

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570204

研究課題名(和文) DNA複製フォークでの分子集合と複製ヘリカーゼの役割の解明

研究課題名(英文) Protein assembly at DNA replication fork and role of replication DNA helicase

研究代表者

石見 幸男 (Ishimi, Yukio)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：80159772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：MCM2-7のDNAヘリカーゼ機能によって牽引されるDNA複製フォークの進行は、様々なMCM相互作用因子の働きによって制御される。それらの因子とMCM2-7各タンパク質の相互作用を明らかにした。CMG複合体のCDC45はMCM2-7のすべてに結合する特徴を示した。同様な特徴を、MCM2-7の働きを抑制すると考えられるMCM-BPも示した。このような強い結合性がMCM複合体の構造変化を通じた機能制御に重要であると考えられる。他の相互作用因子の多くは、DNAヘリカーゼ活性発揮に重要なMCM6のATP結合部位に結合性を示した。これらはMCM6の機能変化を通じてMCM機能制御に関わると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DNA replication fork progressed by MCM2-7 helicase is regulated by action of MCM interacting proteins. I clarified interaction of MCM2-7 with the MCM interacting proteins. CDC45 that is a component of CMG complex extensively interacted with all of MCM2-7. Similarly MCM-BP that is probably involved in inhibition of MCM2-7 complex interacted all of MCM2-7. This feature may be important for regulation of MCM function through structural change of MCM2-7 complex. Other MCM interactants bound to ATP binding domain of MCM6 and this binding may play a role in regulation of MCM function, since ATP binding to MCM6 is critical for MCM function.

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：MCMヘリカーゼ DNA複製フォーク タンパク質相互作用

1. 研究開始当初の背景

ヒト細胞を含む真核細胞 DNA 複製については、DNA 合成の基本的な部分については、大腸菌と同様な機能をもつタンパク質群が働く一方で、大腸菌には見られない因子が開始と伸長に機能していることが、出芽酵母を用いた実験結果を中心に明らかにされている。真核細胞 DNA の複製起点数は多く、かつ、長大な DNA を一定の時間内に複製させるために、大腸菌には見られない DNA 複製制御機構が存在する。

一つ目は、一度の細胞分裂(細胞周期の S 期)で、DNA に結合した因子が、一度のみの DNA 複製を許可する DNA 複製ライセンス機構である。この制御機構の中心は、MCM(minichromosome maintenance)2-7 タンパク質である。複製起点認識タンパク質複合体 ORC と CDT1, CDC6 の助けを借りて起点に結合した MCM2-7 の 6 量体は、S 期の適当な時期に活性化され、鋳型 2 本鎖 DNA を巻き戻す DNA ヘリカーゼとして機能する。機能し終えた MCM ヘリカーゼは DNA から離れるが、その MCM の DNA 再結合は、CDK による CDT1 と CDC6 の不活性化により抑制される。このために、S 期において複製起点からの重複した複製開始は阻止される。この制御により、異常な構造をもつ DNA の娘細胞への伝達が阻止される。

二つ目は、DNA 複製進行の制御である。鋳型 DNA 上の傷などによって、DNA 合成が途中で止まる場合がある。この時に、MCM ヘリカーゼによる巻き戻し反応を抑制することで、これら 2 反応を協調させ、複製フォーク構造の安定化をもたらすが、DNA 複製チェックポイント制御系である。タンパク質リン酸化酵素などの多くの因子が関与する本制御系は、フォーク構造の安定化とともに細胞周期の遅延などの様々な効果をもたらす。この制御が崩れると、細胞がん化の原因となる異常な構造 DNA を娘細胞に伝達する不都合が生じる。このように、DNA 複製制御は細胞がん化抑制に重要な役割を果たすが、その機構は分子レベルで理解されていない。

2. 研究の目的

上記の 2 つの制御に関係して、テーマ(1)では、DNA 複製フォークでのタンパク質の分子集合を明らかにする。以下の(1-)、()の 3 つのサブテーマから構成される。

(1-) MCM2-7 の活性化: DNA 複製にヘリカーゼとして機能する MCM2-7 複合体には、活性化の過程がある。CDC45 や GINS 複合体により MCM2-7 複合体のヘリカーゼ機能が発揮されると考えられているが、その活性化の機構や活性化された MCM 複合体の構造については不明である。MCM2-7, CDC45, GINS サブユニット間の相互作用を明らかにすることで、活性化の機構に迫る。

(1-) DNA 合成酵素の結合: 複製フォークでのリーディング鎖合成には DNA 合成酵素 ϵ が働き、ラッピング鎖合成には DNA 合成酵素 δ

と α とが機能する。鋳型 DNA の巻き戻しと DNA 合成を協調させるための仕組みとして、それぞれの DNA 合成酵素と MCM ヘリカーゼの働きを協調させる必要がある。現在までに、その機能を媒介する因子として、合成酵素 ϵ の場合には Claspin が、合成酵素 α には MCM10 と AND-1 タンパク質が機能することが提唱されている。しかし、それらの分子間相互作用の実体を、統一的に評価した研究はない。上記因子に加え、MCM2-7 とチェックポイント因子 TIM/TIPIN 複合体も加え、各タンパク質間の相互作用の有無を調べる。

(1-) RPA との結合: これまでに、複製フォークに存在する一本鎖 DNA 結合タンパク質(RPA)と他の複製タンパク質との結合を網羅的に調べ、報告された結合を確認するとともに新規の結合を我々は明らかにしている。これらの結合を、細胞レベルの実験によって確認する。

以上の実験により、DNA 複製フォークでのヒト複製タンパク質群の相互作用の実体を明らかにする(テーマ(1))。加えて以下に述べるように、MCM ヘリカーゼに関連して、MCM2-7 複合体形成異常と細胞がん化をつなぐ過程を解明し(テーマ(2))、3種の複製ヘリカーゼの役割分担を明らかにする(テーマ(3))。

(2) MCM 複合体形成と DNA 構造の不安定化機構: マウスで乳がんを発症させる変異として MCM4 の F345I が同定された(Shima et al., 2007)。がん化への過程を明らかにする目的で、ヒトで同じ変異 MCM4 発現系を作成した。現在まで、変異 MCM4 が主に MCM6 との結合性において欠陥をもつことを我々は明らかにしている。この結果から、変異 MCM4 をホモにもつマウスでは、核内移行後に DNA 複製起点に結合する MCM2-7 複合体の数が減少し、S 期の間に完全に複製されない DNA 領域が生じ、最終的に、異常構造 DNA が娘細胞に伝達される可能性が考えられる。

このモデルの中で、変異 MCM4 発現 MCM 複合体形成異常 DNA 構造異常の流れを検証する。

(3) 複製 DNA ヘリカーゼの特徴の比較: DNA 複製に DNA ヘリカーゼとして機能するのは、MCM ヘリカーゼの他に、RECQL4 ヘリカーゼとヘリカーゼ B がある。前者は、DNA 修復因子群の一つだが、DNA 複製に Sid2 機能とともにヘリカーゼとして働く。後者については、マウスの変異体を用いた解析で DNA 複製に必要であることが証明されている。よって、これら 3 種のヘリカーゼの役割分担が予想される。そこで、3ヘリカーゼの生化学的な性質を比較することで、役割分担を考察する。ヘリカーゼ B と RECQL4 の細胞内での挙動も調べる。

3. 研究の方法

(1) フォークでの分子集合

(1-) MCM2-7 の活性化: DNA 複製起点に

結合した MCM2-7 複合体は、CDC45 と GINS 複合体により活性化され、主な複製ヘリカーゼとして機能すると考えられる。しかし、活性化へ至る過程と活性化 MCM ヘリカーゼの構造の実体は不明である。これまでに、出芽酵母を用いた遺伝学的な解析から CDC45 と MCM7 との結合、GINS 複合体と MCM4 との結合が示唆されているのみである。我々は、これら 11 種のヒトタンパク質の発現系を有しているため、それらタンパク質間の結合を網羅的に調べることで、活性化の初期段階を明らかにする。

実際には、組換えバキュロウイルスを使って複数の上記タンパク質を昆虫細胞内で発現させ、細胞抽出液中の特定タンパク質を付加したタグを頼りに免疫沈降させる。特定タンパク質とともに共発現されたタンパク質が共沈降するかどうかをウエスタン法で調べる。対照実験として、特定タンパク質非存在下で同様の実験を行い、共沈降が、タンパク質間相互作用によることを確認する。これまでに我々は、複製フォークに存在する RPA と他の複製タンパク質間結合を網羅的に調べ、この手法が有効であることを確認している。

(1 -) DNA 合成酵素との結合：DNA 複製フォーク推進と DNA 合成とが協調して起こることは、複製フォークでの DNA 鎖切断を防ぐ上で必要である。リーディング鎖合成を担う DNA 合成酵素 ϵ と MCM ヘリカーゼとの協調を媒介する因子として Claspin が想定されている。一方、ラギング鎖合成を担う DNA 合成酵素 α と MCM との間には、MCM10 と AND-1 タンパク質が関与すると示唆されている。一方で、DNA 複製チェックポイントに機能する TIM/TIPIN 複合体は、Claspin と結合することが分かっているが、その複合体は AND-1 とも結合すると言われている。しかし、これら相互作用は、細胞レベルで 2 タンパク質間でのみ調べられている。そこで、これらタンパク質間の結合を(1 -)と同じ手法を用いて網羅的に解析することで、有意な結合をすべて抽出する。この実験に用いるタンパク質に関しても、そのバキュロウイルス発現系をすべて用意している。

(1 -)RPA との結合：RPA と他の複製タンパク質間の結合を細胞レベルで確認するために、タグ付きの RPA2 を細胞内で恒常的に発現する HeLa 細胞を樹立する。この細胞系の選択には、抗生物質耐性遺伝子と RPA2 遺伝子が単一 mRNA として転写される系を用いる。

(2)MCM 複合体形成と DNA 構造の不安定化機構：これまでに、バキュロウイルス発現系により、マウスで乳がんを発症させる変異 MCM4(F345I)と同じヒト変異 MCM4 は、主に、MCM6 との結合に不具合があるために、核内輸送複合体である MCM2/4/6/7 もしくは MCM2-7 複合体形成が十分でないと考えられる。そのことを検証するために、野生型 MCM4 に比べ

変異 MCM4 のクロマチン結合性が低下するかどうかを細胞分画法とウエスタン法により調べる。

(3)複製 DNA ヘリカーゼの特徴の比較：DNA 複製フォーク推進に主な役割を担うと考えられる MCM ヘリカーゼに加え、RECQL4 とヘリカーゼ B という 2 種のヘリカーゼが DNA 複製に機能すると考えられる。ヘリカーゼ B については、特に DNA 複製開始に機能すると予想される。これら 3 種のヒトタンパク質を精製する。MCM ヘリカーゼとしては調製済みの MCM4/6/7 複合体を用いる。RECQL4 の精製法は報告済みである。ヒトヘリカーゼ B のバキュロウイルス発現系は構築済みなので、付加したタグを使った精製法を確立する。

4. 研究成果

(1)フォークでの分子集合と MCM の活性化：昆虫細胞内強制発現系と引き続く免疫沈降実験から、CDC45 は MCM2-7 のすべてのサブユニットと、さらには GINS サブユニットの SLD5 と PSF3 との結合性を有することが分かった。一方で GINS 複合体タンパク質ビーズによるプルダウン実験より、GINS は MCM2 と MCM3 と特に結合し、さらに、CDC45 とも結合することが分かった。昆虫細胞での発現と免疫沈降実験およびグリセロール密度勾配遠心法により、CDC45 は MCM3 と高い結合性を示し、加えて MCM4,5,7 との結合性も示すことが分かった。一方で、CDC45, MCM2-7 および GINS の共発現とタグを利用した精製では、それらをすべて含む CMG 複合体はごくわずかにしか形成されなかった。よって、この方法で CMG を容易に調製できるほどは、3 者の親和性は高くないと結論される。他の MCM 相互作用因と比較して CDC45 は MCM2-7 のすべてに結合する特徴をもつ(図 1)。

	MCM2	MCM6	MCM4	MCM7	MCM3	MCM5
CDC45	++	++	++	++	++	++
MCM-BP	++	++	++	++	++	++
RPA	-	++	++	++	++	++
TIM	-	++	++	+	++	++
TIPIN	-	+	+	++	++	+
MCM10	-	++	++	++	-	-
Rb	-	+	-	+	++	-
Claspin	-	++	-	-	++	+
GINS	++	-	-	-	++	-

図 1 . MCM 相互作用因子と MCM2-7 の結合
昆虫細胞内で MCM2-7 各タンパク質と相互作用因子を共発現させ、免疫沈降法により相互作用を調べた。強さの程度を、+/-で表した。

DNA 合成酵素との結合：チェックポイント因子の Claspin が、DNA 合成酵素 α の p180 サブユニットと、さらに DNA 合成酵素 ϵ の p59

サブユニットとの結合性を有することが、昆虫細胞内強制発現系と引き続く免疫沈降実験から明らかになった。フォークにおいて MCM2-7 ヘリカーゼと DNA 合成酵素 α の協調に機能することが提唱されている MCM10 の性質について調べた。特異抗体を用いた細胞レベルの実験では、細胞周期の S 期から G2 期にかけて、MCM10 はクロマチン結合画分に定常的なレベルで回収されることが明らかになった。この MCM10 の局在は、PCNA などのフォーク因子の存在様式とは異なるものであり、フォークのみに限局して局在する証拠は得られなかった。一方で、発現して精製した MCM10 タンパク質の性質を調べる実験から、MCM10 は、それ自身が多量体を形成すること、そして、一本鎖 DNA 結合性を有することが分かった。多量体を形成することから、フォークで機能する MCM10 タンパク質が DNA 分解酵素処理により可溶性画分に抽出されにくい可能性が考えられる。

MCM 結合タンパク質の MCM 結合領域の同定: DNA 複製フォーク進行の制御に関わると考えられる MCM-BP タンパク質が MCM2-7 すべてと結合性を示すことを明らかにした。さらに、MCM-BP は、MCM2, MCM6 および MCM7 のアミノ末端領域 (AAA+ドメインを含まず Zn フィンガーを含む) と特異的に結合することが分かった。MCM のアミノ末端側は、MCM2-7 タンパク質間の相互作用に機能すると考えられるので、MCM-BP の作用は、MCM2-7 複合体形成に甚大な影響をもつと考えられる。

MCM 結合タンパク質の 9 種について MCM6 内の結合部位を明らかにした。MCM-BP が MCM6 のアミノ末端領域にも親和性があるのとは対照的に、他のすべてのタンパク質は、MCM6 内の ATP 結合部位を含むカルボキシ末端領域に親和性を示した (図 2)。Tim タンパク質は、MCM6 のまさに ATP 結合部位に結合性を示した。よって、Tim などは、MCM2-7 の ATP 結合性、ATP 分解活性および DNA ヘリカーゼ活性に直接的に作用する可能性が示唆された。

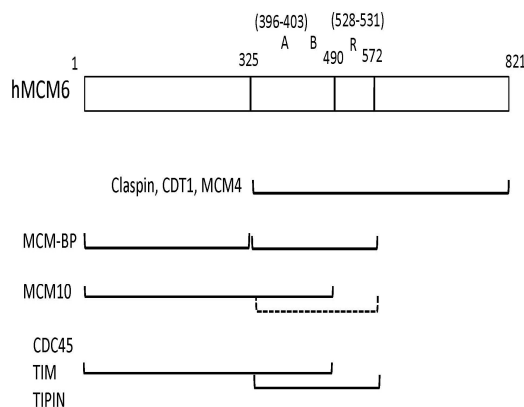


図 2 . MCM6 と相互作用因子の結合領域

断片化したヒト MCM6 と相互作用因子を昆虫細胞内で共発現させ、免疫沈降法により結合を調べた。相互作用因子の結合した MCM6 断片を示す。

RPA との結合: タグ付き RPA2 を恒常的に発現する HeLa 細胞株を樹立した。それは、内在性の RPA2 量とほぼ同程度の発現量を示した。この外来性 RPA2 は、内在する RPA1 と複合体を形成することが免疫沈降実験から示された。外来性 RPA2 発現細胞を Flag 抗体で免疫沈降したところ、外来性 RPA2 とともに RPA1 との共沈降が確認された。DNA 複製フォークに存在する可能性のある DNA 複製因子として、MCM4, PCNA, および TIM タンパク質の共沈降を調べたが、それらの共沈降は認められなかった。この実験では、クロマチンをマイクロコッカルヌクレアーゼで分解した遠心上清を免疫沈降の材料として用いたが、DNA 分解の過程でフォークに集合したタンパク質が解離した可能性が考えられる。そこで、DNA 分解の前に DNA とタンパク質を固定する処理を行い、同様の実験を行っているが、現在のところ、RPA2 の沈降に伴う他複製因子の共沈降は検出できていない。

(2) MCM 複合体形成と DNA 構造の不安定化機構: 変異 MCM4 のクロマチン結合性を調べる実験は、技術的に難しいことが判明した。一方で、昆虫細胞強制発現系と引き続く免疫沈降実験から、変異 MCM4 は MCM6 との結合が野生型の約 3 割程度に低下すること、しかし、他の MCM サブユニットとの結合能は低下しないことが示された。ヒト HeLa 細胞で、変異 MCM4 を発現させ、タグを利用した免疫沈降実験を行ったところ、共沈降する MCM6 などの低下が、野生型 MCM4 に比較して観察された。

さらに、変異 MCM4 の局在を免疫蛍光顕微鏡観察したところ、野生型 MCM4 で見られる核局在がほとんど観察されず、細胞質に主に局在することが分かった。この結果は、変異 MCM4 の場合には、核移行の複合体と考えられる MCM2/4/6/7 の複合体が、変異 MCM4 と内在性 MCM6 との結合不調により、形成されにくいことが示唆された。このように変異 MCM4 は MCM6 との結合不全を原因として核内での MCM2-7 複合体の形成に支障をきたし、クロマチン上に十分な複製前複合体が形成されないことが強く示唆された。

変異 MCM4 遺伝子を、発現を制御された形で行える、HeLa-Tet-off 発現系に組み入れることに成功した。変異 MCM4 遺伝子を発現させ、変異タンパク質を発現させた細胞では、DNA 合成の指標となるプロモデオキシウリジンの取り込みがほぼまったく検出されなかった。一方で、野生型 MCM4 タンパク質を発現させた HeLa 細胞では、そのような DNA 合成の阻害は認められなかった。この結果は、変異型 MCM4 タンパク質が優性で負の効果

を發揮し、おそらく MCM2-7 の複合体形成の阻害を介して、DNA 合成を阻害したと考えられ、我々のモデルが正しいことを支持する。

(3) 複製 DNA ヘリカーゼの特徴の比較：ヒトヘリカーゼ B の強制発現昆虫細胞よりの精製法を確立した。加えて、これまで困難であった MCM2-7 複合体の精製法を確立した。MCM, RecQL4 そして helicaseB の 3 つの DNA 複製に働くヘリカーゼの性質の比較を行った。DNA 依存的な ATP 分解活性については、MCM4/6/7 と RecQL4 が低い活性を示すのに対し、helicaseB は圧倒的に強い活性を示した。このことは、helicaseB がモデル複製系において唯一 DNA 複製を促進する機能があることと符号する。このような結果は、helicaseB の DNA 複製での役割を支持する。

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 7 件)

Kusunoki, S. and Ishimi, Y. (2014) Interaction of human minichromosome maintenance protein-binding protein with minichromosome maintenance 2-7. *FEBS J.* 281: 1057-1067.

(査読有)

Moritani, M. and Ishimi, Y. (2013) Inhibition of DNA binding of MCM2-7 complex by phosphorylation with cyclin-dependent kinases. *J. Biochem.*, 154: 363-372 (査読有)

Takaya, J., Kusunoki, S. and Ishimi, Y. (2013) Protein interaction and cellular localization of human CDC45. *J. Biochem.* 153: 381-388. (査読有)

Nakano, T., Miyamoto-Matsubara, M., Shoukamy, M.I., Salem, A.M., Pack, S.P., Ishimi, Y. and Ide, H. (2013) Translocation and stability of replicative DNA helicases upon encountering DNA-protein cross-links. *J. Biol. Chem.* 288: 4649-4658. (査読有)

Watanabe, E., Ohara, R. and Ishimi, Y. (2012) Effect of an MCM4 mutation that causes tumours in mouse on human MCM4/6/7 complex formation. *J. Biochem.* 152: 191-198. (査読有)

Sugiyama, T., Chino, M., Tsurimoto, T., Nozaki, N. and Ishimi, Y. (2012) Interaction of heliquinomycin with single-stranded DNA inhibits MCM4/6/7 helicase. *J. Biochem.* 151: 129-137. (査読有)

Kon, R., Kusunoki, S., Nozaki, N. and Ishimi, Y. (2011) Binding of human MCM-BP with MCM2-7 proteins. In DNA replication-Current advances, pp545-564 (In Tech)(査読無)

[学会発表](計 5 件)

楠俊輔、石見幸男、MCM-BP と MCM2-7 の相互作用、日本分子生物学会、2013/12/4、

神戸

石見幸男、守谷真梨子、CDK2/サイクリン A による MCM2-7 複合体の DNA 結合阻害、日本生化学会、2013/9/12、横浜

石見幸男、守谷真梨子、CDK2/サイクリン A による MCM2-7 複合体の DNA 結合阻害、日本生化学会関東支部例会、2013/6/15、山梨

高屋潤一郎、野崎直仁、石見幸男、ヒト CDC45 のタンパク質相互作用と細胞内局在、日本分子生物学会、2012/12/13、福岡
杉山隆史、千野信、釣本俊樹、野崎直仁、石見幸男、ヘリキノマイシンと一本鎖 DNA との相互作用による MCM4/6/7 ヘリカーゼの阻害、日本分子生物学会、2011/12/15、横浜

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://idna.sci.ibaraki.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石見 幸男 (Ishimi, Yukio)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：80159772

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし