

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 1 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究 C

研究期間：2009 ~ 2011

課題番号：21570156

研究課題名（和文）MCMヘリカーゼを中心とした複製フォーク複合体の分子構築と制御

研究課題名（英文）Molecular analysis and regulation of replication fork complex, especially focus on MCM helicase

研究代表者

高井 裕子 (Zhiying You)

財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主任研究員

研究者番号：90332270

研究成果の概要（和文）：

MCMヘリカーゼはDNA複製において中心的な役割を果たし、複製フォークで種々のタンパク質と相互作用しつつ、巨大な複製フォーク複合体を形成し、複製フォークの進行と安定な維持を担っている。DNAプライマーゼは複製フォークにおいてDNAポリメラーゼのプライマーとして使用される短いプライマーの合成を触媒し、DNAの連続的な伸長に必要である。多くの原核生物とウイルス系での研究からヘリカーゼとプライマーゼは直接相互作用し、協同的に複製フォーク複合体の機能を制御することが報告された。しかし、真核生物にはそれに関する情報はほとんどない。我々は精製したマウスMCMとポリメラーゼ α -プライマーゼ蛋白質を用いて、グリセロール密度勾配遠心でMCM4-6-7複合体がポリメラーゼ-プライマーゼ複合体と共沈降することを見いだした。また、MCM2~7複合体とDNAプライマーゼ（p48とp58サブユニット）が物理的に相互作用することをpull-downアッセイで示した。またMCM2~7とプライマーゼはDNA非存在下で複合体を形成することをNativeゲルで確認した。Gel-shift assayでは、MCM4-6-7とプライマーゼは一本鎖DNA上に三者複合体を形成する。また、MCM4-6-7複合体およびMCM2~7複合体によりプライマーゼ活性が促進された。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プライマーゼと相互作用し、その活性を促進する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Mini-chromosome maintenance (Mcm) is a central component for DNA unwinding reaction during eukaryotic DNA replication. DNA primase activity is required at the DNA replication fork to synthesize short RNA primers for DNA chain elongation on the lagging strand. Although direct physical and functional interactions between helicase and primase have been known in many prokaryotic and viral systems, potential interactions between helicase and primase have not been explored in eukaryotes. Using purified Mcm and polymerase α -primase complexes, we find that the Mcm4/6/7 complex co-sediments with the polymerase α -primase complex in the glycerol gradient centrifugation. A direct physical interaction between the Mcm2~7 complex and human DNA polymerase α -primase subunits p48-p58 hetero-dimer is detected in pull-down assay. Single-stranded DNA binding activities of both primase and Mcm2~7 increase when they coexist. Both the Mcm4/6/7 and Mcm2~7 complexes stimulate primer RNA synthesis activity of primase *in vitro*. However, the helicase and ATP hydrolysis activities of Mcm4/6/7 are not affected by primase. These results indicate a possibility that a direct physical interaction between primase and Mcm may activate priming reaction by the former protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000 円	510,000 円	2,210,000 円
2010 年度	1,200,000 円	360,000 円	1,560,000 円
2011 年度	800,000 円	240,000 円	1,040,000 円
年度			
年度			
総計	3,700,000 円	1,110,000 円	4,810,000 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

ゲノム全体を細胞周期あたり 1 回だけ複製するための複製開始制御は、遺伝情報を次世代の細胞に継承する上で不可欠である。染色体複製開始は、複製前複合体(pre-RC)の形成と引き続く pre-RC の活性化の二段階で進行する。このそれぞれのステップで、MCM 蛋白質は重要な役割をはたす。複製開始部位からの複製開始が許容される前に、ORC 複合体を中心とした Cdc6, Cdt1, Mcm2-7 複合体等を含む複製前複合体が複製開始部位に形成される(Annu Rev Biochem. 2010 の総説)。そして、この pre-RC は、主に MCM のリン酸化により、複製開始のスイッチオンを受ける。Pre-RC 活性化の後、MCM は複製フォークにおいて二本鎖 DNA を巻き戻すヘリカーゼの中心因子として機能する。複製フォークにおいては、ヘリカーゼの他に、DNA ポリメラーゼ・プライマーゼを中心とした複製装置、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(replisome progression complexes : RPCs)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 ヘリカーゼは複製開始だけではなく、

複製フォークの進行にも重要である。しかし、複製開始および複製フォークの構成因子の多くは同定されているが、その分子装置の形成機構と実体はまだ明らかではない。従って、MCM と種々の複製因子の相互作用とそれによる複製フォークの機能制御の解析が、染色体複製の分子機構の解明において最も重要な課題となっている。

2. 研究の目的

DNA プライマーゼは複製フォークにおいて DNA ポリメラーゼのプライマーとして使用される短いプライマーの合成を触媒し、DNA の連続的な伸長に必要である。多くの原核生物とウイルス系での研究からヘリカーゼとプライマーゼは直接相互作用し、協同的に複製フォーク複合体の機能を制御することが報告された。しかし、真核生物にはそれに関する情報はほとんどない。本申請研究では、MCM を中心とした複製開始と複製フォーク複合体の分子構築の生化学的な解析を通じて、複製開始と伸長、そして複製複合体との相互作用による制御を重点的に解析する。具体的には、① Mcm 複合体 (Mcm4,6,7、Mcm2 から 7、と MCM-GINS-Cdc45) と他の複製開始/複製伸長因子(Cdt1-Geminin、Polymerase/primase)との相互作用、および

MCM ヘリカーゼ活性や DNA ポリメラーゼ・プライマーゼ活性への影響。② 複製開始因子のカエル卵抽出液無細胞実験系による染色体 DNA 複製開始の動態解析。具体的に動物細胞では ORC、Cdc6 と MCM などの複製開始タンパク質因子が DNA 上でどのように機能して pre-RC を形成させるのを解析する。

3. 研究の方法

これまで行って来た MCM 複合体についての生化学的な研究の経験と成果に基づき、生化学的解析とともに、アフリカツメガエル卵抽出液を用いた *in vitro* DNA 複製解析系で解析する。これらの解析を行うことにより、複製開始と複製フォークの分子構築の解明に大きな貢献ができる。

精製タンパク質を用いた酵素学的解析

複製フォーク複合体の MCM4-6-7、MCM2~7 複合体と DNA ポリメラーゼ・プライマーゼの相互作用を pull down で確認する。また、MCM 複合体によるプライマーゼ活性への促進や DNA 合成におよぼす影響、プライマーゼ (p48/p58) による DNA ヘリカーゼ活性への影響を調べる。

また、精製した種々の Mcm 複合体と MCM のローテング因子 Cdt1、Cdt1-Geminin) 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。

MCM 複合体の活性化 (ホロヘリカーゼの同定) と再構成

MCM2-3-4-5-6-7 複合体は DNA ヘリカーゼ活性を示さない。昆虫細胞で増産精製した MCM2~7、Cdc45 と GINS 複合体の組み合わせにより、CMG 複合体の精製と DNA ヘリカーゼ活性の検出を検討する。

カエル卵抽出液無細胞実験系による染色体 DNA 複製の動態解析

アフリカツメガエル卵無細胞系は、高度に細胞周期で同調された細胞抽出液と精子核 DNA を用いた複製システムで、複製開始蛋白質の活性制御という観点から、真核細胞の ORC 複合体の役割分担や各サブユニットの特異性を検討する。

4. 研究成果

MCM ヘリカーゼは複製フォークにおいて巨大な複合体を形成し、DNA 複製制御に中心的な役割を担っていることを示唆する。DNA プライマーゼは、DNA 複製フォークで DNA ポリメラーゼのプライマーとして使用される短い RNA 分子を合成する酵素である。ヘリカーゼとプライマーゼの直接的な物理的相互作用は、真核生物にはほとんど情報がない一方、原核生物やウイルスシステムで多く研究されている。精製されたマウスの MCM やポリメラーゼプライマーゼタンパク質を用いて、MCM 複合体がグリセロール勾配遠心でポリメラーゼプライマーゼ複合体と沈降することを発見した。また、MCM2~7 複合体と human DNA プライマーゼ (p48 と p58 サブユニット) が物理的に相互作用することをプルダウンアッセイで検出された。未変性ゲルでは、MCM2-7 とプライマーゼは複合体が形成された。実際 Gel-shift assay では、MCM とプライマーゼは一本鎖 DNA 上に三者複合体を形成する。さらに、GINS 複合体ではなく、MCM4/6/7 と MCM2-7 複合体は *in vitro* でプライマーゼによる DNA の短いプライマーの合成を促進する。プライマーゼ活性は MCM タンパク質の増加によって促進する。対照的に、プライマーゼによる MCM4/6/7 ヘリカーゼ活性と ATP の加水分解能の促進は

認められなかった。プライマーゼ活性が MCM 複合体による促進されるメカニズムを解明するために、ビオチン DNA を用いて、プライマーゼと MCM ヘリカーゼの DNA 上への結合を検討した。プライマーゼの存在下では、MCM ヘリカーゼの DNA 親和性が上昇することを見出した。この結果から MCM ヘリカーゼは複製フォークにおいて、プライマーゼ-DNA と相互作用し、DNA への親和性や複合体の高次構造を変化させることにより、プライマーゼ活性を促進すると考えている。

これらの結果はプライマーゼと MCM ヘリカーゼ間の直接的なタンパク質間相互作用が存在し、複製フォークのプライマー合成の機能活性化に必要であることが示唆された。

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 2 件)

① Hisao Masai, Seji Matsumoto, Zhiying You, Naoko Yoshizawa-Sugata, Masako Oda.

Eukaryotic Chromosome DNA Replication: Where, When, and How? *Annu. Rev. Biochem.* 79: 89-130. 2010.

査読あり。

② Taku Tanaka, Mika Yokoyama, Seji Matsumoto, Rino Fukatsu, Zhiying You, Hisao Masai. Fission yeast Swi1-Swi3 complex facilitates DNA binding of Mrc1. *J Biol Chem.* 285: 39609-39622. 2010.

査読あり。

[学会発表] (計 3 件)

① Zhiying You. **Biochemical Characterization of MCM, the Essential DNA Helicase for Eukaryotic DNA Replication.** The

3rd Japan-Korea Joint Symposium on life Science. February 16-17, 2012. Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science. Oral presentation.

② Zhiying You, Sara De Falco, Francesca M. Pisani, 正井久雄. **MCM 複合体による DNA プライマーゼ活性の促進.** 第 21 回 DNA 複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ。2011 年 10 月 25-27 日。サンピア福岡。口頭発表。

③ Zhiying You and Hisao Masai **Characterization of MCM Loading Factor Cdt1: similarity between Cdt1 and DnaC proteins.** The 21st IUBMB and 12th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology. August 2-7, 2009. Shanghai, China.

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総合研究所・
ゲノム医科学研究分野・
主任研究員
研究者番号 : 90332270

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし