

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目： 若手研究 (B)

研究期間： 2008～2009

課題番号： 20770144

研究課題名 (和文) 真核生物染色体 DNA 複製開始機構の生化学的・遺伝学的解析

研究課題名 (英文) Biochemical and genetic analysis of initiation of eukaryotic genomic DNA replication

研究代表者 矢倉 勝 (YAGURA MASARU)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・研究員

研究者番号： 00455205

研究成果の概要 (和文)：

真核生物染色体 DNA の複製開始時に起こると考えられるタンパク質複合体の集合・解離に関わる可能性が高い Mcm10 の生化学的・遺伝学的解析を行った。変異体を用いた解析の結果、Mcm10 は複製開始の初期段階で機能している事が明らかになった。さらに、生化学的解析の結果、Mcm10 は細長い形をした形状で、複製開始に関わる既知の因子と直接相互作用する事が明らかになった。

研究成果の概要 (英文)：

In eukaryotes, many initiation factors are assembled and disassembled on chromatin, and one of the factor, Mcm10, was thought to be involved in important role for the complex formation. I carefully assessed how Mcm10 participates in DNA replication. A thermosensitive allele of *MCM10*, *mcm10-1* significantly reduced DNA replication at the nonpermissive condition after release from G1 block. Biochemical analysis revealed that budding yeast Mcm10 is a long and narrow shape and form a monomer, and it can bind to some DNA replication initiation factors directly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：①DNA 複製開始機構 ②染色体 DNA ③出芽酵母 ④生化学 ⑤遺伝学

1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA 複製は世代を越えた遺伝現象のみならず、生物の個体維持にとって必須の現象である。細胞分裂の際に娘細胞へ全ての遺

伝情報を正確にかつ過不足無く伝えるためには、その反応が厳密に制御されていなければならない。DNA 複製は、多くの生物種において開始の段階で調節されていることから、

DNA 複製開始機構とその調節機構を解明することは DNA 複製研究の中心的課題である。

(1) 真核生物の染色体 DNA 複製は、細胞周期の限られた一時期 (S 期) に複数の決まった部位 (複製開始部位) から開始する。これら DNA 複製開始部位には、多数の蛋白質 (複製開始因子) が秩序立った順で集合する。現在までに、真核生物の複製開始因子は次々に同定され、基本的な複製開始因子は全て見つかったと考えられているが (Kamimura *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 18, 6102, 1998; Kanemaki *et al.*, *Nature*, 423, 720, 2003)、それら因子の複製開始反応における作用機序については不明な部分が多い。真核生物の染色体 DNA 複製は、複製開始部位に、先ず複製開始複合体 (pre-RC) が細胞周期の G1 期までに結合し、次に DNA ポリメラーゼを含む複製開始因子群が複製開始直前に集合する。そして、その内の多くのタンパク質は複製開始に伴い、複製フォークと共に移動する。この集合過程から移動過程への転換には、集合した複製開始因子群が何らかの変化 (リモデリング) をし、性質を変える必要がある。それは、開始領域への集合が、その領域の塩基配列や既に結合している因子との相互作用により起こるのに対し、複合体が移動を始めるためには、これらとの分離が必要であるからであり、どのようにしてこれらの過程が切りかわるのか非常に興味深い。これを明らかにするためには、複製開始反応の各段階において必要十分条件を検討できる *in vitro* 再構成系の確立が必須である。しかし、現在までのところ精製蛋白質を用いて複製開始反応の全ステップを試験管内で再現するには至っておらず、最初の pre-RC のみ再現されているだけである (Seki and Diffley, *PNAS*, 97, 14115, 2000; Kawasaki *et al.*, *Genes Cells*, 11, 745, 2006)。

(2) *MCM10* は、出芽酵母のミニ染色体の保持に必要な遺伝子として同定され、細胞周期の S 期開始に必須の因子である。しかし、他の複製開始因子に比べて機能解析が進んでおらず、遺伝子単離から 15 年たった現在までに発表された論文数は、最近同定された複製開始因子群に比べても圧倒的に少ない。さらに、Mcm10 に関する報告の多くは、国内外できちんとした追試が行われておらず、Mcm10 と複製開始領域との経時的結合についても、複数の研究室から S 期 CDK 活性が上昇する前に複製開始部位に結合するという報告と、S 期 CDK 活性の上昇後とする報告があり、混乱している状況である。現在までに、(1) で述べたリモデリング因子は同定されておらず、Mcm10 はその候補の一つとして挙げられる。

2. 研究の目的

(1) 既報の追試

Mcm10 の知見に関して混乱している現状を整理するため、Mcm10 に関する報告の追試を行い、既知の性質について再現性を確認した。

(2) 種々の精製タンパクを用いた複製開始因子との相互作用

複製開始部位上で起こるイベントの中で、どの段階で Mcm10 が機能しているかを明らかにするため、既知の複製開始に関わる因子との相互作用を確認した。

(3) *in vitro* DNA 複製系の構築

複製開始反応のどの段階で機能しているかを明らかにするために必要なアッセイ系である *in vitro* DNA 複製再構成系に必要な、種々の DNA 複製開始因子の網羅的精製を試みた。また、出芽酵母粗抽出液をもちいた DNA 複製系の構築も試みた。

3. 研究の方法

(1) 既報の追試

① S 期初期における Mcm10 の機能

mcm10 温度感受性デグロン変異株、*mcm10* 温度感受性変異株、および両者を組み合わせた変異株を用いて、非制限温度下で細胞周期の進行を FACS にて確認した。

② 各種複製開始因子と Mcm10 との相互作用
Mcm10 の N 末および C 末端側に FLAG もしくは 6HIS タグを付加した FLAG-Mcm10-6HIS タンパクを大腸菌で発現させ、精製した。精製した FLAG-Mcm10-6HIS と各種複製開始必須因子との結合を pull down assay で確認した。

③ Mcm10 の DNA 結合活性

精製した FLAG-Mcm10-6HIS タンパクと ss-および ds-DNA との結合を、gel mobility shift assay および filter binding assay で検出した。また、N 末、C 末端を欠失した変異 *mcm10* についても精製し、ss-および ds-DNA との結合を同様に検出した。

④ Mcm10 のプライマー-RNA 合成活性、および Polalpha の RNA、DNA 合成活性に対する影響
RNA 合成活性、および Polalpha の DNA 合成活性に対する影響をみるために、精製 FLAG-Mcm10-6HIS および分裂酵母の Mcm10 (FLAG-SpMcm10) を用いて、*in vitro* で合成させた産物を変性 PAGE で展開し、取り込ませた放射性同位元素ラベルを検出した。また、また、primed DNA を用いて、Polalpha による DNA 合成促進の有無を同様に検出した。

⑤ Mcm10 の会合状態

ゲル濾過およびグリセロール密度勾配遠心でみかけの分子量を測定し、得られたデータから s-value およびストークス半径を求めた。

(2) 種々の精製タンパクを用いた複製開始因子との相互作用

複製開始反応に必須とされる因子を網羅的に精製し、pull down assay で、Mcm10 との結合を検出した。

(3) *in vitro* DNA 複製系の構築

出芽酵母染色体 DNA 開始に関わる 40 種以上の因子を網羅的に精製するため、6HIS、FLAG タグや precision protease による切断部位を導入するための発現プラスミドを構築した。各種タンパクを、出芽酵母中で発現させた後、タグに対するアフィニティー精製およびコンベンショナルカラムを用いた精製を行った。また、G1 期、および S 期の細胞から抽出した粗抽出液を用いて、*in vitro* DNA 複製系の構築を試みた。反応液中の塩の種類や濃度、また精製標品の添加等条件を検討した。また各種阻害剤を用いて、修復反応と新規 DNA 合成産物との分離を試みた。

4. 研究成果

(1) 既報の追試

①S 期初期における Mcm10 の機能

既報で G1-S 期で細胞周期が停止する事が知られている *mcm10* 温度感受性デグロン変異体は、非許容温度下で細胞周期のどの段階でも、停止せず、野生型と変わらない FACS のパターンを示した。一方、温度感受性変異体 *mcm10-1* は、G1-S 期の進行に遅れが観察された。このことから、Mcm10 は、複製開始もしくは、DNA 鎖伸長初期段階に機能している事が確認された。

②各種複製開始因子と Mcm10 との相互作用
Mcm2-7 の各因子と Mcm10 との相互作用が pull down assay により確認された。

③Mcm10 の DNA 結合活性

ss- および ds-DNA との結合が、filter binding assay および gel mobility shift assay により、確認された。また、N 末、C 末端側を欠失した変異体でも、野生型と比べてほとんど変わらない結合力を示した。このことから、DNA 結合に必要な領域は中央領域に位置する OB-fold が寄与している事が示唆された。

④Mcm10 のプライマーRNA 合成活性、および Polalpha の RNA、DNA 合成活性に対する影響
分裂酵母および出芽酵母 Mcm10 のどちらも RNA 合成活性は検出出来なかった。また、Polalpha の RNA、DNA 合成活性に対しても、影響は検出出来なかった。

⑤Mcm10 の会合状態

Mcm10 は 150 mM NaCl 存在下のゲル濾過で、6 量体程度のサイズに分画されたが、グリセロール密度勾配遠心では、単量体程度のサイズに分画された。これらのデータから s-value および回転半径を求めたところ、Mcm10 は細

長い形をしている事が示唆された。

(2) 種々の精製タンパクを用いた複製開始因子との相互作用

Polalpha や Ctf4 との結合が pull down assay により確認された。上記の追試結果とこれらの結果から Mcm10 の一つの機能として、複製フォーク中でも機能している事が示唆された。

(3) *in vitro* DNA 複製系の構築

出芽酵母粗抽出液を用いた DNA 合成系の条件検討を行ったが、新規 DNA 合成を検出できる条件は見いだせなかった。再構成系構築のために、出芽酵母 DNA 複製開始に必須な因子の網羅的精製を行った結果、当該研究室で精製した因子とあわせて、Mcm2-7 複合体以外の全ての因子の精製標品を大量に調整する系を確立し、それら標品を得た。Mcm2-7 複合体については、なお条件検討が必要であり、現在続行して検討しているが、得られた標品を用いる事で、世界で初めて真核生物の DNA 複製開始複合体形成、DNA 二重鎖開裂、プライマーRNA 合成、DNA 合成の各反応を *in vitro* で検出できる再構成系が構築できると期待される。

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)

Tanaka H, Katou Y, Yagura M, Saitoh K, Itoh T, Araki H, Bando M, Shirahige K. Ctf4 coordinates the progression of helicase and DNA polymerase alpha. *Genes Cells*. 査読有り、2009 14(7):807-20.

[学会発表] (計 4 件)

①Yuki KATOU, Hirokazu TANAKA, Masashige BANDO, Masaru YAGURA, Ryu-suke NOZAWA, Takehiko ITOH, Chikashi OBUSE, Hiroyuki ARAKI and Katsuhiko SHIRAHIGE, Ctf4, a component of the Replisome Progression Complex, links helicase and DNA polymerase alpha, 3R symposium, 2008, Kakegawa, Shizuoka, Japan.

② Masaru YAGURA and Hiroyuki ARAKI, FUNCTIONS OF MCM10 IN CHROMOSOMAL DNA REPLICATION IN BUDDING YEAST, EUKARYOTIC DNA REPLICATION AND GENOME MAINTENANCE, 2008, Cold Spring Harbor, New York, USA

③ 矢倉 勝, 荒木 弘之, 出芽酵母染色体 DNA 複製における MCM10 の機能解析、日本遺伝学会第 81 回大会、2009 年、信州大学松本キャン

ンパス、長野

④矢倉 勝、荒木 弘之、出芽酵母染色体 DNA 複製における MCM10 の機能解析、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年、パシフィコ横浜、神奈川県

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/MicGen/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢倉 勝 (YAGURA MASARU)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・研究員

研究者番号：00455205