

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：32670

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570200

研究課題名(和文) ヒトORC結合性RNAの構造と作用機作

研究課題名(英文) Analysis of the structure and function of the RNA bound by human ORC

研究代表者

和賀 祥 (WAGA, SHOU)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：60222402

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト複製開始因子であるORCに関する生化学的な解析を行った。その結果、ヒトORCがグアニン四重鎖を形成する配列(G4モチーフ)をもつRNAあるいはssDNAに優先的に結合する活性を見出した。さらに、その活性をもつORC1にG4モチーフ結合ドメインがあることを見出し、ドメイン中の結合に重要なアミノ酸の同定を行った。また、ORCのG4モチーフ結合には特異性があることを明らかにした。G4モチーフは複製開始点の多くの近傍にあることから、ORCのG4モチーフ結合活性は、複製開始点の確立に関与している可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the biochemical characteristics of human ORC, one of the proteins essential for replication initiation. We found that human ORC preferentially bound to RNA and ssDNA with G-quadruplex-formable sequences (G4-motifs). We identified the G4 motif-binding domains in the ORC1 subunit and also the amino acid residues within the domains, important for the G4-motif binding. Furthermore, we found that the G4 motif-binding activity of ORC has some specificity. It was reported that most of human replication origins have G4-motifs. We thus speculate that G4 motif-binding of ORC is involved in establishment of replication origins.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 グアニン四重鎖 複製開始点 ORC

1. 研究開始当初の背景

真核生物である出芽酵母では、DNA複製が開始する DNA 領域、すなわち複製開始点に、それを規定するコンセンサス配列がある。そして、複製開始タンパク質複合体である origin recognition complex (ORC)は、そのコンセンサス配列を認識して DNA に結合する。ところが、ヒトなどの多細胞生物では、複製開始点にはコンセンサス配列はなく、また ORC の DNA 結合にも塩基配列特異性はない。このようなことから、ゲノムの特定の位置にある複製開始点に ORC がどのようなしくみでリクルートされてくるのかは明らかではない。

私らはこれまでに、ヒト ORC は DNA のみならず、GU-rich な RNA にも優先的に結合することを見いだした。また、米国の Lieberman らのグループは、Epstein-Barr ウイルスの DNA 複製開始に、ORC の RNA 結合の関与の可能性を示した。そこで私らは、非コード RNA が ORC の機能調節を介して複製開始点の形成・維持に関わるという仮説を立て、その検証を進めることとした。

2. 研究の目的

次の2点を目的として研究を進めることとした。

(1) ヒト ORC が結合する内在性 RNA 分子を単離し、その RNA の性状を明らかにする。

ORC に結合する分子種は多種にわたると予想される。各 RNA の塩基配列を決定後、対応するゲノム領域の同定、既知の複製開始点との位置関係の検討、RNA の共通構造の検討および RNA の発現プロファイルを明らかにする。

(2) ORC 結合性 RNA の作用機作を明らかにする。

これまでの私らの解析から、ORC が結合する合成 RNA ポリマーである poly(G)が直接 DNA と相互作用して、ORC との結合親和性の高い構造体ができることを見いだした(未発表)。そこで、この構造体の詳細を明らかにする。また、(1)で同定された内在性 RNA のうち、同様な RNA-DNA 構造体を形成するものを探し、その性状解析をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降法による ORC1-RNA 複合体の単離および cDNA クローニングの試み

Flag タグなどをつけた ORC1 サブユニットをヒト培養細胞で発現させ、免疫沈降法によって ORC を回収し、ORC とともに沈降してくる RNA の精製を試みた。

(2) SELEX 法による ORC 結合性 RNA の解析

ORC 複合体ではなく、ORC1 サブユニットがもつ G-rich RNA/ssDNA 結合ドメインをグルタチオン-S-トランスフェラーゼ

(GST) に融合したタンパク質を用い、40 塩基のランダムな配列を含む約 100 塩基の RNA に対し、SELEX を行った。計 6 回の結合サイクルを行い、1、3 および 6 サイクル後に回収された RNA の cDNA クローニングを行い、その一部のクローンについて塩基配列の解析を行った。

(3) ORC1 サブユニット以外の ORC サブユニットの GU-rich RNA 結合活性の検討

ORC1 以外の ORC サブユニットについて組換え体を調製し、RNA プローブを用いたゲルシフト法で解析をおこなった。

(4) ヒト ORC の G-rich DNA への結合の特異性の検討

研究課題申請時には予定していなかった解析である。後述する理由から、RNA だけでなく、dsDNA、ssDNA への結合特異性の検討をすることとした。その方法として、dsDNA をプローブに様々な配列の ssDNA をコンペティターとして加えたゲルシフト法を採用した。さらに、高い結合性を示した ssDNA については、それをプローブとしたゲルシフト法もおこなった。なお、プローブはビオチン標識したもの、あるいは未標識のプローブを用いた。未標識の場合は、SYBR Gold による染色によってバンドシフトを検出した。さらに、バンドシフトに目的のタンパク質が含まれていることを、ゲルシフト法での電気泳動に引き続き、ウエスタンブロット法に準じた解析で調べた。

(5) ORC1 の G-rich RNA/ssDNA 結合ドメインの同定とその解析

ORC1 の N 末端側領域について、さまざまな truncation 変異体を調製し、その G-rich RNA/ssDNA 結合活性を調べた。

4. 研究成果

ヒト ORC の G-rich な RNA や ssDNA に結合する活性の詳細を明らかにするために、主に組換えタンパク質を使った in vitro 解析をすすめた。その結果、次のような成果を得た。

(1) ヒト ORC の G4 モチーフをもつ RNA あるいは ssDNA への優先的な結合

本研究課題を遂行する中で、フランスの研究グループより、ヒトの複製開始点の多くに、G4 構造をとり得る G-rich な配列 (G4 モチーフ) が存在することが報告された。私は、この知見は、前述のヒト ORC の GU-rich な RNA への優先的な結合と関連があるものと考えた。そこで、G-rich 配列をもつ二本鎖 DNA (dsDNA)、ssDNA および RNA に対する ORC の結合について調べることにした。

6 つのサブユニット ORC1-6 からなる組換え体ヒト ORC を、バキュロウイルスを用いた昆虫細胞発現系で発現させ、ORC3 に付加

した Flag タグを利用したアフィニティークロマトグラフィーによって精製し、結合解析に用いた。dsDNA に対しては、すでに報告にある通り、ORC の塩基配列特異的な結合は見られなかった。G4 モチーフである (GGGTT) 繰り返し配列をもつ dsDNA の ORC への結合親和性は、AT-rich な dsDNA よりもやや低かった。

一方、ssDNA の間で比較すると、ORC は、G4 モチーフである (GGGTT) あるいは (GGGAA) の繰り返し配列をもつ ssDNA に対し、(AACCC) 繰り返し、A-rich あるいは T-rich の ssDNA に比べて高い親和性を示した。また、(GGGUU) 繰り返し配列をもつ RNA と (GGGTT) 繰り返し配列をもつ ssDNA とを比較すると、ORC は RNA の方に対してやや高い親和性を示した。

以上の結果より、ヒト ORC は、二本鎖 DNA では塩基配列特異性はないものの、ssDNA あるいは RNA に対しては G4 モチーフをもつものに対し優先的に結合することが示された。

(2) G4 モチーフ結合ドメインの同定

ORC を構成する 6 つのサブユニットのうち、ORC1 が G-rich ssDNA/RNA 結合活性を有することを見いだした。ORC1 の中の結合ドメインを同定するために、様々な truncation 変異体を作製し、その結合活性を調べた結果、ORC1 のアミノ末端側半分の領域に少なくとも 2 つの結合ドメインが存在することが分かった。そのうち、両ドメインとともに、G4 モチーフをもつ ssDNA や RNA に優先的に結合する活性を示した。以上の結果は、ORC1 のアミノ末端側半分の領域が、ORC の G-rich ssDNA/RNA 結合に寄与していることを示唆する。

同定した G-rich ssDNA/RNA 結合ドメインを用いて、RNA 結合の SELEX 法による解析を試みた。1 回目の結合サイクル後に集められた RNA の配列を調べた結果、G-rich な配列をもつものが多くみられた。ところが、結合サイクル数を重ねるごとに、G-rich 配列は顕著ではなくなる傾向がみられた。これは、SELEX 法の中の PCR のステップで、G-rich な配列が優先的に排除されたためではないかと推測している。

(3) ORC1 の G-rich ssDNA/RNA 結合ドメインの推定構造

同結合ドメインの一つである 411-513 領域の立体構造を、お茶の水女子大学の由良敬博士に推定して頂いた結果、同領域は哺乳類の DNA メチルトランスフェラーゼ 1 (DNMT1) の SAM 結合ドメインの構造と類似することが推定された。なお、DNMT1 が RNA に結合する活性をもち、その結合は DNMT1 の DNA への結合を調節することが報告されている。ORC1 の DNA 結合ドメインが C 末端側にあることを考え合わせると、

ORC1 の RNA 結合が ORC1 の DNA 結合を調節する可能性が考えられる。

(4) ORC の G4 モチーフ結合の特異性

G4 構造にはパラレル型やアンチパラレル型などのさまざまな構造がある。そこで、その構造に関して、特異性があるかどうかを検討した。その結果、パラレル型 G4 を形成する c-myc プロモーター由来の G4 モチーフをもつ ssDNA には ORC は結合したが、テロメア配列由来の G4 モチーフをもつ ssDNA には顕著な結合は見られなかった。このように、ORC の G4 モチーフ結合には特異性のあることが分かった。

(5) 今後の展望

ORC の G4 モチーフ結合の生物学的な意義を明らかにすることが必要である。特に、同結合が、複製開始点の確立に関与するかどうかを明らかにすることが急がれる。その解析に必要な変異 ORC の作製はほぼ完了している。今後は、変異 ORC を細胞に発現させるなどの解析をおこなう予定である。

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 1 件)

Shoko Hoshina, Honami Teranishi, Noriko Kiyasu, Ayumi Tominaga, Haruka Kadoma, Ayaka Nakatsuka, Kei Yura, Shou Waga. Human origin recognition complex binds preferentially to G-quadruplex-preferable RNA and single-stranded DNA. J. Biol. Chem. 288, 30161-30171 (2013) 査読あり

[学会発表](計 12 件)

保科祥子、和賀 祥：ヒト ORC が認識するグアニン四重鎖モチーフの特異性に関する検討。第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25 日~11 月 27 日、パシフィコ横浜)

寺西帆奈美、太田黒恵美、由良 敬、和賀 祥：ヒト ORC1 の G-rich RNA/一本鎖 DNA 結合に関わる新規結合ドメインの解析。第 37 回日本分子生物学会年会 (2014 年 11 月 25 日~11 月 27 日、パシフィコ横浜)

Shou Waga : Further characterization of the binding of human ORC to G-quadruplex-formable RNA and single-stranded DNA. The 9th 3R Symposium (2014 年 11 月 17 日~11 月 21 日、静岡県御殿場市 御殿場高原ホテル)

保科祥子、寺西帆奈美、中塚彩花、由良敬、和賀 祥：ヒト ORC のグアニン四重鎖形成可能な RNA および一本鎖 DNA への特異的な結合とその複製開始点形成への関与の可能性。第 36 回分子生物学会年会 (2013

年 12 月 3 日～12 月 6 日、神戸ポートアイランド)

寺西帆奈美、保科祥子、由良 敬、和賀 祥: ヒト ORC1 の新規 RNA 結合ドメインの同定とその性状解析。第 36 回分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3 日～12 月 6 日、神戸ポートアイランド)

保科祥子、和賀 祥: ヒト ORC の G-rich 一本鎖 DNA への結合における塩基配列要求性。第 36 回分子生物学会年会 (2013 年 12 月 3 日～12 月 6 日、神戸ポートアイランド)

保科祥子、寺西帆奈美、中塚彩花、由良 敬、和賀 祥: ヒト ORC のグアニン四重鎖形成可能な RNA および一本鎖 DNA への特異的な結合とその複製開始点形成への関与の可能性。第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ (2013 年 11 月 20 日～11 月 22 日、仙台市秋保)

寺西帆奈美、保科祥子、由良 敬、和賀 祥: ヒト ORC1 の新規 RNA 結合ドメインの同定とその性状解析。第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ (2013 年 11 月 20 日～11 月 22 日、仙台市秋保)

保科祥子、和賀 祥: ヒト ORC の G-rich 一本鎖 DNA への結合における塩基配列要求性。第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ (2013 年 11 月 20 日～11 月 22 日、仙台市秋保)

Shoko Hoshina, Kei Yura, Honami Teranishi, Noriko Kiyasu, Ayumi Tominaga, Haruka Kadoma, Ayaka Nakatsuka, Tomoko Kunichika, Chikashi Obuse, Shou Waga: Preferential binding of human origin recognition complex to G-quadruplex-formable RNA and single-stranded DNA. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (2013 年 9 月 9 日～9 月 13 日、Cold Spring Harbor, NY, USA)

保科祥子、由良 敬、寺西帆奈美、門間 遥、中塚彩花、和賀 祥: ヒト ORC の G-rich RNA 結合活性とその複製開始点形成への関与の可能性。第 35 回日本分子生物学会年会 (2012 年 12 月 11 日～12 月 14 日、福岡市福岡国際会議場)

Shoko Hoshina, Kei Yura, Honami Teranishi, Haruka Kadoma, Ayaka Nakatsuka, Shou Waga: G-rich RNA binding activity of human ORC possibly implicated in replication origin (2012 年 11 月 25 日～11 月 28 日、兵庫県淡路夢舞台)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和賀 祥 (WAGA, Shou)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号: 60222402