

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06617

研究課題名(和文) 分裂期レプリソーム脱離機構の解明

研究課題名(英文) Studying the molecular mechanism of replisome disassembly in mitosis

研究代表者

橋本 吉民 (Hashimoto, Yoshitami)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：50616761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムDNAの複製は本来、細胞分裂開始前には終了していなければならない。本研究では、DNA複製を中断させた状態から分裂期へ進行させた場合、どのような対処機構が働くかについてツメガエル卵無細胞系を用いて解析した。分裂期誘導と同時に複製再開させた場合は、一時的な遅延の後に分裂期へ進行すること、また、複製再開させずに分裂期誘導を行った場合は、ヌクレアーゼによる複製中間体プロセッシングを経て分裂期へ進行することが明らかになった。これらの対処機構は、DNA複製と細胞分裂が同時に起きないことを保証するために機能すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物では、DNA複製と細胞分裂は細胞周期の異なる時期に起きるよう制御されており、本来両立し得ない現象である。しかし、細胞周期制御に異常を持つ癌細胞などでは、ゲノム局所的には未複製の領域があるにも関わらず分裂期へと進行し、ゲノム不安定化が増大するケースが知られている。卵無細胞系で見られた現象(複製再開による分裂期進行の遅延、ヌクレアーゼによる複製中間体のプロセッシング)は、正常な細胞での応答であり、癌細胞ではこれらの仕組みが破綻することでゲノム不安定化が助長される可能性を示唆している。

研究成果の概要(英文)：Genome duplication must be complete before initiation of mitosis. In this study, I have examined the consequences of forced mitotic entry after interruption of DNA replication progression using *Xenopus* cell-free system. I have found that mitotic entry was temporally delayed when replication restart was simultaneously allowed. By contrast, processing of replication intermediates by a nuclease was required to allow mitotic entry when DNA replication was continuously interrupted. These responses are considered to be a mechanism ensuring that DNA replication and mitosis never occurs at the same time.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：DNA複製 細胞周期 細胞分裂 ゲノム不安定化 ツメガエル卵無細胞系 レプリソーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) レプリソームは、染色体 DNA 複製に必要なタンパク質超分子複合体である。真核生物では、複製開始におけるレプリソーム形成過程について精力的に研究されてきたが、レプリソーム脱離過程は最近までほとんど研究されていなかった。レプリソーム脱離は、細胞周期の S 期ではレプリコンの境界において DNA 複製が終了する場合や、複製ストレスなどで停止した複製フォークが崩壊する場合などに起きることが知られている。これらの場合以外に、細胞周期を分裂期へ誘導することにより停止した複製フォークからレプリソーム脱離が起きることを代表者は以前の研究で見出していた (Hashimoto & Tanaka, *Biochem Biophys Res Commun* 2018)。この仕組みを「分裂期レプリソーム脱離機構」と命名し、分子機構と生理的意義を明らかにしたいと考えたことが研究開始当初の動機であった。

(2) 複製終了時のレプリソーム脱離は、対面する二つの複製フォークが終結部位で収束した時に起きる。このとき、レプリソームのコア因子である MCM7 が Cullin 型ユビキチン (Ub) リガーゼによるポリ Ub 化を受け、それを p97/VCP/cdc48 複合体が認識してレプリソーム全体を脱離させると考えられている。一方、DNA 損傷やヌクレオチド基質枯渇などの複製ストレスが原因で停止したフォークは、長時間の停止状態が続くと不可逆的に不活性化され、レプリソーム脱離が起きるが、このフォーク崩壊過程での脱離機構の詳細は不明である。停止したフォークでは MCM7 の Ub 化が検出されないことから、複製終了時とは異なる仕組みが働くことが予想される。

複製ストレスに曝されたフォークは、様々な構造変化を起こすことが知られている。その一つにフォーク退行という現象がある。フォーク退行が起きると、フォーク進行の際にヘリカーゼによって開かれた鋳型 DNA が再び 2 本鎖を形成し、押し出された新生鎖同士も 2 本鎖を形成することで、ニワトリの足様の構造 (chicken foot 構造) を生じる。複製再開に備えてフォークを一時的に安定化する役割があると現在では考えられているが、フォーク退行の際にレプリソームが維持されるのか、脱離するのか不明である。他の構造変化として、新生鎖 DNA 分解という現象がある。これは代表者らが真核生物では最初に提唱し (Hashimoto *et al*, *Nat Struct Mol Biol* 2010)、現在広く認知されるようになった現象であるが、BRCA1/2 や Rad51 などの組換え因子がフォーク安定化に寄与しており、それら機能を欠損すると Mre11 ヌクレアーゼによる新生鎖 DNA の異常な切断が起きる。退行したフォークに存在する 1 本鎖 DNA 部分を Rad51 が保護していると現在では考えられている。新生鎖 DNA 分解とレプリソーム脱離がどのように関係しているかは不明である。

2. 研究の目的

代表者が発見した「分裂期レプリソーム脱離経路」が働くためには、CDK 活性とポリ Ub 化が必要であることを既に報告していたが (Hashimoto & Tanaka, *Biochem Biophys Res Commun* 2018) それらに加えて、Mre11 ヌクレアーゼ活性が必要であるという予備的結果を研究開始当初に得ていた。これらの結果は、分裂期レプリソーム脱離には Ub 化の標的とその責任酵素が存在すること、また、Mre11 による何らかのフォーク構造の切断が起きることを示唆している。

そこで本研究では、分裂期レプリソーム脱離機構について、特に以下の点を明らかにすることを当初の目的として研究に着手した。

(1) Ub 化による制御：レプリソーム因子における Ub 化標的、および責任酵素の生化学的同定を試みる。代表者の以前の研究で、Cullin 型 Ub リガーゼの阻害剤は脱離を阻害する効果がないことを明らかにしており、間期での複製終了時とは異なる酵素が働くことが予想された。(しかし、本研究の期間内に複数の海外グループによって先んじて、標的と責任酵素が MCM7 と TRAIIP であることが報告されたため、Ub 化制御については途中で断念した。)

(2) Mre11 ヌクレアーゼの役割：Mre11 ヌクレアーゼの関与は、分裂期レプリソーム脱離にフォーク退行や新生鎖 DNA 分解が関わっている可能性を示唆する。フォーク退行因子や Mre11 と協調して働く他のヌクレアーゼの関与について調べ、どのようなフォーク構造の変化がレプリソーム脱離に必要なのか明らかにする。また、電子顕微鏡観察を用いてフォーク構造変化の直接的な追跡を試みる。

(3) 分裂期レプリソーム脱離の生理的意義：この経路を阻害した際に細胞生存率や DNA 損傷の蓄積状態にどのような影響があるのかを調べ、生理的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ツメガエル卵無細胞系を用いた生化学的解析：「分裂期レプリソーム脱離機構」は、代表者が過去にツメガエル卵無細胞系を用いて明らかにしたものである。この系では、通常では細胞が死滅するような極端な実験条件下でも生化学的解析が可能であるという利点がある。無細胞系に用いる卵抽出液には、間期と分裂期に二種類があり、間期で DNA 複製を再現した後、分裂期を加えて細胞周期進行を誘導する。レプリソーム脱離や分裂期への進行は、クロマチン画分を単離してレプリソーム因子や分裂期因子に対するイムノプロットで検出する。Ub 化制御やヌクレアーゼの役割の解析については、各種阻害剤や Ub 変異体を卵抽出液に直接添加し、影響

を調べることができる。また、特異的抗体を結合したビーズで卵抽出液を処理することで、特定の因子を免疫除去して影響を調べることができる。

(2) フォーク構造の電子顕微鏡解析：卵抽出液中で形成された複製フォークを in vivo クロスリンクして構造を保持した状態で単離し、ロータリーシャドーイング法により陰影をつけて電子顕微鏡観察を行うことで、フォーク退行の割合などを解析する。

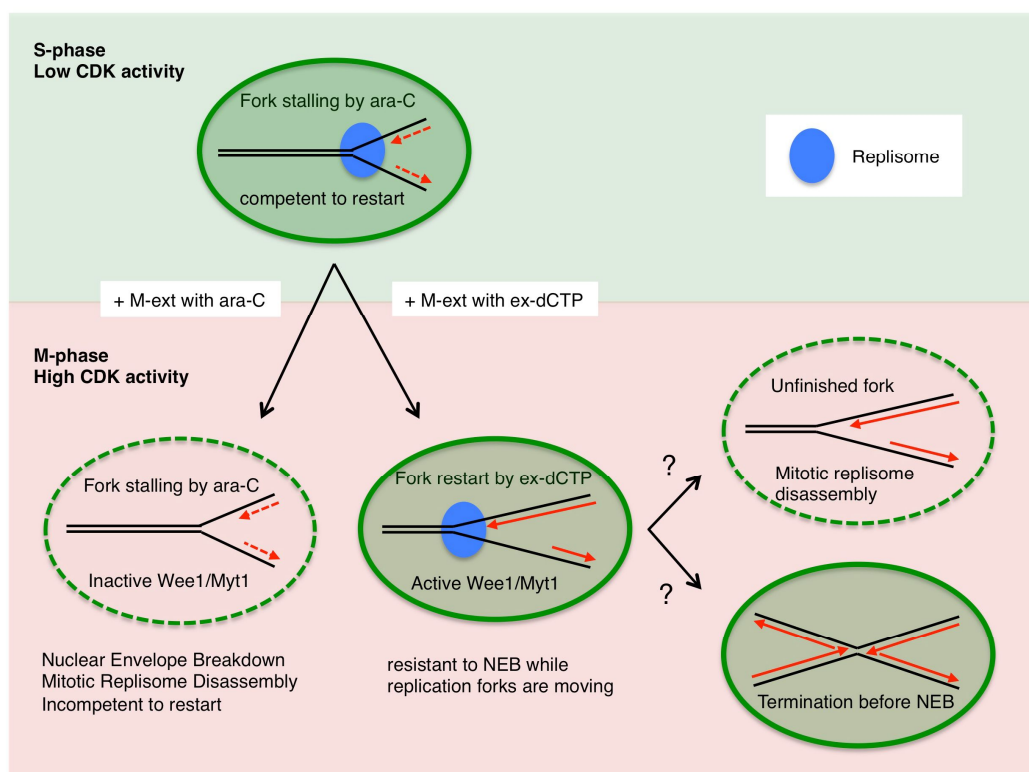
(3) 培養細胞を用いた生理的意義の検討：卵無細胞系での結果がどの程度普遍的なものであるか検討する。培養細胞を用いて分裂期レプリソーム脱離経路を阻害した場合、正常細胞では大きな影響を受けない軽度な複製ストレスにより細胞生存率にどの程度の影響があるか調べる。

4. 研究成果

(1) 分裂期レプリソーム脱離経路では、複製ストレスを維持したまま分裂期へ進行させることで、停止した複製フォークにおいてレプリソーム脱離が起きる。これに対して、分裂期への誘導と同時に複製ストレスを解除した場合には、レプリソーム脱離がどのように起きるかについても卵無細胞系による解析を行うことにした。

分裂期への誘導と同時に複製ストレス解除を行うと、間期で解除した場合と同等レベルの複製活性が得られたことから、効率的に複製再開することが分かった。その後の分裂期への進行についてモニターしたところ、複製再開させた場合は核膜崩壊のタイミングが遅延することが明らかとなった。さらに、この遅延には M 期 CDK 活性を調節する酵素である Wee1/Myt1 キナーゼが関与することを明らかにした。また、分裂期への誘導後どの程度まで複製再開可能であるのかについても調べた結果、核膜崩壊前(卵無細胞系では誘導後 15 分程度が通常のタイミングである)に複製ストレス解除を行うと再開可能であるが、核膜崩壊後では複製再開不可能となることが分かった。なお、分裂期誘導により、複製再開の有無に関わらず最終的にレプリソーム脱離が起きたが、複製再開させた場合の方がレプリソーム因子である MCM7 の Ub 化レベルが高くなることが分かった。また、間期で複製再開させた場合と、分裂期誘導と同時に複製再開させた場合との MCM7 の Ub 化レベルを比較すると、分裂期の方が高分子量側へ大きくシフトしていることから、分裂期レプリソーム脱離経路が停止解除されたフォークに対しても働くことが示唆された。

本研究の結果は、DNA 複製進行中の核には、Wee1/Myt1 による CDK 活性制御を介して分裂期への進行を抑制する仕組みが存在することを示しており、脆弱な構造である複製フォークが分裂期の細胞質に暴露されることを防ぐことでゲノム安定性に寄与しているのではないかと考えられる。本研究成果について論文発表を行った (Hashimoto & Tanaka, *J Biol Chem* 2021)。



[参考図 1] Ara-CTP (複製ストレス) により停止した複製フォークは S 期では再開可能である。複製ストレスを維持したまま分裂期誘導を行うと (左側、+M-ext with ara-C)、核膜崩壊とレプリソーム脱離が起これ、複製再開不可能となる。一方、過剰量の dCTP を与えて複製ストレスを解除すると (真中、+M-ext with ex-dCTP)、複製再開が起これ、Wee1/Myt1 依存的に CDK 活性が抑制され、核膜崩壊が一時的に遅延した後、分裂期へ進行してレプリソームが脱離する。

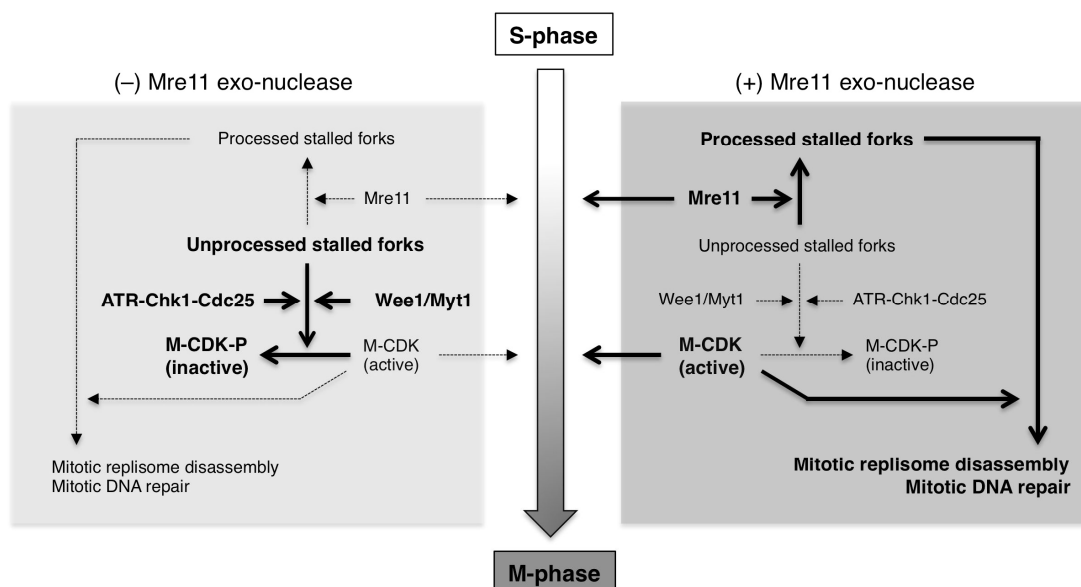
(2) Mre11 は、DNA 二本鎖切断部位の末端プロセッシングに必要なヌクレアーゼであり、相同組換え修復の初期過程で必須の役割を持っている。これに対して、複製ストレスにより停止したフォークが安定化因子の欠損により、Mre11 ヌクレアーゼによる新生鎖 DNA 分解を受けて不安定化するという病理的な作用があることも報告されている。分裂期レプリソーム脱離に必要な活性を各種阻害剤を用いて検討した結果、Mre11 阻害剤が分裂期への進行とレプリソーム脱離を阻害することが分かったため、Mre11 の役割について研究を進めて、以下のことを明らかにした。

Mre11 活性は、複製ストレス存在下でのみ分裂期への進行に必要である。Mre11 には、DNA の 3' 末端から順次ヌクレオチドを切断するエキソヌクレアーゼ活性と、DNA 内部を切断するエンドヌクレアーゼ活性が存在するが、活性特異的阻害剤を用いて検討した結果、エキソヌクレアーゼ活性のみが必要であることが分かった。相同組換え修復では、どちらの活性も必要となるため、分裂期レプリソーム脱離機構での働きはそれとは異なるものと考えられる。

Mre11 活性は、分裂期への進行を決定する初期過程で働き、一旦分裂期へ進行後は、分裂期の状態を維持するために Mre11 活性は必要ではない。また、レプリソーム脱離は通常核膜崩壊後 10-20 分程度で起きるが、核膜崩壊直前や直後以降に Mre11 活性を阻害してもレプリソーム脱離は通常通り起きることから、Mre11 の主な役割は分裂期への進行を促進することであると考えられる。

分裂期誘導と同時に Mre11 活性を阻害すると、Wee1/Myt1 キナーゼによって M 期 CDK 活性が急速に不活性化され、分裂期への進行が阻止される。このとき Wee1/Myt1 キナーゼ活性の抑制、あるいは Wee1/Myt1 抵抗性をもつ CDK 変異体を発現させることで、Mre11 活性を阻害しても分裂期への進行とレプリソーム脱離が可能となる。したがって、Mre11 活性は、レプリソーム脱離に直接的に必要となる訳ではないと考えられる。

これらの結果は、分裂期初期において複製ストレスにより停止したフォークが存在する場合、さらなる分裂期進行のためには Mre11 活性によるフォークプロセッシングが必要であるという可能性を示唆している。Mre11 によるフォーク分解は、S 期では病理的な作用と捉えられているが、本来は G2 期から M 期の初期にかけて残存するフォークを処理するための仕組みであるのかもしれない。実際、培養細胞に軽度の複製ストレスを与えると、一部は未複製領域を残して分裂期へ進行し、分裂期修復 DNA 合成経路により修復されることが知られている。Mre11 の役割は分裂期での修復に必要となる可能性がある。本研究成果について論文発表を行った (Hashimoto & Tanaka, *Life Sci alliance* 2022)。



[参考図 2] 正常な状態 (右側、+Mre11) では、分裂期初期に停止フォークが存在すると Mre11 によるプロセッシングを受けて、M 期 CDK 活性を阻害する経路を遮断する。その結果、さらに分裂期が進行して、核膜崩壊やレプリソーム脱離、分裂期修復 DNA 合成が起きる。一方、Mre11 活性を欠損すると (左側、-Mre11) 停止フォークが処理されず、M 期 CDK 活性が急速に抑制されて分裂期を脱出する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hashimoto Yoshitami、Tanaka Hirofumi	4. 巻 296
2. 論文標題 Ongoing replication forks delay the nuclear envelope breakdown upon mitotic entry	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100033
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA120.015142	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Yoshitami、Tanaka Hirofumi	4. 巻 5
2. 論文標題 Mre11 exonuclease activity promotes irreversible mitotic progression under replication stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101249
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lisa.202101249	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 橋本吉民
2. 発表標題 分裂期レプリソーム脱離機構の解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshitami Hashimoto
2. 発表標題 Mitotic Replisome Disassembly Is Mediated By p97-dependent and -independent Mechanisms
3. 学会等名 Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance (Cold Spring Harbor meeting) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------