

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570205

研究課題名(和文)新規バイパス変異体を用いたHsk1キナーゼの染色体動態制御における機能解析

研究課題名(英文)Analysis of Hsk1 function in genome dynamics regulation by using new Hsk1-bypass mutants

研究代表者

松本 清治 (MATSUMOTO, Seiji)

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・主任研究員

研究者番号：40190532

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)：Hsk1はDNA複製開始に重要な蛋白質リン酸化酵素で細胞の生存に必須である。我々はMrc1やRif1遺伝子が欠失すれば、Hsk1の機能無しで細胞が生存することを見出し、Mrc1とRif1の働きを解析した。Mrc1の98アミノ酸のHBS領域を欠失した変異では、チェックポイント機能は正常だが、hsk1変異が生存できた。Mrc1はHBSよりC末領域とよりN末側領域が分子内結合しDNA複製開始に阻害型となり、N末側のリン酸化あるいはHBS欠失変異では分子内結合が壊れ、許容型になると示唆された。また、Rif1のゲノム結合部位に特異的なDNA配列がありこの配列に依存してRif1が結合し働く事が分かった。

研究成果の概要(英文)：mrc1 and rif1 can bypass the requirement of Hsk1 kinase. mrc1-3A, specifically defective in checkpoint, and mrc1 HBS (782-879), proficient in checkpoint, can independently rescue hsk1ts, albeit less efficiently, and combination of mrc1-3A and mrc1 HBS rescues hsk1ts almost as efficiently as mrc1, confirming that mrc1 can bypass Hsk1 in both checkpoint-dependent and -independent manners. Initiation of DNA replication is enhanced at early origins in HBS. C-terminus (781-1019) of Mrc1 containing HBS can interact with the N-terminus and inhibits the mrc1 HBS-mediated bypass of hsk1ts. Intramolecular interaction between C-terminus and N-terminus renders Mrc1 in an inhibitory conformation, and phosphorylation through HBS causes dissociation of the N-terminal segment from the C-terminus, transforming Mrc1 into a permissive conformation that can rescue hsk1ts. We found a consensus sequence among Rif1-binding regions which is essential for Rif1 to regulate initiation.

研究分野：分子生物学・細胞生物学、生物科学・分子生物学

キーワード：DNA複製 複製タイミング CDC7 hsk1 mrc1 rif1

### 1. 研究開始当初の背景

真核細胞の DNA 複製は染色体上多くの部位 (ori) から開始する。又、S 期内で複製開始される時期はゲノムの領域によって異なり、ゲノムは S 期初期、中期、後期などに複製されるドメインに区分される。一方で、複製開始に必要な pre-replicative complex (pre-RC) は M 期から G1 初期までにゲノム全域に形成されている。分裂酵母では約千個の pre-RC が形成されるが、その中の 3 割から 6 割が S 期初期の複製開始点として観察される。多くの pre-RC の中から、初期に活性化される複製開始部位、中期に活性化される部位などが選択されるその制御は、エピゲノムや染色体の核内配置など多くの因子の支配下にあり、環境変動や発生過程などで柔軟に変化するがその制御機序の詳細は不明であった。Cdc7 キナーゼは酵母からヒトまでよく保存されており、pre-RC の構成因子である Mini-chromosome maintenance (MCM) 複合体が Cdc7 によりリン酸化されることが複製開始に必要なステップであること、HP1 欠損株で S 期後期に複製する染色体部位に Cdc7 を局在させるとその部位が S 期初期に複製されるようになることなどから複製開始の部位とタイミングを決める重要な因子の一つであると予想されたがその作用機序は大部分が不明であった。

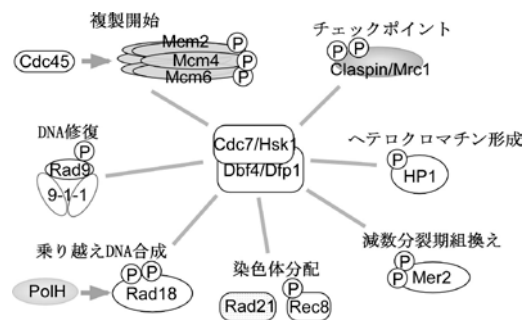
Cdc7 は増殖に必須であるが、出芽酵母では MCM5 或は MCM4 の特殊な変異によりその機能がバイパスされることが報告されていた。他の生物種ではそのようなバイパスはそれまで知られていなかったが、我々は分裂酵母 hsk1 (Cdc7 orthologue) 変異をバイパスする変異や増殖条件を発見した (Matsumoto, S. et al, *J. Cell Biol.* 195:387-401 (2011); Hayano, M., Kanoh, Y., Matsumoto, S. et al, *Genes Dev.* 26:137-150 (2012))。これらはいずれも MCM の変異ではなく、出酵母の場合とは異なる機構によるバイパスであることが示唆された。代表者はそれまで、hsk1 の変異体を用い hsk1 機能を解析を行い、hsk1 機能欠損を相補する (バイパスする) 変異及び条件を同定した。それらバイパス変異の中で、特に Mrc1 (高等動物 Claspin の機能的 orthologue) と Rif1 (出芽酵母のテロメア結合因子 Rif1 の orthologue) の変異は複製開始部位を選択する制御機構に関連した興味深い表現型を示した。まず、Mrc1 は Hsk1 非依存的に初期複製起点に特異的に結合するが、mrc1 欠損株では Mrc1 が本来結合している初期複製起点の複製開始効率が高まった。一方、Rif1 はテロメアの他にも染色体腕部にも散在して結合しており、rif1 欠損株では、野生株では非効率な複製起点からの複製効率の上昇が観察された。hsk1 機能欠損の相補能は rif1 と mrc1 を共に欠損した場合、それぞれ単独の欠損よりも高い相補能を示すこ

とからも Rif1 と Mrc1 はそれぞれ異なる機構で複製開始部位の選択を制御することが示唆された。また、バイパス変異は Cdc7/hsk1 の増殖に必須な機能をバイパスするので、Cdc7/hsk1 の DNA 複製およびそれ以外の染色体ダイナミクス制御における役割を解析するのに理想的な材料となると考えられた。

### 2. 研究の目的

(1) Cdc7 キナーゼは複製起点における pre-RC の構成因子 MCM をリン酸化することにより効率の良い複製開始と複製開始部位選択に必要である。又、複製以外の多くの染色体ダイナミクスの制御にも関与する。代表者は分裂酵母の Cdc7 キナーゼ (Hsk1) の機能欠損をバイパスするいくつかの変異と条件を同定し、その中で Mrc1 と Rif1 の変異株では染色体複製開始部位の選択パターンが大きく変わることを見出した。そこで第一に Mrc1 と Rif1 が働く分子機序を明らかにすることにより、複製開始部位選択の制御メカニズムの解明を目的とした。

(2) 更に、Hsk1 機能の完全欠損下で DNA 複製以外の種々の染色体ダイナミクス (減数分裂期組換え、乗り越え DNA 合成、修復、クロマチン制御等) を再検討し、Cdc7 のこれらの過程における役割の解明を第二の目的とした。



Cdc7 キナーゼは DNA 複製以外にも多くの染色体ダイナミクスに関与する。図ではそれまで示唆された標的因子を示す。矢印はリン酸化の結果、結合が促進される因子を示す。

### 3. 研究の方法

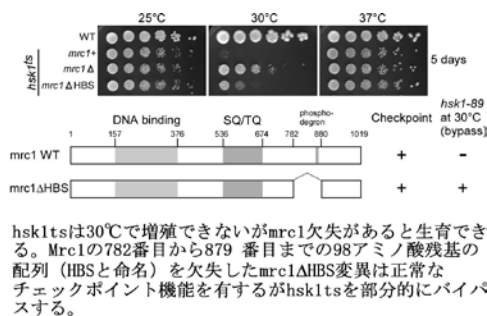
(1) Hsk1 機能をバイパスする mrc1 あるいは rif1 点突然変異を単離・同定し、複製起点の複製活性への影響と変異部位へ結合するタンパク質を探索する。特に Mrc1 の 782 番目から 879 番目までの 98 アミノ酸残基の領域 (HBS と命名) を欠失した mrc1 ΔHBS 変異は正常なチェックポイント機能を有するが hsk1 変異を部分的にバイパスできることに注目して、この HBS 領域に点突然変異を導入して、hsk1 変異をバイパスできる点突然変異を単離する。

(2) Rif1 の強制発現が強い増殖阻害を起こすことを利用し、この増殖阻害を回避する染色体変異と多コピー抑圧遺伝子を単離する。

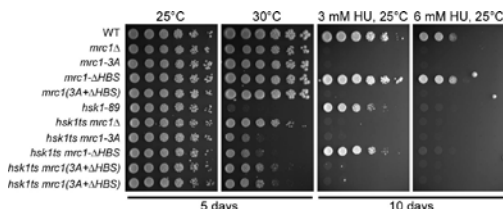
(3) これらの探索により同定されたタンパク質や遺伝子の変異が複製起点の複製開始活性に及ぼす影響や、Mrc1 および Rif1 との物理的相互作用や核内/染色体上での存在様式を調べ、それらが複製起点選択や複製開始の制御において働いているメカニズムの解明を進める。

#### 4. 研究成果

(1) Mrc1 (高等動物 Claspin の機能的ホモログ) は複製チェックポイントの mediator として働くことが知られている。Mrc1 の 782-879aa 配列 (HBS) を欠失した Mrc1 ΔHBS 株は、正常なチェックポイント機能を示し、かつ hsk1ts 変異を部分的に相補した。



3A 変異は Mrc1 の checkpoint 機能に特異的に欠陥のある変異で、ΔHBS 変異とこの 3A 変異とを同時に持つ Mrc1 変異の hsk1 変異相補能はそれぞれの単独変異より強く、HBS が checkpoint 非依存的機能を持つことが確認された。

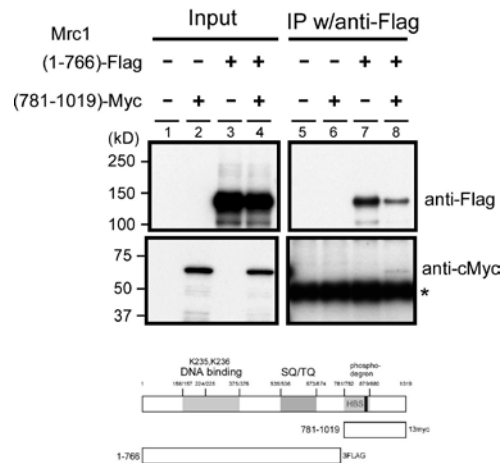


mrc1-3A変異はmrc1のチェックポイント機能特異的に欠陥がある。ΔHBS変異はチェックポイント機能は正常なのでヒドロキシウレア (HU) 存在下生育できる。3A変異とΔHBS変異を二重にもつmrc1変異はそれぞれ単独より高効率でhsk1tsをバイパスできる。

(2) HBS 配列内に種々の点突然変異を導入したところ、KAF という比較的保存された配列を AAA に変えた KAF 変異が hsk1ts を若干バイパスした。この KAF 変異と ΔHBS 変異では弱い初期複製起点 *ars1* の複製効率が上がっていることが二次元電気泳動で確かめられた。一方、3A 変異では野生型同様 *ars1* からの複製は殆ど観察されず、Mrc1 は HBS 配列を介して初期複製起点の複製開始を負に調節していることが示唆された。

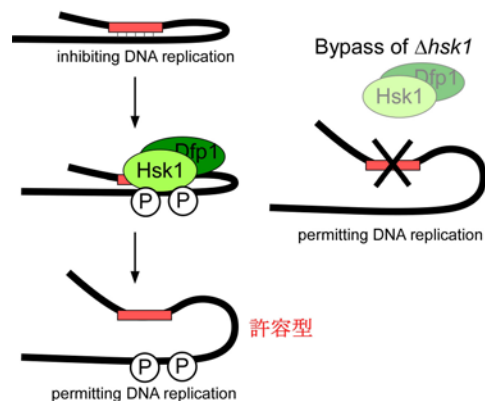
(3) mrc1 ΔHBS では hsk1ts が弱くバイパスされるが、この細胞に HBS を含む Mrc1 の C 末配列を発現させると、hsk1ts のバイパス能が阻害される。また、HBS を含む C 末配列は Mrc1

の HBS より前の部分と結合できることが分かった。



すなわち、Mrc1 が HBS を含む C 末領域と HBS より前方の N 末側領域とで分子内結合を形成し複製開始に対して阻害活性を持つ構造となっているが、Hsk1 による N 末側のリン酸化あるいは ΔHBS 変異によりこの分子内結合が壊されると複製開始にたいして許容型になることが示唆された。また、質量分析法により、HBS 配列に依存して Mrc1 と結合する因子も同定した。

#### I. mrc1<sup>+</sup> 阻害型 II. mrc1ΔHBS 許容型



(4) Rif1 機能に関しては、ChIP-seq 法により分裂酵母ゲノム上の結合配列を同定し、Rif1 が G4 構造を取りうる配列に結合すること、その結合が複製タイミングの制御に必要なことを明らかにした。また、Rif1 欠失による Hsk1 機能のバイパスには Rif1 に結合する蛋白質脱リン酸化酵素 PP1 が大きく関わるのが他のグループより報告されたが、一方で、Rif1 増産による増殖阻害には PP1 との結合は必要ないことが分かり、Rif1 の機能には PP1 を介した働くと、PP1 を介さないものとが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 Seiji Matsumoto, Hisao Masai、Regulation of chromosome dynamics by Hsk1/Cdc7 kinase、Biochem. Soc. Trans、査読有り、41:1712-1719 (2013)  
doi: 10.1042/BST20130217
- ② 早野 元詞、加納 豊、松本 清治、正井 久雄、HOT PRESS「テロメア結合因子 Rif1 は、染色体複製タイミングを決定する」、細胞工芸学、査読無し、31(4):460-462 (2012)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 松本 清治、新本 美智枝、早野 元詞、加納 豊、上田 恭祐、覺正 直子、深津 理乃、正井 久雄、分裂酵母 Mrc1 によるチェックポイント依存のおよび非依存的複製開始制御機構、第 37 回日本分子生物学会年会 ワークショップ「細胞周期を通じた染色体恒常性制御機構のニューフロンティア」、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ② Seiji Matsumoto, Michie Shimmoto, Motoshi Hayano, Kyosuke Ueda, Yutaka Kanoh, Hisao Masai、Checkpoint-independent regulation of initiation at replication origins in fission yeast by Mrc1、Cold Spring Harbor Laboratory Meeting: Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance、2013 年 9 月 9-13 日、New York (米国)
- ③ Seiji Matsumoto, Kyosuke Ueda, Motoshi Hayano, Yutaka Kanoh, Michie Shimmoto, Hisao Masai、Regulation of DNA replication in fission yeast by Hsk1 kinase through physical and functional interactions with Mrc1、7th International Fission Yeast Meeting、2013 年 6 月 24-29 日、London (英国)
- ④ Seiji Matsumoto, Kyosuke Ueda, Motoshi Hayano, Yutaka Kanoh, Michie Shimmoto, Hisao Masai、Regulation of DNA replication in fission yeast by Hsk1 kinase through physical and functional interactions with Mrc1、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、マリンメッセ福岡 (福岡県・福岡市)

[その他]

ホームページ等

東京都医学総合研究所/ゲノム動態プロジェクト

<http://www.igakuken.or.jp/genome/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松本 清治 (MATSUMOTO, Seiji)

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・主任研究員

研究者番号：40190532