本鎖 DNA 結合活性および T 抗原ヘリカーゼ阻害活性などを調べた。その結果をまとめたものを図 1 に示す。カルボキシ末端領域に MCM4/6/7 ヘリカーゼ阻害活性が認められた。この断片は、T 抗原ヘリカーゼも阻害することから、MCM に直接的に作用しない機構によってヘリカーゼを阻害することが考えられる。このことと矛盾しない結果として、この断片自身に、一本鎖 DNA に結合する活性が認められた。おそらく、この断片は、DNA ヘリカーゼ基質の一本鎖 DNA 領域に結合することで、結果的に MCM4/6/7 ヘリカーゼの DNA 上での移動を阻害することが考えられる。この MCM2 の一本鎖 DNA 結合活性の生理的な意味について以下のとおりである。DNA 複製フォークにおいて、MCM2 が鋳型 DNA 上のヒストンの複製後 DNA への再結合に機能する。その反応時に MCM2 は、フォーク部分の一本鎖 DNA と相互作用する必要がある。その時に、カルボキシ末端領域の一本鎖 DNA 結合活性が機能する可能性が考えられる。今後は、上記の可能性を含めて、MCM2 の一本鎖 DNA 結合活性の生理的な役割を検証する必要がある。

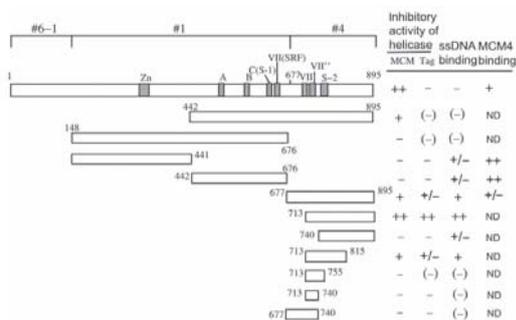


図 1. ヒト MCM2 タンパク質の構造ドメインと MCM2 断片の生化学的機能

全長の MCM2 内の Zn フィンガーや AAA+ ファミリーの保存されたモチーフが上部に記されている。MCM2 各断片のヘリカーゼ阻害活性、一本鎖 DNA 結合活性および MCM4 結合能の度合いが、-, +/-, +, ++によって示されている。

(3)MCM と相互作用する因子と MCM2-7 間の結合様式

MCM ヘリカーゼの機能制御機構を明らかにする目的で、MCM との相互作用が示唆さ

れている各種タンパク質と MCM2-7 タンパク質間の直接的な結合の有無と、結合の特異性を、組換えバキュロウイルスを使った昆虫細胞内での共発現実験と引続く免疫沈降実験から調べた。各タンパク質は基本的に、HeLa 細胞の mRNA から RT-PCR 法によってクローニングしたものを基に、発現系を構築した。

DNA 複製チェックポイント作動時に、複製フォークの構造を維持する機能を持ち、MCM の機能を制御すると考えられる TIM と TIPIN の両タンパク質は MCM2 を除く MCM3-7 のすべてに結合性を示した(表 2)。一方で定性的な実験ながら、同じチェックポイント機能をもつ Claspin は MCM6 との結合性のみが認められた。細胞周期制御機能をもつ Rb と p27 は MCM7 との相互作用が示唆されている。Rb は MCM3 と強く結合するとともに、MCM6 と MCM7 との結合も検出された。一方で、p27 は、どの MCM とも結合性を示さなかった。ここで同様な条件下で、MCM2 とヒストン H3 との結合性が確認されている。この実験結果から、様々な MCM 相互作用因子は、独特な結合の特異性を有することが言える。このような結合を通じて、MCM 機能が制御されることが考えられる。今後は、本研究で見出した、結合の特異性についてさらに検討するとともに、それが、どのように MCM 機能の制御に繋がるのかを明らかにする必要がある。そのことで、MCM ヘリカーゼ制御の分子機構が最終的に理解される。

	MCM2	MCM3	MCM4	MCM5	MCM6	MCM7
TIM	+/-	++	+++	++	++	+
TIPIN	+/-	+++	++	++	++	+++
Claspin	-	-	-	-	++	-
Rb	-	++	-	-	+	+
p27	-	-	-	-	-	-
H3	++	ND	ND	ND	ND	ND

表 2. MCM 相互作用因子と MCM2-7 タンパク質との結合

組換えバキュロウイルスを用いて、MCM 相互作用因子と各 MCM タンパク質を昆虫細胞で共発現させ、免疫沈降実験で両タンパク質の結合性を調べた。結合の強さの度合いを、-, +/-, +, ++によって示した。ND: 未決定。

(4)MCM4/6/7 を特異的に阻害する抗生物質であるヘリキノマイシンの同定

ヘリキノマイシン(HQ)はヒト細胞中の一種の DNA ヘリカーゼを阻害し、ヒト細胞

DNA 複製を阻害することが分かっている抗生物質である。DNA 複製に対する HQ の 50% 阻害濃度 (IC₅₀) は、1-3 μg/ml である。このことは HeLa 細胞 DNA への BrdU の取り込みに対する HQ の効果を、蛍光顕微鏡で測定する実験からも確かめられた。HQ の DNA 複製阻害における標的タンパク質を明らかにする目的で、MCM4/6/7 ヘリカーゼを含む様々な酵素に対する HQ の効果を調べた (図 2)。その中には、ヒトの DNA 合成酵素 α/ プリマーゼ複合体、RPA、Werner ヘリカーゼ、RECQL4 ヘリカーゼおよび SV40T 抗原ヘリカーゼである。MCM4/6/7 ヘリカーゼが最も HQ に感受性が高く、IC₅₀ は 2.4 μg/ml であった。他の酵素では、DNA 合成酵素 α の感受性が高く、その IC₅₀ は 6.5 μg/ml であったが、その他の酵素については、HQ にほとんど抵抗性であった。以上のことから、DNA 複製阻害に対する HQ の標的として、MCM ヘリカーゼや DNA 合成酵素が考えられる。MCM4/6/7 の ATP 分解活性を一本鎖 DNA 存在下に測定した時のみ HQ の阻害効果が認められたことから、HQ は MCM4/6/7 複合体と一本鎖 DNA との相互作用に影響を与えることが考えられる。今回の結果は、DNA 複製研究における HQ の有用性を提示するとともに、HQ が抗がん物質として利用される場合の分子的な基盤情報を与える。今後は、細胞内での HQ と MCM 複合体の関係性をより明確にするとともに、HQ の DNA 複製への効果をより詳細に調べる必要がある。

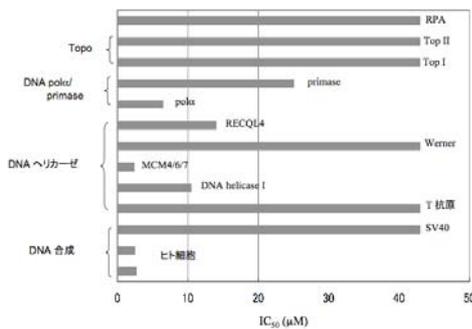


図 2. 各種複製タンパク質のヘリキノマイシンに対する感受性

機能別に分類された様々な酵素 (DNA ヘリカーゼ、DNA 合成酵素、およびトポイソメラーゼ) および細胞 DNA 合成に対するヘリキノマイシンの効果を、50%阻害濃度で表した。

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 7 件)

1. Ishimi, Y., Sugiyama, T., Nakaya, R., Kanamori, M., Kohno, T., Enomoto, T. & Chino, M. (2009) Effect of heliquinomycin on the activity of human MCM4/6/7 helicase FEBS J. in press, 査読あり
2. Suzuki, T., Kohno, T. & Ishimi, Y. DNA helicase activity in purified human RECQL4 protein (2009) J. Biochem. in press, 査読あり
3. Takezawa, J., Ishimi, Y. and Yamada, K. (2008) Proteasome inhibitors remarkably prevent translesion replication in cancer cells but not normal cells. Cancer Sci., 99, 863-871, 査読あり
4. Komamura-Kohno, Y., Tanaka, R., Omori, A., Kohno, T. and Ishimi, Y. (2008) Biochemical characterization of fragmented human MCM2 FEBS J., 275, 727-738, 査読あり
5. Kudoh, A., Daikoku, T., Ishimi, Y. Kawaguchi, Y., Shirata, N., Iwahori, S., Isomura H. & Tsurumi, T. (2006) Phosphorylation of MCM4 at sites inactivating DNA helicase activity of the MCM4-MCM6-MCM7 complex during Epstein-Barr virus productive replication. J. Virol., 80, 10064-10072, 査読あり
6. Komamura-Kohno, Y., Karasawa-Shimizu, K., Saitoh, T., Sato, M., Hanaoka, F., Tanaka, S. and Ishimi, Y. (2006) Site-specific phosphorylation of MCM4 during the cell cycle in mammalian cells. FEBS J., 273, 1224-1239, 査読あり
7. Zhu, Y., Ishimi, Y., Tanudji, M. and Lees, E. (2005) Human CDK2 inhibition modifies the dynamics of chromatin-bound minichromosome maintenance complex and replication protein A, Cell cycle, 4, 1254-1263, 査読あり

[学会発表] (計 9 件)

1. 中谷亮、石見幸男、RPA と DNA 複製関連タンパク質との結合、日本分子生物学会 / 日本生化学会合同大会、2008/12/09-12
2. 石見幸男、杉山隆史、鈴木雄大、河野俊之、千野信、抗生物質ヘリキノマイシンの MCM4/6/7 ヘリカーゼに対する効果、日本分子生物学会 / 日本生化学会合同大会、2008/12/09-12
3. 沼田祐樹、石原将太、長谷川直子、石見幸男、MCM2-7 と MCM 相互作用因子との結合、日本分子生物学会 / 日本生化学会合同大会、2008/12/09-12
4. 鈴木雄大、石見幸男、ヒト RECQL4 のヘリカーゼ活性、日本分子生物学会 / 日本生化学会合同大会、2008/12/09-12
5. 石見幸男、DNA 複製に機能する DNA ヘリカー

- ゼの活性, 文部科学省特定領域研究 (染色体サイクルの制御ネットワーク) 第一回公開領域会議, 2008/01/07
6. 石見幸男, 河野有紀, 田中利好, 河野俊之, MCM2 タンパク質のヒストンシヤペロン活性, 日本分子生物学会年会/日本生化学会年会合同大会, 2007/12/11-15
 7. 鈴木雄大, 石見幸男, ヒトRECQL4 のヘリカーゼ活性の解析, 第30回日本分子生物学会年会/第80回日本生化学会年会合同大会, 2007/12/11-15
 8. Komamura-Kohnno, Y., Tanaka, S., Omori, A. and Ishimi Y. Molecular dissection of human MCM2 protein. Cold Spring Harbor Meeting on Eukaryotic DNA replication, 2007/09/05-09
 9. Ishimi, Y., Komamura-Kohnno, Y., Tanaka, S. Saitoh, T., Sato, M., Kato, C., Song, S.-Y., Okayasu, I. and Yamada, K. Site-specific phosphorylation of MCM4 in human cells. Cold Spring Harbor Meeting on Eukaryotic DNA replication, 2005/09/07-11

[図書] (計 3 件)

1. 石見幸男, 複製開始と進行におけるMCMタンパク質複合体 (染色体サイクル (正井, 升方, 釣本, 仁木, 篠原編) pp364-369) 蛋白質核酸酵素, 2009、査読なし
2. 石見幸男, DNA複製開始とその制御機構 (細胞周期集中マスター (北川編) pp1327-1334) 実験医学, 2006、査読なし
3. 石見幸男, MCMタンパク質複合体の機能制御 (細胞周期の最前線 (中山編) pp61-67)、実験医学, 2005、査読なし

[その他]

ホームページ:

<http://idna.sci.ibaraki.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石見幸男

茨城大学・理学部・教授

研究者番号: 80159772

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし