

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009-2010

課題番号：21770186

研究課題名 (和文) Cdc7 タンパク質リン酸化酵素の姉妹染色体接着における機能

研究課題名 (英文) Involvement of the Cdc7 protein kinase in sister chromatid cohesion

研究代表者

高橋 達郎 (TAKAHASHI TATSURO)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50452420

研究成果の概要 (和文)：

細胞が増殖するには、染色体を正確に複製し、二つの娘細胞に正確に分配することが必要である。染色体は複製時にペアとして接着され (染色体接着)、染色体接着により分配時に染色体のペアが正しく識別される。染色体接着はDNA合成と協調的に起こる必要があるが、どのような反応を介して接着とDNA合成が協調しているのかはよく分かっていない。本研究ではツメガエル卵抽出液を主な材料に用い、DNA複製に機能する蛋白質と染色体接着に機能する蛋白質が、どのように相互作用するかを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：

Faithful duplication and segregation of chromosomes are essential for cell proliferation. Replicated sister chromosomes are physically linked during their synthesis (sister chromatid cohesion), ensuring identification of chromosome pairs to be distributed into daughter cells. Although the cohesion establishment reaction cooperates with DNA replication, the mechanism how cohesion and replication couple remains unclear. In this study, we have examined how a DNA replication protein interacts with a cohesion protein using *Xenopus* egg extracts.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体分配、姉妹染色体接着、コヒーシン、Cdc7-kinase、Scc2-Scc4、染色体、アフリカツメガエル

1. 研究開始当初の背景

(1) 姉妹染色体接着の成立機構

正確に染色体を分配するためには、分裂期

に姉妹染色体のペアを同定することが必須である。この目的のため、真核生物では DNA 複製によって生じた姉妹染色体は環状の巨大蛋白質複合体であるコヒーシンにより接

着されている。接着の分子機構は明らかではないが、環状コヒーシン分子が姉妹 DNA 鎖を取り囲むことにより姉妹染色体を接着するというモデルが有力である。姉妹染色体の接着は DNA 複製と協調して S 期に成立し、コヒーシンは S 期以前に染色体に結合する。コヒーシンの染色体結合には Scc2-Scc4 蛋白質複合体が必須である。

Scc2-Scc4 がコヒーシンを染色体に結合させるためには、Scc2-Scc4 自体が染色体に結合する必要がある。従って Scc2-Scc4 が、どこに、いつ結合するかが、コヒーシンの最初の染色体結合部位と結合タイミングを決めると考えられる。この反応が DNA 複製と密接に連携していることが、DNA 複製と協調した接着成立のために重要であると予想される。しかしながら、鍵となる Scc2-Scc4 の染色体結合の分子機構は、どの生物種でも全く分かっていなかった。

(2) Cdc7 タンパク質リン酸化酵素の機能

Cdc7 蛋白質リン酸化酵素は DNA 複製開始制御の鍵を握る因子の一つである。染色体 DNA の複製は、G1 期における Mcm2-7 複合体の染色体結合と、S 期での Mcm2-7 活性化の二段階により開始する。Mcm2-7 は複製時に DNA の二重らせんをほどくヘリケースだと考えられているが、G1 期では活性を持たず、S 期に活性化される。S 期での Mcm2-7 の活性化には多数の因子が関与するが、中でも中心的な役割を果たすのが、Cdc7 と CDK の二つの蛋白質リン酸化酵素である。Cdc7 の活性は、活性調節サブユニットである Dbf4 により制御されており、Cdc7 は Dbf4 を介して Mcm2-7 に直接結合しリン酸化することにより、Mcm2-7 を活性化すると考えられている。脊椎動物には Dbf4 のもう一つのホモログである Drf1 が存在し、ツメガエル初期胚では主に Drf1 が Cdc7 を活性化する。CDK は Cdc7 が機能した後に複製開始を制御する。興味深いことに、酵母を用いた解析から、Cdc7 は染色体複製だけでなく、DNA 損傷チェックポイントや減数分裂、染色体分配など様々な反応に関与することが示唆されていた。一方で高等動物の Cdc7 が染色体複製以外に果たす役割についてはよく分かっていなかった。

(3) Cdc7 に依存した Scc2-Scc4 の染色体結合機構

本研究者は当時までに、ツメガエル卵抽出液をモデル系に用いて、Scc2-Scc4 が染色体に結合するためには、Mcm2-7 の染色体結合と、それに依存した Cdc7 の染色体結合が必要であることを発見していた (Takahashi et al., Nat. Cell Biol., 2004, Takahashi et al., Genes Dev., 2008)。さらに、Scc2-Scc4

と Cdc7 は卵抽出液中で複合体を形成していた。加えて、Cdc7 の蛋白質リン酸化酵素活性は Scc2-Scc4 の染色体結合に必要であった。これらの結果は、Cdc7 が Scc2-Scc4 を Mcm2-7 の結合部位に呼び込むというモデルを強く示唆していた。このモデルでは、複製開始のトリガーを引く反応 (Cdc7) とコヒーシンの染色体結合 (Scc2-Scc4) が完全に共役しており、これはコヒーシンを染色体複製開始の前に染色体に結合させるのにきわめて適したシステムであると考えられた。

(4) 当時未解明の問題点

以上の研究成果は、Cdc7 を介したコヒーシンの染色体結合制御が、姉妹染色体の接着にきわめて重要な機能を果たしていることを示していた。しかしながら、その分子機構については大半がよく分かっていなかった。Cdc7 のリン酸化酵素活性は Scc2-Scc4 およびコヒーシンの染色体結合に必要であるが、Cdc7 が何をリン酸化しているかは不明であった。また、Cdc7 がどのように Scc2-Scc4 と相互作用するかも分かっていなかった。さらに、Cdc7 がツメガエル初期胚だけでなく、体細胞でもコヒーシンの染色体結合に関与するか、さらにこの反応がヒトまで保存されているかは未確認であった。

2. 研究の目的

前述した未解明の問題点を踏まえ、本研究では以下の点について明らかにすることを試みた。

(1) Cdc7 と Scc2-Scc4 はどのような分子機構で (直接もしくは間接的に) 相互作用するのか。

(2) Cdc7 のリン酸化酵素活性は Scc2-Scc4 の染色体結合および姉妹染色体接着の成立にどのように機能するか。

(3) Cdc7 は体細胞ではどのようにコヒーシンの染色体結合に機能するか。

本研究では、これらの解析を通じ、Cdc7 が染色体接着に果たす役割を理解することを目指した。

3. 研究の方法

(1) ツメガエル卵抽出液を用いた試験管内反応系

① 実験系の特徴

ツメガエル卵の間期抽出液に精子核 DNA を加えると、1 回の完全な染色体複製が起こる。さらに時間を経過すると抽出液は M 期に移行して染色体が凝集し、M 期染色体を形成する。

このとき、姉妹染色体の接着は、姉妹染色体の対合として顕微鏡下で観察することができる。ツメガエル卵抽出液は、DNA複製と姉妹染色体接着を試験管内で再現できる、現在に至るまで唯一の実験系である。本研究ではツメガエル卵抽出液を主な実験系として用いた。

②抽出液の調整

Walterらの方法 (Walter et al., Mol. Cell 1998) に従った。

③染色体結合アッセイ

ストレプトアビジンビーズにビオチン化DNAを結合させ、これを卵抽出液に加えて一定時間インキュベートした後、ビーズ・DNA複合体を遠心操作により回収し、結合した蛋白質を解析した。

(2) 組換え蛋白質

研究に用いた蛋白質は以下のように調整した。

①Cdc7 タンパク質リン酸化酵素

ツメガエル Cdc7 タンパク質リン酸化酵素は Cdc7 活性サブユニットと Drf1 活性調節サブユニットからなる。CDC7 遺伝子と DRF1 遺伝子を大腸菌プラスミドに組み込み、大腸菌内で共発現させ、Cdc7-Drf1 複合体を発現・精製した。

②Sc2-Sc4

ツメガエル Sc2 および Sc4 遺伝子を T7 プロモーターの下流にクローニングし、ウサギ網状赤血球抽出液由来の試験管内転写・翻訳システム (Promega 社) を用いて蛋白質を試験管内合成した。

4. 研究成果

(1) Sc2 の N 末端 110 アミノ酸は Sc2-Sc4 のクロマチン結合に必要な領域

Sc2 は約 3000 アミノ酸からなる巨大蛋白質であり、全長蛋白質の発現は困難であった。本研究では以前に Sc2 の N 末端 500 アミノ酸が Sc4 と相互作用すること、および、この複合体は Cdc7 に依存した染色体結合能を保持することを発見していた (Takahashi et al., Genes Dev., 2008)。従って、Cdc7 が Sc2-Sc4 と相互作用する領域は、Sc2 の N 末端 500 アミノ酸と Sc4 の複体内に存在すると考えられた。

Sc2-Sc4 内に存在する、Cdc7 に依存した染色体結合領域を正確に同定する目的で、Sc2 の欠失変異蛋白質を作製した。まず Sc2 と Sc4 の複合体形成に必要な Sc2 の領域を絞り込んだところ、Sc2 の N 末端 110 アミノ酸領域 Sc2(1-110) は Sc4 との相互作用を保持していたが、Sc2(1-55) は相互作用を示さなかった。次に Sc2-Sc4 の染色体結合能を

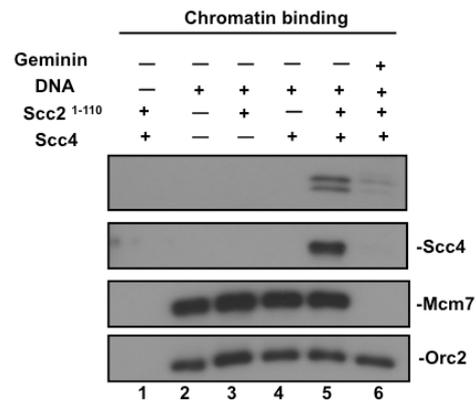


図 1 : Sc2(1-110)-Sc4 の染色体結合

試験管内で発現させた Sc2(1-110) と Sc4 蛋白質をそれぞれ卵抽出液に加え、染色体に結合した蛋白質を回収してウエスタンブロッティングで解析した。Sc2(1-110) と Sc4 を共に加えると、両方の蛋白質が染色体に結合した。この結合は Mcm2-7 の染色体結合を阻害する Geminin 蛋白質により阻害された。

検討したところ、Sc2 の N 末端 110 アミノ酸断片 Sc2(1-110) と Sc4 の複合体は染色体結合能を保持していた (図 1)。一方で、Sc2(1-55) および Sc2(55-165) は染色体に結合しなかった。

この結果から、Sc2-Sc4 の染色体結合に必要な領域は Sc2(1-110) 内部に存在すると考えられた。興味深いことに、Sc2 の 1-110 領域はヒト・ツメガエルなど脊椎動物間で特によく保存されており、この領域が重要な機能を持つことが示唆された。

(2) Sc2(1-110)-Sc4 と Cdc7 は Cdc7 リン酸化酵素活性に依存して直接相互作用する

(1) の結果から、Sc2-Sc4 複合体が Cdc7 に依存して染色体に結合する分子機構は、Sc2(1-110)-Sc4 複合体に保持されていることが予想された。そこで、この複合体が Cdc7 と直接相互作用するかどうかを解析した。

試験管内で発現させた Sc2(1-110)-Sc4 と Cdc7-Drf1 複合体を混合し、Drf1 に対する抗体を用いて Cdc7 を免疫沈降したところ、Sc2(1-110)-Sc4 が共に回収された。興味深いことに、Cdc7 のタンパク質リン酸化酵素活性中心の変異蛋白質 (Cdc7K59E) を用いた場合、この相互作用が検出されなかった。これらの結果は、a) Cdc7 と Sc2-Sc4 は直接相互作用する、b) Cdc7 と Sc2-Sc4 の相互作用には、Cdc7 の蛋白質リン酸化酵素活性が必要である、ことを示唆する。

(3) 体細胞での Cdc7 と Sc2-Sc4 の相互作用

初期胚では DNA 複製と分配が短時間のうちに繰り返され、染色体からの転写は抑制されて

いる。また細胞周期の進行、制御機構は初期胚と体細胞で一部異なることが知られている。本研究からは Cdc7 の活性調節サブユニットである Drf1 と Dbf4 も初期胚と体細胞で異なる制御を受けており、初期胚では Drf1 が、体細胞では Dbf4 が優勢であることを既に発見している (Takahashi et al., Genes Dev. 2005)。そこで本研究がらが発見した Cdc7 と Scc2-Scc4 の相互作用、および Cdc7 に依存した Scc2-Scc4 の染色体結合は、ツメガエル体細胞でも機能しているのかを解析した。

ツメガエル A6 培養細胞の細胞抽出液を作製し、Scc2、Cdc7、Drf1 および Dbf4 の免疫沈降を試みた。Drf1 の免疫沈降画分には Scc2 が検出され、Scc2-Scc4 と Cdc7-Drf1 の相互作用が体細胞でも起きていることが示唆された。一方、興味深いことに Cdc7-Dbf4 は細胞内の不溶性構造体に強固に結合しており、本研究で用いた条件では溶出、免疫沈降が不可能であった。このため、Cdc7-Dbf4 と Scc2-Scc4 の体細胞での相互作用は検討できなかった。これらの結果は Cdc7-Drf1 と Cdc7-Dbf4 の核内局在が異なっていることを示唆しており、Scc2-Scc4 との相互作用も含め、さらなる検討が必要である。

(4) 結果の位置づけ

① Scc2-Scc4 の機能構造

ツメガエル Scc2 は約 3000 アミノ酸の巨大蛋白質である。N 末端約 1500 アミノ酸は脊椎動物にのみ保存されており、C 末端約 1500 アミノ酸はヒトから酵母までよく保存されている。この C 末端領域は HEAT-repeat モチーフを含んでおり、本研究がらの過去の解析からコヒーシンの染色体結合に機能することが分かっている。Scc4 はほぼ全長が TPR-repeat から構成されており、このドメイン構造はヒトから酵母まで保存されている。興味深いことに Scc2 と Scc4 は Scc2 の N 末端 110 アミノ酸を介して相互作用することが本研究から明らかになった。またこの複合体は Cdc7 と相互作用しており、Cdc7 に依存した染色体結合能を保持していた。Scc2 の 500-1500 アミノ酸領域は水溶性アミノ酸に非常に富んでおり、二次構造予測からは disorder 領域であることが予測される。従って、この領域はフレキシブルなリンカーとして機能し、Scc2 の C 末端側のコヒーシン染色体結合ドメインと、Scc2(1-110)-Scc4 からなる染色体結合ドメインを結びつけているという構造が推測される。Scc2-Scc4 の染色体結合機構の理解には、今後、Scc2(1-110)-Scc4 複合体を精製し、この複合体の生化学的な特徴を解析していくことが必要であると考えられる。

② Cdc7 が Scc2-Scc4 を染色体に結合させる分子機構

本研究から、Cdc7 タンパク質リン酸化酵素は Scc2(1-110)-Scc4 と直接相互作用することが明らかになった。Cdc7 の活性調節サブユニットである Drf1 は、単独で染色体に結合する活性を有する (Takahashi et al., Genes Dev. 2005)。Drf1 の染色体結合は Mcm2-7 の染色体結合に依存し、Cdc7-Drf1 は Mcm2-7 を基質とするタンパク質リン酸化酵素であることから、おそらく Drf1 は Mcm2-7 に直接結合すると予想される。従って、Cdc7-Drf1 は Mcm2-7 と Scc2-Scc4 を物理的相互作用で橋渡しすることにより Scc2-Scc4 を Mcm2-7 の結合部位に呼び込むと考えられる。

これに加え、本研究から、Cdc7 の蛋白質リン酸化酵素活性は、Cdc7 と Scc2-Scc4 の相互作用に必要であることが示唆された。従って、Scc2(1-110)-Scc4 が Cdc7 のリン酸化基質であり、リン酸化によって Cdc7 と Scc2-Scc4 の相互作用が引き起こされると推測される。このような例は過去にも Cdk とその基質である Cdc6 で見つかり (Mimura et al., Nature 2004)、同様の機構が Cdc7 と Scc2-Scc4 の間でも機能するかも知れない。Scc2(1-110) もしくは Scc4 に存在すると推測されるリン酸化部位を同定し、その機能を明らかにすることが、さらなる分子機構の解明に必須である。

③ Cdc7 が Scc2-Scc4 染色体結合に果たす役割の種間での保存性

本研究がらが発見した Cdc7 による Scc2-Scc4 の制御は、生物種間でどの程度保存されているのだろうか。Scc2 の 1-110 領域は脊椎動物間で非常に良く保存されていることから、この領域は Scc2-Scc4 の機能に必須であることが推測される。また興味深いことに Drf1 も脊椎動物に保存されている。本研究から、ツメガエル体細胞では少なくとも Cdc7-Drf1 と Scc2-Scc4 の相互作用が存在することが示唆された。Cdc7-Dbf4 の寄与はいまだ不明であるものの、これらの結果は少なくとも脊椎動物の間で、Cdc7-Drf1 に依存した Scc2-Scc4 の染色体結合反応が保存されていることを強く示唆する。今後、ツメガエル体細胞に加え、ヒトなど他の生物種を用いた解析も必要である。

(5) 今後の展望

本研究から、Scc2-Scc4 の染色体結合領域が明確になった。また Cdc7-Drf1 が Scc2-Scc4 を染色体に結合させる分子機構、およびこの反応の体細胞での保存性が示唆された。これらの成果は、コヒーシンによる姉妹染色体接着を制御する、Scc2-Scc4 の染色体結合反応の解明に大きく寄与する。一方、現在まで

Sec2-Scc4 染色体結合反応の構造的な理解は乏しく、Cdc7 が Sec2-Scc4 をどのようにリン酸化し、Sec2-Scc4 とどのように結合するのかは不明である。また、Sec2-Scc4 のリン酸化が細胞周期や染色体領域ごとに制御されるかどうかなど、未解明の重要課題は多数残っている。これらを解明するには、Sec2-Scc4 の染色体結合ドメインである Sec2(1-110)-Scc4 複合体を精製し、そのリン酸化と三次構造を生化学的、構造的に明らかにすることが必要である。さらに、Sec2-Scc4 の染色体結合制御の理解には、この複合体のリン酸化サイトを同定し、Sec2-Scc4 のリン酸化が生細胞内でどのように制御されるのかを解明する事が重要である。コヒーシンの染色体結合を制御する Sec2-Scc4 がどのように機能するかを理解することにより、コヒーシンによる正確な染色体分配の分子機構の理解が大きく進展すると期待される。

研究協力者
板岡 貴子 (ITAOKA TAKAKO)
大阪大学・大学院理学研究科・修士課程 2 年

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)

英文総説

① Sherwood, R., *Takahashi, T.S., and *Jallepalli, P.V. (2010). Sister acts: coordinating DNA replication and cohesion establishment. *Genes Dev.* 24, 2723-2731.
(*corresponding authors) 査読有り

[その他]

ホームページ等

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/masukata/research/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 達郎 (TAKAHASHI TATSURO)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50452420

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：