

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570183

研究課題名(和文)複製停止を感知する複合体による停止フォーク安定化機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism for arrested fork stabilization by fork recognition complex

研究代表者

田中 卓(TANAKA, Taku)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：80425686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：フォーク安定化因子による停止フォーク認識機構の解析は、複製再開反応の全容解明に必須の課題である。本研究において大腸菌フォーク安定化因子PriAを指標に、複製停止とその再開を観察したところ、新たに活性化される複製起点の存在を示唆する結果を得た。通常の制御機構に依存しないこの複製開始様式は、RNA-DNAハイブリッドの形成に依存する可能性が示唆され、より原始的な複製機構を反映しているものと考えられる。これは、真核細胞における多数の複製起点が活性化するシステムへの進化の過程を明らかにしうる、重要な知見である。

研究成果の概要(英文)：Analyses for arrested replication fork recognition by fork stabilizing factor are important for elucidation of molecular mechanism of replication restart reaction. Escherichia coli PriA protein, bacterial fork stabilizing factor which can bind to arrested replication forks, can be used as an indicator for detection of arrested forks in living cells. PriA binds to novel replication origin and replication restart, which is activated by origin-independent system, depends on formation of RNA-DNA hybrid. RNA-dependent initiation system for replication may reflect primitive replication mechanism and these findings shed light on evolution of eukaryotic replication system.

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：DNA複製 複製起点 複製再開 マイクロアレイ PriA RecA 複製フォーク フォーク安定化因子

1. 研究開始当初の背景

DNA複製進行は、DNAヘリカーゼによる二本鎖開裂と、DNAポリメラーゼによる相補鎖合成の協調によって駆動される。進行中の複製フォークが障害と衝突すると、この協調が失われ、DNA合成を伴わない巻き戻しが進行し、不安定な一本鎖領域が伸展する。この領域は安定化因子により安定化されないと、フォーク崩壊からゲノムの不安定性を引き起こし、細胞死や癌化等の要因となるため、停止フォークの感知と安定化はもっとも重要なステップである。しかしながら、この認識に関わる分子機構は不明であり、その後のプロセッシングを担う因子群の詳細な機能も明らかにされていない。フォーク安定化機構の全体像の確立には、これらの因子の同定および、その基盤となる生化学的活性の決定、さらには形成される複合体機能の確定によるモデル構築が必須の課題となる。

申請者らは、以前大腸菌の停止フォーク特異的結合タンパク質、PriA (DEXH型DNAヘリカーゼ) が、停止フォーク感知因子であると想定して解析し、そのDNA結合ドメイン (Tanaka *et al.*, 2002) と、3'末端結合ポケット (TT-pocket) の存在を明らかにし (Mizukoshi *et al.*, 2003、Masai *et al.*, 2010)、その結合様式を詳細に解析して (Tanaka *et al.*, 2007、図1)、フォーク安定化の新規モデルを提出し

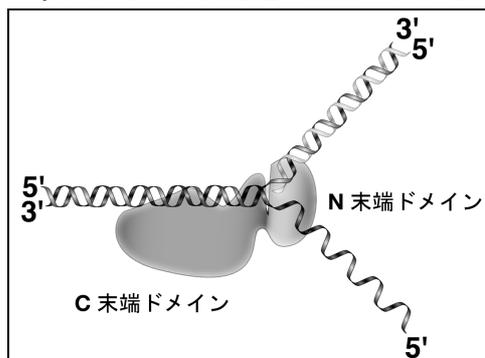


図1. 大腸菌 PriA によるフォーク安定化モデル。PriA は N 末端側に存在する 3' 末端結合ポケットにより、停止フォークリーディング鎖 3' 末端を特異的に認識する。強固な結合のためには、C 末端側領域との協調が必要とされる。この高親和性で安定な結合により、停止フォークを崩壊から保護し、安定化していると考えられる。

た (Tanaka and Masai, 2006)。さらに、結晶構造解析により、3'末端認識のユニークな構造基盤を確立した (Sasaki *et al.*, 2007)。これらの結果は、停止フォークの特異的認識に関わる分子モデルを初めて提示するものであり、真核細胞フォーク安定化因子が同様の認識様式を有している可能性を強く示唆している。

分裂酵母で見出されたフォーク安定化因子、Mrc1 および Swi1-Swi3 複合体は、高度に保存されており、遺伝学的研究からゲノムの安定性維持に必須であることが明らかにされている。これらは複合体として停止フォーク

クを認識し、結合により安定化していると予想される。そこで、これらの因子の生化学的性状と、複合体としての機能を明らかにするため、精製タンパク質の詳細な分析を行った (図2)。その結果、これらは、単独でも DNA 基質と結合するが、両タンパク質の共存下では、フォーク構造

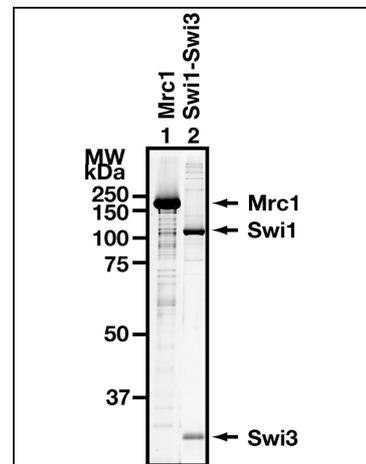


図2. 分裂酵母 Mrc1 と Swi1-Swi3 複合体の精製。FLAG タグ (Mrc1 および Swi1) および、Histidine タグ (Mrc1 および Swi3) 付きのタンパク質を大腸菌で増産、ニックルおよび抗 FLAG アフィニティーカラムと MonoQ カラムにより精製し、12% SDS-PAGE にて分離、銀染色した。

を有する DNA 基質と高親和性に 3 分子複合体を形成することを見出した (Tanaka *et al.*,

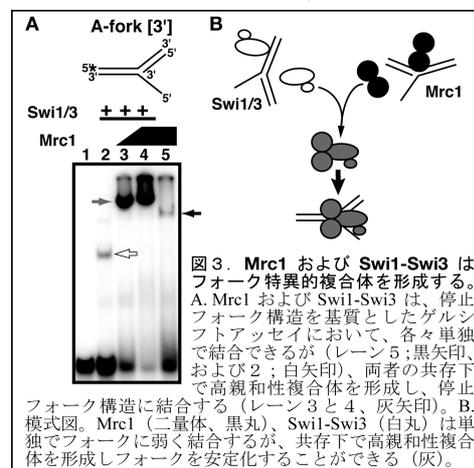


図3. Mrc1 および Swi1-Swi3 はフォーク特異的複合体を形成する。A. Mrc1 および Swi1-Swi3 は、停止フォーク構造を基質としたゲルソフトアッセイにおいて、各々単独で結合できるが (レーン5; 黒矢印、および2; 白矢印)、両者の共存下で高親和性複合体を形成し、停止フォーク構造に結合する (レーン3と4、灰矢印)。B. 模式図。Mrc1 (二量体、黒丸)、Swi1-Swi3 (白丸) は単独でフォークに弱く結合するが、共存下で高親和性複合体を形成しフォークを安定化することができる (灰)。

2010、図3)。このことは、この複合体形成が、停止フォークの感知・安定化に重要な役割を果たしている可能性を示唆する。これらのタンパク質はフォーク複合体の構成因子であり、特に Swi3 ホモログは MCM ヘリカーゼと相互作用することから、フォーク安定化因子が、MCM の活性を直接あるいは間接的に制御している可能性が示唆される。従って、フォーク複合体との相互作用と活性制御を解析することで、フォーク安定化機構の分子動態を確立することが可能となる。また、この特異的感知と相互作用を利用して、フォーク相互作用因子を網羅的に同定し、機能解析により役割を特定することで、複製再開反応に新しい洞察を与えることが期待できる。

2. 研究の目的

本申請研究は、停止複製フォーク安定化因子およびこれらと特異的に相互作用するタンパク質の生化学的活性および分子間相互作用を解析することによって、停止フォーク

安定化の分子機構を解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、停止フォーク安定化の分子機構を、ヘリカーゼ活性の制御に注目して解明することを計画している。そのため、まず真核細胞フォーク安定化因子の候補である Mrc1 および Swi1-Swi3 の存在下で MCM による DNA 巻き戻し活性を測定し、ヘリカーゼ活性への影響を検証する。また、この機構に関わる新規の因子と経路を同定するため、分裂酵母細胞抽出液から、停止フォーク構造や、フォーク安定化因子と相互作用する因子群を分離同定する。これら候補因子を精製し、単独時および複合体形成時の DNA 結合能、分子間相互作用、および MCM との関わりを詳細に解析することで、ヘリカーゼの活性制御に基づく停止複製フォーク安定化の分子機構を確立する。

#### (1) 分裂酵母 Mrc1 および Swi1-Swi3 の MCM ヘリカーゼとの相互作用の解析

フォーク安定化因子が MCM ヘリカーゼの活性に及ぼす影響を検証するため、フォーク安定化因子と、二本鎖開裂を司る MCM ヘリカーゼとの相互作用を解析する。分裂酵母 MCM ヘリカーゼと、Mrc1 および Swi1-Swi3 の野生型あるいは変異体タンパク質が、MCM の二本鎖巻き戻し活性に及ぼす影響を様々な条件下で検証する。さらに、MCM の活性化因子、Cdc45、GINS 等との相互作用を細胞抽出液からの免疫沈降法等で調べ、フォーク安定化因子が MCM の活性調節に及ぼす影響を解析する。この解析により、ヘリカーゼの活性制御によるフォーク安定化機構の確立を試みる。

#### (2) 分裂酵母フォーク安定化因子と相互作用する因子の同定、および構築される複合体の機能と役割の確定

停止フォークの安定化を制御する機構は複数あることを想定し、当研究室で開発された Mrc1 あるいは Swi1 または Swi3 の特異的抗体を利用して、細胞の抽出液から、特異的相互作用タンパク質を分離、質量分析法により同定する。ここで新規に同定された因子を精製し、個々の因子およびそれらが構築する複合体の生化学的機能と、複合体形成能の解析から、フォーク安定化機構における役割を特定することで、本分子機構のモデルを構築する。通常免疫沈降法に加え、特に抗 Swi1 抗体は特異性が非常に高いので、抗体を固定したカラムによって、相互作用因子を分離する手法も利用する。

#### (3) 真核細胞における停止フォークを感知する因子の網羅的探索とその機能解析

DNA 基質側からのアプローチとして、DNA3'および5'末端、あるいはフォーク構造

を有する DNA を結合したカラムにより、酵母抽出液から、これらの基質に特異的に結合するタンパク質を分離し、質量分析法により同定する。同定されたタンパク質のフォーク特異的結合能、ヘリカーゼ活性測定等の生化学的機能解析を行うとともに、遺伝的解析から、それらのフォーク安定化機構における役割を特定することで、本機構に寄与する新規因子を同定するとともに、申請者が大腸菌で提出したモデルの普遍性を検証する。

### 4. 研究成果

細胞内で停止した DNA 複製フォークは、フォーク安定化因子により保護・安定化される。これまでに、真核細胞で、Mrc1 と Swi1-Swi3 複合体が、フォーク安定化因子として合成停止フォーク構造を特異的に認識することを報告した。この認識は、複製再開反応の最初期に必須の極めて重要な機能であるが、これらの因子が細胞内で実際に停止フォークに結合していることを示す証拠は報告されていない。複製再開の分子機構解明のためには、安定化因子によるフォークの認識様式を明らかにすることが必須となる。当初、真核細胞のフォーク安定化因子と複製装置構築タンパク質群を用いた一連の生化学的解析を計画したが、タンパク質精製の難易度が高いため、純度の高い標品が得られておらず、遂行が遅れた。一方で、停止フォークを検出する技術を確立することが重要課題であることから、当研究室でよく研究され、実績の多い大腸菌を用いた系で、検出方法の開発を試みた。大腸菌のフォーク安定化因子である PriA タンパク質を、細胞内におけるフォークの停止を示すインジケータとして利用して、染色体免疫沈降法 (ChIP) と組み合わせたマイクロアレイ (chip) 解析 (ChIP-on-chip) を行った。チミン要求性株に枯湯処理をすると、進行中の複製フォークが停止するが、この細胞において、複製起点 *oriC* 近傍にピークのクラスターを検出した。また、RNA-DNA ハイブリッドの RNA を分解する RNaseHI は、複製装置を妨害する可能性のある転写副産物を解消する役割を担っており、この遺伝子の欠損株では、複製起点 *oriC* と開始タンパク質 DnaA 非依存的に開始される特殊な複製機構が活性化されている。この *oriC*-DnaA 非依存性の複製機構においては、複製終結点付近において新たに複製が開始されていることを示唆する結果を得た。組換えタンパク質 RecA がこの領域に結合していることを新たに見出し、RecA 依存性の RNA-DNA ハイブリッド形成が *oriC*-DnaA 非依存性複製の開始に重要な役割を果たしている可能性を示唆する結果を得ている。実際にこの結合領域で DNA 合成が開始される様子を、チミンの類似体である BrdU でパルスラベルしたゲノムを用いた、抗 BrdU 抗体による ChIP-on-chip で確認し

た。本研究で、フォーク安定化因子 PriA と組換えタンパク質 RecA が生細胞内の停止フォークに結合していることを見出し、その解析から、複製再開に必須の新たなゲノム領域を、複製基点以外に見出した。これらの結果は、複製停止から停止フォーク安定化を経て複製再開に至る過程で起こる現象の直接的証拠を初めて示すものであり、複製再開反応の分子機構の確立に寄与する重要な知見であると考えている。また、*oriC*-DnaA 非依存性複製は、より原始的な現象を反映していると考えられることから、本研究は、複製機構の進化の研究に、新たな視点を提供するものである。これらの研究成果は、平成 26 年度中に英文専門誌へ発表する予定である。

#### 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0件)

[学会発表](計3件)

1. Tanaka, T. and Masai, H., PriA binds to *oriC* segments upon induction of fork stall in *Escherichia coli* cells. 第36回日本分子生物学会、2013年12月4日、神戸

2. Iwasaki, R., Tanaka, T. Shimada, A., Kohda, D., and Masai, H., Toward the elucidation of molecular basis of kinase activation and substrate recognition of Cdc7-Dbf4 kinase complex: use of Microsporidia as a model. 第35回日本分子生物学会、2012年12月12日、福岡

3. Tanaka, T. and Masai, H., Detection of chromosomal fragile sites: application of specific PriA binding to arrested replication forks in living cells. 第34回日本分子生物学会、2011年12月15日、横浜

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 卓 (TANAKA, Taku)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：80425686