

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007~2008  
 課題番号： 19570145  
 研究課題名 (和文) MCM ヘリカーゼ複合体による染色体複製制御の酵素学的解析  
 研究課題名 (英文) Enzymatic analysis of the chromosome replication regulation by MCM helicase complex

研究代表者  
 高井 裕子 (Zhiying You)  
 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・主任研究員  
 研究者番号：90332270

研究成果の概要：MCM 複合体は複製フォークにおける DNA ヘリカーゼとして機能する。昨年度に、MCM のヘリカーゼ活性は Cdt1 と結合して複合体を形成しより強いヘリカーゼ活性を示すこと、さらに Cdt1 は ATP に結合する可能性を見出した。本年度は、Cdt1 配列上に ATP 結合タンパクとの相同配列を見出し、その保存配列の変異体を作製した。この変異体は in vitro で ATP 結合能をほぼ完全に消失していた。さらにこれと同じ変異が drosophila の発生異常の原因として同定されていることが明らかとなった。以上の事実は Cdt1 の ATP 結合は、その機能制御に重要な役割を果たすことを示す。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,100,000 円	630,000 円	2,730,000 円
2008年度	1,400,000 円	420,000 円	1,820,000 円
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000 円	1,050,000 円	4,550,000 円

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

キーワード：酵素の作用機作と調節

## 1. 研究開始当初の背景

染色体複製開始は、細胞周期の進行において少なくとも 2 段階の制御を受けている。1 つは pre-replication complex (pre-RC) の形成であり、もう 1 つは pre-RC の活性化である。このそれぞれのステップに重要な役割を果たすのが、MCM 蛋白質である。申請者はマウス MCM4, 6, 7 からなる 6 量体が DNA ヘリカ

ーゼ活性を内在的に持つことを世界に先駆けて明らかにした。この発見は、MCM が二本鎖 DNA 巻き戻しというゲノム複製の中心的反応に関与する可能性を指摘した。我々は、その後、MCM の各サブユニットの MCM ヘリカーゼへの関与と、リン酸化によるヘリカーゼ活性の制御を明らかにした。また、MCM のヘリカーゼを活性化する鋳型 DNA の解析から、ヒ

トの複製起点配列などのチミンを多く含む一本鎖 DNA が特異的にヘリカーゼ活性を促進することを明らかにした。一方、MCM4, 6, 7 ヘリカーゼの活性は、複製ヘリカーゼとしては不十分であることも明らかになり、他の活性促進分子が必要であることも示唆された (You, NAR 2005)。これに関連して、申請者は最近 Cdt1 が MCM に結合しそのヘリカーゼ活性を著しく促進することを発見した (You, JBC 2008)。また、複製フォークにおいては、ヘリカーゼの他に、複製装置、チェックポイント制御因子、組換え、修復因子、クロマチン形成制御因子、染色体接着制御因子など種々のタンパク質が、巨大な複製フォーク複合体を形成し、複製フォークの安定な維持と進行を担っていることが明らかとなってきた。MCM は、その複合体において中心的な役割を果たす。

## 2. 研究の目的

本研究では、Mcm4, 6, 7 ヘリカーゼの活性制御機構をおもに生化学的に調べることにより、ゲノム複製開始、伸長とその制御の機構を明らかにする。特に、複製複合体/フォーク制御因子との相互作用による制御を重点的に解析する。具体的な達成目標は、① Mcm 複合体 (Mcm4, 6, 7 と Mcm2 から 7) と他の複製開始/複製フォーク補助因子 (Cdt1-Geminin, Cdc45, GINS, primase-polymerase a) との相互作用、および MCM ヘリカーゼ活性への影響、② Cdt1 や他の因子が、ヘリカーゼ活性をもたない Mcm2-7 ヘテロヘキサマーの活性に及ぼす影響の解析。

## 3. 研究の方法

複製開始機構およびMcm複合体の複製フォークにおける役割を解析するためには、種々のアプローチが可能であるが、Mcm複合体の有する種々の活性に対するリン酸化やタンパク質相互作用の影響を、精製したタンパク質を用いて生化学的に調べる。**精製タンパク質を用いた酵素学的解析**：Mcmヘリカーゼと種々の因子との相互作用、およびその相互作用のヘリカーゼ活性などへの影響を、精製したタンパク質を用いて詳細に解析する。

### (1) 精製したタンパク質での解析

種々の Mcm 複合体、ヘリカーゼ補助因子 (MCM の ローテング 因子 Cdt1,

GINS, Polymerase-primase)、複製フォーク保護因子 (Claspin, Tim1-Tipin 複合体) などを昆虫細胞で増産精製し、これらの因子の物理的相互作用、核酸との相互作用、機能的相互作用 (MCM ヘリカーゼ活性への影響など) を酵素学的に解析する。

### (2) MCM 複合体の活性化(ホロヘリカーゼの同定)と再構成

①MCM2-3-4-5-6-7複合体はDNAヘリカーゼ活性を示さない。Cdt1, Cdc45-GINS, 複製フォーク保護因子などの組み合わせにより、この DNA ヘリカーゼ活性を活性化できるかどうか検討する。

②MCM4/6/7 と MCM2-7 複合体と相互作用する因子を pull down、共免疫沈降などで同定し、ヘリカーゼ活性におよぼす影響を調べる。

③同定した新規 MCM 結合タンパク質を作製し、MCM ヘリカーゼにおよぼす影響を検討する。

## 4. 研究成果

本研究では、Mcm4, 6, 7ヘリカーゼの活性制御機構を生化学的に調べることにより、ゲノム複製開始とその制御の機構を明らかにする。精製したCdt1およびMCMタンパク質複合体を用いた実験から以下のことが明らかになった。①Cdt1はMcm2, Mcm4/6と相互作用して、MCM複合体と共複合体を形成する。②Cdt1は、Mcm4/6/7とMcm2/3/4/5/6/7複合体のDNA結合活性を促進するとともに、Mcm4/6/7のヘリカーゼ活性を著しく促進する。③Cdt1と強く結合するGemininの添加で、Cdt1のMcm4/6/7のヘリカーゼ活性の促進が解除され、Mcm-Cdt1複合体が解離される。一方、Cdt1と結合できない変異gemininの添加はヘリカーゼ活性とMcm-Cdt1-DNA複合体に影響を与えない。これらの結果はCdt1が特異的にMCMのDNA結合とヘリカーゼ活性を促進することを示す。④UVクロスリンク法の実験からCdt1タンパク質はATPに結合することが示された。⑤ATP存在下では、Cdt1はMcm4/6/7と、分子量670kDaぐらいの共複合体(2個の三量体Mcm4/6/7[六量体]と3個のCdt1分子から構成される)を形成する。⑥Cdt1に保存される残基の点変異により、ATP結合、Mcmとの共複合体形成、DNA結合及びヘリカーゼの促進能のいずれも減弱した。以上の結果から、Cdt1タンパク質はpreRC形成において、ATPに結合し、MCMと複合体を形成して、MCMのDNA上へのloadingを促進する可能性が示唆された。

また、複合体の高次構造を変化させることにより、DNAへの親和性およびヘリカーゼ活性を増加させていると考えられる。大腸菌複製開始においては、DnaA、DnaBおよびDnaCが開始に必須なATP結合タンパク質であることが知られ、DnaCはATP結合に依存して、DnaBと複合体を形成しそのヘリカーゼ活性を促進する。上記の結果は、Cdt1はDnaCと機能的に極めて類似していることを強く示す。

H20年度は、Cdt1配列上に、典型的なATP結合ドメインとは異なる配列を有するATP結合タンパクとの相同配列を見出し、その保存配列の変異体を作製した。この変異体はin vitroでATP結合能をほぼ完全に消失していた。さらに、これと同じ変異がショウジョウバエの発生異常の原因として独立に同定されていることが明らかとなった。以上の事実は、Cdt1のATP結合は、その機能制御に重要な役割を果たすことを示す。

DNA プライマーゼはDNA複製において、RNA断片（プライマー）を合成する酵素である。バクテリアでは、DNA プライマーゼは複製フォークにおいてDNAヘリカーゼに結合し、複合体として互いに活性を促進する。しかし、真核細胞では、プライマーゼとヘリカーゼの関連する研究はまだ進んでいなかった。我々は、精製したhuman DNA プライマーゼとMCM複合体を用いて、相互作用と活性制御について生化学的に調べた。免疫沈降によりhuman DNA プライマーゼ(p48とp58サブユニット)はMCM2-7複合体と共沈降した結果から、MCM2-7複合体とhuman DNA プライマーゼが物理的に相互作用していることを見出した。また、プライマーゼがMCMヘリカーゼ活性を阻害する。これはプライマーゼの一本鎖DNA結合能による基質DNAとの競合反応がもたらした可能性がある。実際Gel-shift assayでは、MCMとプライマーゼは一本鎖DNA上に三者複合体が形成する。さらに、プライマーゼの活性がMcm4-6-7複合体およびMcm2-3-4-5-6-7複合体により促進された。これらの結果から、真核細胞のMCMヘリカーゼは複製フォークにおいてDNAプライマーゼと複合体を形成し、その活性を促進することが示唆された。現在、MCMヘリカーゼによるDNAポリメラーゼ・プライマーゼのDNA合成への影響を解析している。

## 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 1 件)

- ① Zhiying You and Hisao Masai. “Cdt1 forms a complex with the minichromosome maintenance protein (MCM) and activates its helicase activity”. *J Biol. Chem.* **283**. 24469-24477. 2008. 査読あり。

[学会発表] (計 5 件)

- ① Zhiying You and Hisao Masai. “Cdt1 forms a complex with MCM and activates its helicase activity”. EMBO Conference on “Replication & Segregation of Chromosomes” 2008. 6. 16-20. Geilo, Norway

- ② Zhiying You and Hisao Masai. “Interaction of Mcm complexes with Cdt1 protein: Effect of Cdt1 on Mcm helicase activity”. 6th 3R (Replication, Recombination, Repair) symposium. 2008. 10. 27-30. Tsumagoi, Shizuoka.

- ③ 森山賢治, 高井裕子, 正井久雄. “EBウイルス oriP上への無細胞系pre-RC構築”. 日本分子生物学会(BMB)2008. 2008. 12. 9-12. 神戸ポートアイランド.

- ④ 谷口莉菜, Zhiying You, 正井久雄, 釣本敏樹. クランプロード複合体とMCMサブ複体の相互作用解析. 日本分子生物学会(BMB)2008. 2008. 12. 9-12. 神戸ポートアイランド.

- ⑤ Zhiying You. “Cdt1はMCMヘリカーゼと複合体を形成し、そのヘリカーゼ活性を促進する”. 第19回DNA複製・分配ワークショップ. 2008. 3. 4-7. 静岡県伊豆市・ラフォーレ修善寺(口頭発表).

[図書] (計 2 件)

- ① Zhiying You, 正井久雄 ” 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」25, 609-613, 2007. 査読あり。

- ② Zhiying You, 正井久雄 ” UVクロスリンキング法” 実験医学別冊「分子間相互作用解析バンドブック」19, 164-167, 2007. 査読あり。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高井 裕子 (Zhiying You)  
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・主任研究員  
研究者番号：90332270

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者