

機関番号：17102

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370069

研究課題名 (和文) Ctf18-RFC ローダー複合体と DNA ポリメラーゼの分子間相互作用

研究課題名 (英文) Molecular interactions between Ctf18-RFC loader complex and DNA polymerases

研究代表者

釣本 敏樹 (TSURIMOTO TOSHIKI)

九州大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：30163885

研究成果の概要 (和文)：

複製クランプ PCNA のローダー複合体の 1 つヒト Ctf18-RFC と複製 DNA ポリメラーゼ、 $pol \epsilon$ 間にある 2 種類の相互作用を詳細に解析し、 $pol \epsilon$ がローダーとしての機能構造を基にして Ctf18-RFC と基盤となる相互作用を持ち、さらに染色体接着因子 Dcc1-Ctf8 を介して安定な結合が形成されることを明らかにした。さらにこの 2 種類の相互作用は $pol \epsilon$ の触媒サブユニットの DNA ポリメラーゼドメインを標的としており、その DNA 合成活性を制御する機能があることを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

We have studied interactions between one of the PCNA loader complexes, human Ctf18-RFC and replicative DNA polymerase, $pol \epsilon$, and demonstrated that their binding is mediated by two distinct interactions, one weak and one stable. The common loader structures, including the RFC small subunits (RFC2-5), are responsible for the weak interaction. Three subunits that are specifically required for cohesion, Ctf18, Dcc1, and Ctf8, formed a trimeric complex (18-1-8) and together enabled stable binding with $Pol \epsilon$. The two interaction modes occurred through the N-terminal half of $pol \epsilon$, which includes the catalytic domain, and promoted polymorphic modulation of its DNA synthesis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2010年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	15,600,000	4,680,000	20,280,000

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：(1)複製フォーク (2)染色体接着 (3)修復 (4) DNA ポリメラーゼ (5)クランプ

1. 研究開始当初の背景

DNA 上を滑るように移動し、多様な因子の DNA 上の足場として働く真核生物のクランプ PCNA は、複製因子 RFC によって DNA にロ

ードされた場合は複製に必須の機能を持つ。しかし真核生物には複数のローダーがあり、PCNA は染色体接着因子 Ctf18 を含む新規ローダー複合体

(Ctf18-RFC)によってもロードされるため、ローダーが換わることで別の反応系で働くことが考えられた。これまでの研究で、我々はヒト細胞由来の Ctf18-RFC 自身が修復系の DNA ポリメラーゼである pol η に直接結合し PCNA とともに協同して「DNA ポリメラーゼの選択」に積極的に働くしくみがあることを明らかにした。これと平行した研究で、複製に必須な pol ϵ と Ctf18-RFC の間に特異的な直接の結合があることを見出した。これら新規の因子間相互作用は、染色体の複製/修復/染色体接着反応間のクロストークの存在を強く示唆した。これまでこれらの因子と各反応のつながりとして、Ctf18-RFC が染色体接着とともにチェックポイント応答にも要求されること (Naiki T et al. 2001 Mol. Cell. Biol. 21, 5838-45)、複製 DNA ポリメラーゼでもある pol ϵ が染色体接着因子と機能的なつながりがあること (Edwards S, et al 2003 Mol Cell Biol. 23, 2733-48)、PCNA が染色体接着因子 Ctf7 と結合すること (Skibbens RV et al. 2007 J. Cell Sci. 120, 2471-7) などが報告されている。しかしながら、これらの因子間の結合を統合するような解析はされておらず、Ctf18-RFC がどのようなしくみで染色体接着に関与し、DNA ポリメラーゼとの相互作用がどのように機能して複製と染色体接着反応を連動させるかという分子的背景は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

真核生物の染色体の複製、伝達に関わるダイナミックな反応は相互に連係して進行する。その過程には PCNA クランプとそれを DNA に結合する複数のローダー複合体が深く関わり、DNA ポリメラーゼをはじめとするさまざまな DNA 代謝酵素活性を制御する。

PCNA と複製ローダー RFC は、pol δ の活性を促進し複製に必須の機能を持つのに対して、PCNA の第 2 のローダー複合体で染色体接着に必要とされる Ctf18-RFC は、複製系 DNA ポリメラーゼ pol ϵ および修復系の pol η と相互作用するという新しい知見を得た。これに基づき、Ctf18-RFC は複製中の染色体 DNA の置かれた状況に応じて特定の DNA ポリメ

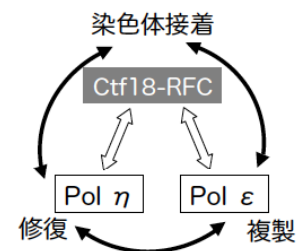
ラーゼと相互作用して、積極的にそれらの DNA 合成系と機能連動を行っているという仮説をたてた。本研究では、ヒト Ctf18-RFC とこの 2 種の DNA ポリメラーゼ間相互作用の分子機構の詳細 (相互作用部位、活性への影響) を解明し、ローダーを支点として染色体の複製/修復/染色体接着の一連の反応が複数の DNA ポリメラーゼを使い分けながら協調的に進行する分子機構を明らかにすることを目的としている。

具体的には以下の点を明らかにすることをめざした。

- (1) Ctf18-RFC と DNA ポリメラーゼ間の結合に関わるサブユニット、ドメインの同定
- (2) Ctf18-RFC と DNA ポリメラーゼ間の結合による各因子の生化学的特性の変化
- (3) Ctf18-RFC の細胞内挙動、特に S 期、DNA 傷害時の共局在、他の複製因子の挙動との関係
- (4) Ctf18-RFC と DNA ポリメラーゼ間の結合の欠損、または Ctf18-RFC の knockdown による複製、DNA 傷害応答、染色体接着への影響

3. 研究の方法

これまでに、我々は pol η が Ctf18-RFC によって活性促進を受ける DNA ポリメラーゼであることを明らかにしている。また

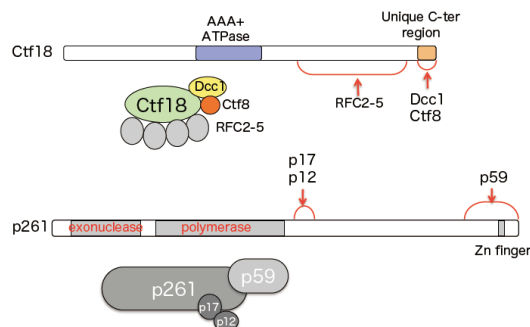


(図 1) Ctf18-RFC による染色体ダイナミクスと DNA 合成反応の連動

またプロテオミクス解析で FLAG-tag 付加した Ctf18 を発現するヒト細胞から pol ϵ を、また FLAG-tag 付加した pol ϵ 発現細胞からは Ctf18-RFC を相互作用因子として見いだした。これによりローダーが DNA ポリメラーゼに直接結合し、DNA 合成系の機能制御を行うという新しい概念を提示した (図 1)。しかし、これらの相互作用の詳細の理解までは至っていない。これを具体

的な反応機構に結びつけるため、Ctf18-RFC と pol η および pol ϵ の結合の詳細な解析を行い、その結果をもとにして、それぞれの結合と各因子の細胞内機能について以下の方法で研究を進める。

(1) pol ϵ と Ctf18-RFC の結合サブユニット、ドメインの解析



(図2) Ctf18-RFC (上) と Pol ϵ (下) の複合体構成。Ctf18、Pol ϵ p261上に各サブユニット結合領域、機能領域を示した。機能的な複合体の模式図をそれぞれの下に示した。

これら因子はどちらも7ないし4個のサブユニットからなる複合体である(図2)。したがって両者の結合に関与するサブユニットの同定がまず必要となる。保有する各サブユニットの昆虫細胞発現系由来の組換えタンパク質を用いて結合に関与するサブユニット、ドメインの同定を行う。相互に必要な最小限のサブユニットの組み合わせまで決め、それをもとにして核サブユニットの欠失変異体、またはアミノ酸置換変異体の発現系を作成し、pull down assayで相互の結合ドメインの特定を行う。

(2) pol ϵ と Ctf18-RFC の結合と活性の解析

pol ϵ と Ctf18-RFC の結合が両複合体の活性にどのような影響を持つかまだ不明である。そこで、両者の結合した高次複合体を形成させ、その際の pol ϵ の DNA 合成活性と Ctf18-RFC の DNA 結合、PCNA ローディング活性等を測定し、両者の結合がこれら生化学的活性におよぼす影響を調べる。

(3) pol η とローダー複合体間の相互作用の解析

すでに pol η と Ctf18-RFC は直接に結合することが示されている。これをさらに進めて4種のローダーと pol η の結合について解析する。これを基にして pol η との結合に関与するローダー複合体のサブユニットを同定する。これをもとにして Ctf18-RFC と pol ϵ 、pol η 間の相互

作用の特定の違いを明らかにする。

(4) Ctf18-RFC と pol ϵ の細胞内挙動の解析

それぞれについて特異的抗体、GFP 融合タンパク質のヒト細胞での発現系を作成する。さらにそれらの細胞内局在の検出法を確立する。これをもとにしてこれらの因子と染色体複製、DNA 損傷発生時の細胞内挙動の関係について解析する。

上記とは別に、ヒト細胞抽出液を分子量に基づいて分画し、各複合体構成成分の抗体を使った immunoblotting によりそれらの分布を解析する。これにより細胞内での Ctf18-RFC と pol ϵ の存在状態を明らかにする。

(5) Ctf18-RFC および DNA ポリメラーゼの結合変異体の細胞内挙動の解析

上記研究過程で作成した Ctf18-RFC と pol ϵ の結合変異体について、ヒト細胞での発現系を作成する。そしてこれらの細胞内挙動を解析して変異型と野生型の局在性の違いを細胞周期、DNA 傷害導入時について解析する。

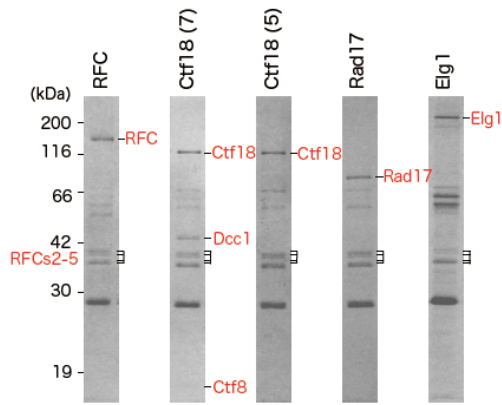
(6) Ctf18-RFC の knockdown、DNA ポリメラーゼの結合領域の過剰発現の細胞の形質の解析

siRNAによる Ctf18-RFC の knockdown 系を確立する。また Ctf18-RFC の pol ϵ 結合領域、また結合活性を欠損した領域の過剰発現系を作成する。Knockdown 細胞の細胞周期、染色体接着、DNA 傷害応答への影響をみて、Ctf18 の細胞での機能を明らかにする。また2つに分けた機能領域の過剰株については、それらの発現によるドミナントネガティブ効果による細胞への影響をみる。さらに knockdown と2つの領域の過剰発現系を組み合わせて Ctf18-RFC と pol ϵ 間の結合と Ctf18 の細胞内機能の関係を明らかにする。

4. 研究成果

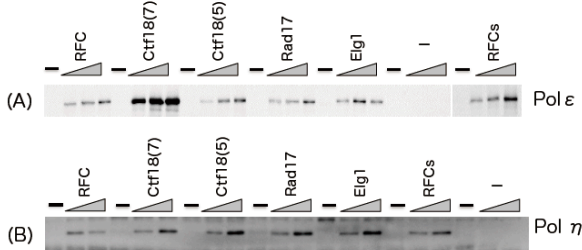
以上の研究を行って次の成果を得た。

(1) ヒト由来の4種のローダー複合体を昆虫細胞の発現系を使って再構築した(図3)。その再構築系と同じく昆虫細胞を使った pol ϵ 、pol η 発現系を使い、相互の相互作用を解析して、いずれもがローダー複合体に共通の RFC2-5 サブユニットを介し



(図3) 4種のヒトローダー複合体の再構築
昆虫細胞で発現したFLAG tag付加複合体を部分精製したもの。Ctf18-RFCについては特異的サブユニットDcc1-Ctf8を含む7量体(7)と含まない5量体(5)を発現した。

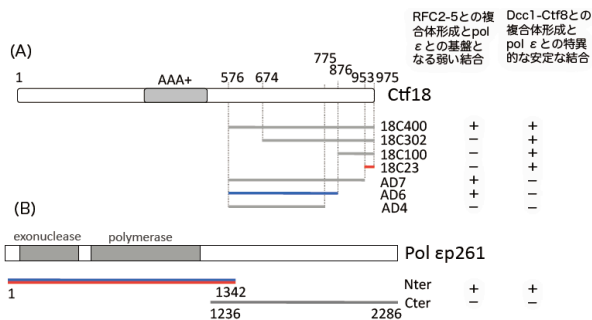
て基盤となる弱い結合を持つことを明らかにした。さらにCtf18-RFCとPol ε間には特異的な安定な結合があることを見出した(図4)。



(図4) ヒトローダー複合体とpol ε, pol η間の相互作用あらかじめ一定量のローダー複合体が結合した抗FLAG抗体ビーズに量を変化させてpol ε (A), pol η (B)を添加し、結合したこれらDNAポリメラーゼをimmunoblottingにより検出した。

(2) Ctf18-RFCとPol ε間の安定な結合はCtf18のC末側23アミノ酸に結合した染色体接着因子Dcc1, Ctf8によってもたらされる。またCtf18と結合したRFC2-5サブユニットは独立してPol εと弱い結合を行う。これらPol εと複合体を形成する2つの機能領域は明確にCtf18上で区別でき、この2種類の結合が機能的に独立していることを明らかにした(図5)。

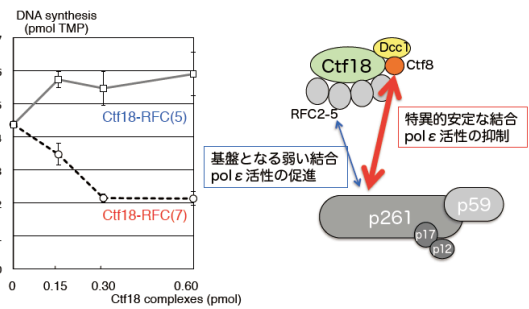
(3) Ctf18-RFCのサブ複合体でPol εと安定な結合をするCtf18-Dcc1-Ctf8と弱い結合をするCtf18-RFC(5)を再構築してPol εとの結合領域



(図5) Ctf18-RFCとpol ε間の相互作用に関する機能ドメイン
(A) Ctf18上でRFC2-5と複合体を形成しpol εと弱い結合するのはCtf18の内側300アミノ酸残基(青線)、Dcc1-Ctf8と複合体を形成しpol εと特異的な安定な結合をするのはC末23アミノ酸残基(赤線)に存在する。
(B) pol εのCtf18-RFCに対する2種類の結合は、いずれも触媒サブユニットp261のN末半分(青赤線)に存在する。

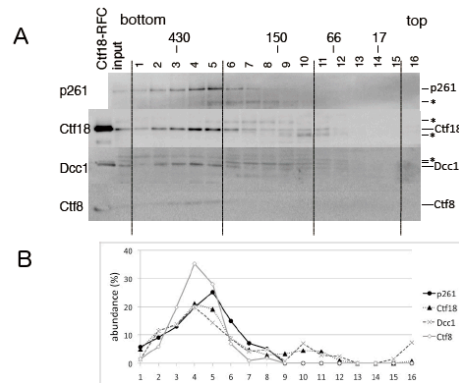
を解析し、いずれもPol ε p261の触媒活性を持つN末半分と結合することを明らかにした(図5)。

(4) このPol ε p261 N末半分の領域に対する2種類の結合性と連係して、Ctf18-RFCのサブ複合体がPol εと弱い結合をする際には、そのDNA合成活性が促進され、安定な結合をする際には阻害されることを明らかにした。したがってPol εにCtf18-RFCが異なったモードで結合することで、複製の進行が制御されることが示された(図6)。



(図6) Ctf18-RFCとpol ε間の相互作用によるpol ε DNA合成活性制御
pol ε N末半分で十分量DNA合成活性があり、Ctf18-RFCの2種類の相互作用が行われる。これに安定な結合をするCtf18-RFC(7)および弱い結合をする(5)を添加すると、前者では阻害が見られ後者では促進が見られる(左図)。したがってCtf18-RFCは結合モードを切換えてpol ε活性を制御している(右図)ことが示唆される。

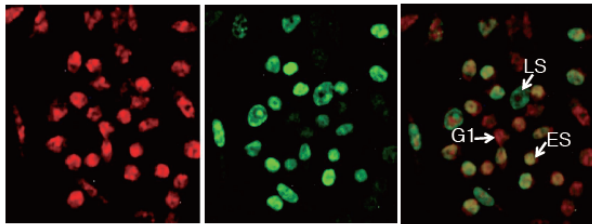
(5) ヒト細胞抽出液をglycerol密度勾配遠心で分画し、抽出液中のCtf8, Dcc1を含むCtf18-RFC複合体のほとんどがPol εと安定な結合していることを明らかにした(図7)。



(図7) 細胞抽出液でのp261, Ctf18, Dcc1, Ctf8の存在様式
HeLa抽出液をグリセロール密度勾配遠心で分画し、各分画に含まれる各タンパク質をimmunoblottingにより検出した(A)。Bはバンド強度を分画ごとに定量したグラフ。これらは高次複合体として同じ高分子分画から検出される。*は非特異タンパク質

(6) HeLa細胞でのCtf18siRNAでCtf18のKnockdownは細胞にとって致命的ではないがS期、G2/M期の割合が増加することを見出した。したがってCtf18はヒト細胞でS

期の進行に関与することが考えられる。さらに Ctf18 抗体による細胞染色で、Ctf18 が G1 期から核内に検出され S 期初期に DNA 合成部位に共局在し、S 期後期までに各から消失するパターンが観察された (図 8)。このことは Ctf18 が複製前から染色体上に配置され、複製フォークの進行時にその進行制御に関与し、複製が完了し染色体接着が完成した染色体から解離する制御系があることを示唆している。



(図 8) Ctf18 の細胞依存的局在
HeLa 細胞を使い S 期核の DNA 合成部位を EdU で標識 (緑) し、Ctf18 を抗 Ctf18 抗体 (赤) で検出した。Ctf18 は G1 期から核内に局在し early S で複製部位と共局在する。S 期の進行とともに減少し late S では消失する。

以上より、染色体接着ローダー Ctf18-RFC は S 期細胞核でその特異的サブユニットを介して pol ϵ と安定な結合をして複製フォークの進行制御を行うことが明らかになった。

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 9 件、全て査読あり)

- Hayashi-Takanaka, Y, Yamagata, K, Wakayama, T, Stasevich, T, Kainuma, T, Tsurimoto, T, Tachibana, M, Shinkai, Y, Kurumizaka, H, Nozaki, N, Kimura, H Tracking epigenetic histone modifications in single cells using Fab-based live endogenous modification labeling. *Nucleic Acids Research* in press 2011
- Kanamori M, Seki M, Yoshimura A, Tsurimoto T, Tada S, Enomoto T. WRNIP1 promotes binding of WRN to template-primer DNA *Biol. Pharm. Bull.* in press 2011
- Narita T, Tsurimoto T, Yamamoto J, Nishihara K, Ogawa K, Ohashi E, Evans T, Iwai S, Takeda S, and Hirota K. Human replicative DNA polymerase δ can bypass T-T (6-4) ultraviolet photoproducts on template strands. *Genes Cells*. 15: 1228-1239 2010
- Murakami T, Takano R, Takeo S, Taniguchi R, Ogawa K, Ohashi E, Tsurimoto T. Stable interaction between the human PCNA loader complex Ctf18-RFC and DNA polymerase

epsilon is mediated by the cohesion specific subunits, Ctf18, Dcc1 and Ctf8. *J. Biol. Chem.* 285: 34608-34615 2010

- Takeishi Y, Ohashi E, Ogawa K, Masai H, Obuse C, Tsurimoto T. Casein Kinase 2-dependent phosphorylation of human Rad9 mediates the interaction between human Rad9-Hus1-Rad1 complex and TopBP1. *Genes Cells* 15: 761-771 2010
- Yoshimura A, Seki M, Kanamori M, Takeishi S, Tsurimoto T, Tada S, Enomoto T. Physical and functional interaction between WRNIP1 and RAD18. *Genes Genet. Syst.* 84: 171-178, 2009
- Nishitani H, Shiomi Y, Iida H, Michishita M, Takami T Tsurimoto, T. CDK inhibitor p21 is degraded by a PCNA coupled Cul4-DDB1-Cdt2 pathway during S phase and after UV irradiation. *J Biol Chem.* 283: 29045-29052, 2008
- Tomida J, Masuda Y, Hiroaki H, Ishikawa T, Song I, Tsurimoto T, Tateishi S, Shiomi T, Kamei Y, Kim J, Kamiya K, Vaziri C, Ohmori H, Todo T. DNA damage induced ubiquitylation of RFC2 subunit of RFC complex. *J Biol Chem.* 283: 9071-9079, 2008
- Tsuji Y, Watanabe K, Araki K, Shinohara M, Yamagata Y, Tsurimoto T, Hanaoka F, Yamamura K, Yamaizumi M, Tateishi, S. Recognition of forked and single-stranded DNA structures by human RAD18 complexed with RAD6B protein triggers its recruitment to stalled replication forks. *Genes Cells* 13: 343-354, 2008

[学会発表] (計 17 件)

- Tsurimoto, T. et al Interaction between the cohesion loader complex Ctf18-RFC and DNA polymerase ϵ in human cells 第 33 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 11 日 神戸市
- 福川理紗、釣本敏樹 PCNA に融合した Rad9C 末端断片の DNA 損傷応答活性の解析 第 33 回日本分子生物学会 2009 年 12 月 10 日 神戸市
- 上田 聡、釣本敏樹 Correlation of DNA damage response and Rad9/TopBP1 binding through two phospho-Ser residues at the

- Rad9 C-terminal region 第33回日本分子生物学会 2009年12月10日 神戸
4. 小林寛子、釣本敏樹 Roles of the two functional units of Ctf18 for DNA damage response in HeLa cells 第33回日本分子生物学会 2009年12月10日
 5. 谷口莉菜、釣本敏樹 Interaction between RFC and MCM on DNA 第33回日本分子生物学会 2009年12月10日
 6. Ohashi E. Tsurimoto T. et al Chromatin association of human Rad9-Hus1-Rad1 complex is dependent on TopBP1 but not on the interaction with TopBP1 第33回日本分子生物学会 2009年12月9日 神戸市
 7. 福川理紗、釣本敏樹 Rad9C 末端と PCNA の融合タンパク質を用いた TopBP1 との相互作用解析 第27回染色体ワークショップ 2010年1月21日 殿場市
 8. Ohashi E. Tsurimoto T. et al Roles of the Rad9 phosphorylation by CK2 in vivo 第32回日本分子生物学会 2009年12月12日 横浜市
 9. Taniguchi R. Tsurimoto T. et al Functional Significance of specific interaction between loader complexes and MCM in human cells 第32回日本分子生物学会 2009年12月11日 横浜市
 10. Takeishi Y. Tsurimoto T. et al Roles of the Rad9 phosphorylation by CK2 in vivo 第32回日本分子生物学会 2009年12月10日 横浜市
 11. Tsurimoto T. et al Multiple interaction networks of replication proteins in human cells. 第32回日本分子生物学会 2009年12月9日 横浜市
 12. Ohashi, E. Tsurimoto T. et al THE PHOSPHORYLATION OF RAD9 AT SER-341 AND SER-387 BY CK2 PROMOTES THE INTERACTION BETWEEN 9-1-1 AND TOPBP1. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance 2009年9月5日 米国 NY Cold Spring Harbor
 13. Tsurimoto, T. et al INTERACTION OF LOADER COMPLEXES WITH MULTIPLE REPLICATION PROTEINS IN HUMAN CELLS Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on "Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance" 2009年9月3日 米国 NY Cold Spring Harbor
 14. 谷口莉菜 釣本敏樹 クランプローダー複合体と MCM サブ複合体の相互作用解析 日本分子生物学会、生化学学会合同年会 2008/12/9 兵庫県神戸市
 15. 村上武司 釣本敏樹 クランプローダーと DNA ポリメラーゼ間の相互作用の解析 日本分子生物学会、生化学学会合同年会 2008/12/9 兵庫県神戸市
 16. 廣川雅人 釣本敏樹 ユビキチン化 PCNA による DNA polymerase の活性促進 日本分子生物学会、生化学学会合同年会 2008/12/9 兵庫県神戸市
 17. Murakami T. Tsurimoto T. Analyses on interaction between loader complexes and replication proteins in human cells The 6th 3R Symposium Oct.29,2008 Tsumagoi, Sizuoka,
- [図書] (計5件)
1. 塩見泰史、西谷秀男、釣本敏樹 CDK インヒビター、p21 の分解による細胞周期の制御生体の科学 (特集「ユビキチン化による生体機能の調節」) 60 巻 pp527-532 2009 (医学書院)
 2. 塩見泰史、釣本敏樹 真核生物の染色体複製における多重クランプ・クランプローダー系の役割 生化学 81 巻、pp10-13、2009
 3. 釣本敏樹 複製フォーク制御と DNA 損傷/複製ストレス応答機構: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)、54 巻、pp370-373、2009 (共立出版)
 4. 釣本敏樹 クランプとクランプローダーによる複製フォーク機能制御 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)、54 巻、pp374-379、2009 (共立出版)
 5. 釣本敏樹 多様な DNA ポリメラーゼによる複製制御 細胞工学 特集「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」 pp1003-1007、2008 (秀潤社)
- [その他]
- ホームページ等
<http://seibutsu.biology.kyushu-u.ac.jp/~chromosome>
6. 研究組織
 - (1) 研究代表者
 釣本 敏樹 (TSURIMOTO TOSHIKI)
 九州大学・大学院理学研究院・教授
 研究者番号：30163885