

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25251005

研究課題名(和文) 真核生物染色体DNAの複製開始機構

研究課題名(英文) Molecular mechanism of the initiation in eukaryotic chromosomal DNA replication

研究代表者

荒木 弘之 (ARAKI, Hiroyuki)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授

研究者番号：20151160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの複製を開始するには、まず2本鎖DNAを1本鎖にほどかなければならない。真核生物では、このほどく役割をするヘリカーゼの中心となるMcm2-7が複製を開始する領域にロードされ、次にCdc45とGINSが加わることでより活性なヘリカーゼとなる。この活性化の過程に必須な働きをするSld3-Sld7複合体が、2分子のSld3が2分子のSld7により結合されたものであることを示した。そしてこの構造が、複製開始に重要な働きを示唆した。また、DNAポリメラーゼもこの過程で働くことを直接示した。さらに、クロマチン構造や細胞周期チェックポイントとDNA複製の関係を解析する礎を築いた。

研究成果の概要(英文)：Double-stranded DNA must be unwound to single-stranded DNA to initiate DNA replication. Mcm2-7, the core of the helicase that unwinds DNA, is loaded to replication origins first and then Cdc45 and GINS associate with the loaded Mcm2-7 to form an active helicase. We reveal that the Sld3-Sld7 complex, which is essential for this activation, comprises two Sld3 molecules connected by two Sld7 molecules and suggest that this structure is important for the initiation of DNA replication. Moreover, we confirm that DNA polymerase epsilon also works for this activation step. We further devise the way to analyze the relationship between chromatin, cell cycle checkpoints and DNA replication.

研究分野：染色体動態

キーワード：DNA複製 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を担う染色体 DNA を正確に複製し、娘細胞に伝えることは生物の最も基本となる現象である。真核生物では、染色体複製の過程は細胞周期と密接に関連し、主として DNA 複製開始過程が細胞周期により厳密に制御されている。

染色体 DNA の複製は、染色体上の複数の領域(複製開始領域)から開始する。この複製開始領域には6つのサブユニットからなる Orc が結合する。そして、この領域に2本鎖 DNA を1本鎖にほどく DNA ヘリカーゼのコアであるドーナツ状の Mcm2-7 ヘテロヘキサマーが、サイクリン依存性キナーゼ (CDK) 活性の低い時期 (M 期後期から G1 期) に2本鎖 DNA を取り囲むようにロードされ、pre-RC (pre-Replicative Complex) を形成する。G1 期後期に2つのキナーゼ、CDK と Ddb1-dependent kinase (DDK: 活性サブユニットの名称から Cdc7 キナーゼとも呼ばれる)、が活性化すると DNA 鎖を合成する DNA ポリメラーゼを含む複製タンパク質群が複製開始領域へ集合する。我々は出芽酵母を用いて、この過程で重要な役割を担う因子である Dpb11, Sld2, Sld3, Sld7, GINS を遺伝学的手法により同定・分離した。また、これら複製因子の機能についての研究も進め、CDK 活性によって起こる複製因子の集合が CDK によりリン酸化された Sld2, Sld3 の Dpb11 への結合により制御されることを示した。さらに、CDK によるリン酸化に依存した Dpb11 と Sld2 の結合が、DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  (Pol  $\epsilon$ )、GINS を含む pre-Loading Complex (pre-LC) と名付けた複合体の形成を促し、複製開始に繋がることを明らかにした。しかし、実際の複製開始の機構の詳細は明らかではない。

一方、我々の研究での出発点の一つとなった Dpb11 は、複製のみでなく細胞周期チェックポイントにも働いている。しかし、Dpb11 は複製開始時のように Sld2, Sld3 と結合するのではなく、チェックポイントや修復に係わる因子、Rad9 (哺乳動物の BRCA1 或は p53BP に相当)、9-1-1 複合体、Slx4 と結合する。従って細胞内では、複製タンパク質とチェックポイント・修復タンパク質の間に Dpb11 を介して競合関係が生じ、これらタンパク質のバランスが複製反応の進行に重要であると考えられる。

さらに真核生物では、DNA はヒストンを含む種々のタンパク質と結合し、クロマチン構造をとっている。このクロマチン構造がどのように複製開始に寄与するかは重要な問題であるが、これまで分子レベルでの理解が十分とは言えない。

## 2. 研究の目的

上述したように、複製開始機構の詳細が十分には分かっておらず、本研究においてはその解明を目指した。さらに、複製に関連するチェックポイント因子や、クロマチン構造をし

た DNA の複製解析を行い、広範な複製機構の理解を目指した。実際の研究項目は、以下のようである。

(1) DNA 複製開始の分子機構を、in vitro 系と生細胞を用いて明らかにする。そのため以下の因子を中心に解析する。

①複製開始過程における Pol  $\epsilon$  の役割を明らかにする。Pol  $\epsilon$  は pre-LC の構成因子であり、その中で重要な役割をしている可能性があるにも関わらず、複製開始での機能は十分に分かっていない。

②活性なヘリカーゼである Cdc45-Mcm2-7-GINS (CMG) 複合体が形成すると、複製開始領域では両方向の DNA 合成が開始する。この過程に関与すると考えている Sld3-Sld7 複合体の構造と機能を明らかにする。

(2) 複製開始におけるクロマチンの役割を in vitro 系を用いて明らかにする。

in vitro 複製系を用いて開始段階でのクロマチンの機能を調べる。

(3) 複製過程が、チェックポイントタンパク質や修復タンパク質とどのように相互作用しながら進んで行くかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の in vitro 及び細胞を用いた解析を行った。

複製機構の解析には、主として in vitro の複製系を用いた。この系は報告されている細胞素抽出液によるものを改良し、抗体による特定タンパク質の除去を行って解析に用いた。また、種々のタンパク質を精製し、個々の反応を再現、解析した。その際、種々の変異タンパク質の導入も行った。さらに、精製ヒストンからシャペロンとクロマチンリモデリング因子によりクロマチンを再構成し、複製反応に用いた。

in vitro での解析を補完するため、変異タンパク質により野生型を置き換えた酵母株を作成し、その表現型を調べた。この表現型と in vitro の反応型の解析を合わせることにより、それぞれの因子の働きを考察した。

## 4. 研究成果

(1) in vitro DNA 複製系の確立と DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  の役割

出芽酵母細胞抽出液を用いた in vitro DNA 複製系は、i) G1 期細胞抽出液による pre-Replicative complex (pre-RC) の形成、ii) DDK キナーゼによる pre-RC のリン酸化、iii) S 期細胞抽出液による DNA 合成の開始の3つのステップからなる。この系では鋳型 DNA をビーズに固定し、i) から ii) への移行時に G1 期抽出液を除く必要があり、複製効率も低い。そこで i) のステップを精製タンパク質で行い、非固定型の鋳型 DNA を用いて、複製の効率化を行った。一方 iii) のステップから DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  (Pol  $\epsilon$ ) を除き、精製した Pol  $\epsilon$  を加えると、複製の減少と回復がおこる。そこに、DNA ポリメラーゼ活性ドメインを欠いた

Pol ε を加えると、複製は部分的に回復する。これは、Pol ε がポリメラーゼ活性以外の機能として複製開始に関与することを直接示すものである。同様の解析を他の複製タンパク質、例えば Sld3-Sld7, Mcm10 タンパク質でも行い、精製標品が *in vitro* 複製の活性を持つことが分かった。Sld3-Sld7 の機能解析は(2)に記述する。

### (2) Sld3-Sld7 の構造と機能

pre-RC 形成の際、一对の Mcm2-7 が N-末を向き合う形でロードされる。そして、ヘリカーゼは両方向に 2 本鎖 DNA を 1 本鎖にほどき、両方向性の DNA 複製を保証する。しかし、Mcm2-7 単独ではヘリカーゼ活性を示さず、Cdc45 と GINS という 2 つの複製因子が加わり CMG 複合体ができて、初めて活性を示す。この両者の Mcm2-7 への結合に必須な Sld3 の構造と機能について解析を行った。

Sld3 は中央部で Cdc45, Mcm2-7 と、N 末側で Sld7 と、C 末側で Dpb11 と結合する。Dpb11 との結合は、Sld3 の CDK によるリン酸化に依存し、この結合は GINS を Mcm2-7 にリクルートする。Sld3 の中央部の Cdc45-binding domain (CBD)、Sld7 の N 末半分と Sld3 の N 末領域の結合した複合体、Sld7 の C 末 2 量体の構造を決定した。その結果、CDB は菱形状の構造をしていること、2 分子の Sld3 が 2 分子の Sld7 を介して逆平行に結合していることが示唆された。また、生化学的解析から、1 分子の Sld3 が 1 分子の Cdc45 と結合することが分かり、Sld3-Sld7 は 2 分子の Cdc45 と結合することになる。図では 2 分子の Sld3 が球状の Sld7 2 分子により結合しているように描いている。

また、異なる部位に変異を持つ 2 種の Sld3 では、単独変異を持つ細胞は致死になるが、両者を同時に持つと増殖できる。そこで変異を持つ Sld3 と Sld7 の複合体を精製し、*in vitro* 複製系を用いて解析した。Sld3 の CBD の変異や C 末リン酸化部位の変異は単独では働かないが、CBD に変異を持つ Sld3 1 分子と C 末に変異を持つ Sld3 1 分子を Sld7 で結合した複合体を精製すると野生型 Sld3-Sld7 と同様に DNA 複製に働くことを見出した。このことは、Sld3-Sld7 複体内の 2 分子の Sld3 が協調して働いていることを示唆する。

一方、Sld7 が無くても Sld3 は単独でも働くことができる。しかし、Sld7 を欠く細胞の増殖は遅く、複製阻害剤に感受性になる。そこで、2 量体を形成する GST と Sld3 に融合すると、Sld3 単独に比較して増殖が回復し、複製阻害剤に抵抗性になることが分かった。また、前述の異なる Sld3 変異の相補は Sld7 を欠くと起こらない。これらは全て、Sld3-Sld7 の 2 分子の Sld3 が協調して働くことを支持している。

以上の結果から、図に示すようなモデルを考えている。即ち、この構造により Cdc45 と GINS が一对の Mcm2-7 に効率良く結合し且つ両方向性の複製開始に寄与している可能性が

ある。さらに、一对の Mcm2-7 を同時に活性化する機構としても働いているのではないかと考えている。

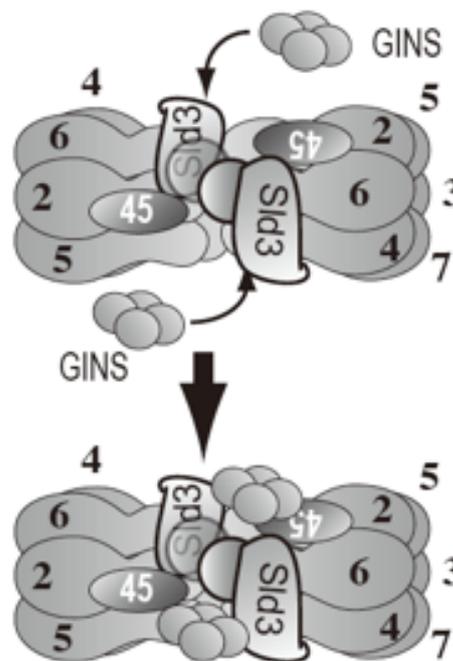


図 Mcm2-7 上での Sld3 の配置モデル  
45: Cdc45、2~7 の数字は Mcm2-7 を示す。

### (3) クロマチン構造をとる鋳型

精製ヒストンよりヌクレオソームを再構成したところ、pre-RC の形成及び *in vitro* 複製系において、裸の DNA 同様に鋳型となることが分かった。さらに、この鋳型では Orc の結合が裸の DNA に比して安定化されている。さらに、Mcm2-7 のローディングした産物を AFM により観察したところ、大きな構造体が観察された。

### (4) 複製開始過程とチェックポイントタンパク質

複製開始に関与する Dpb11 は、4 つの BRCT ドメインを持つ。複製開始時には、N 末側と C 末側のそれぞれ一对の BRCT が、CDK キナーゼによりリン酸化された Sld3 と Sld2 に結合する。同様にチェックポイントに関与する Rad9 も CDK にリン酸化されると N 末側に結合する。各タンパク質を精製しそれぞれの結合を調べたところ、Sld2 が Dpb11 の C 末側に結合すると Rad9 が N 末側に結合しにくくなり、結果として Sld3 が N 末に結合し易くなることが分かった。G1 期後期には Sld2 の量が増えるとともに CDK によりリン酸化されるので、Rad9 よりも Sld3 が結合するようになることを意味する。また Rad9 により Dpb11 の N 末側 BRCT が占有されると、Sld3 の結合は起こりにくくなるため、複製の開始が抑えられることが推測される。

## 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 9 件)

- ① Tanaka, S. and Araki, H. (2016) Role of CDK in replication initiation. In “The initiation of DNA replication in eukaryotes (ed. D. Kaplan)”, pp. 263-278, Springer International Publishing. (査読あり) DOI 10.1007/978-3-319-24696-3\_13
- ② Okimoto, H., Tanaka, S., Araki, H., Ohashi, E. and Tsurimoto, T. (2016) Conserved interaction of Ctf18-RFC with DNA polymerase  $\epsilon$  is critical for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells* 21, 482-491. (査読あり) DOI: 10.1111/gtc.12356
- ③ Itou, H., Shirakihara, Y. and Araki, H. (2015) The quaternary structure of the eukaryotic DNA replication proteins Sld7 and Sld3. *Acta Cryst. D71*, 1649-1656. (査読あり) doi:10.1107/S1399004715010457
- ④ Itou, H., Muramatsu, S., Shirakihara, Y. and Araki, H. (2014) Crystal Structure of the Homology Domain of the Eukaryotic DNA Replication Proteins Sld3/Treslin. *Structure* 22(9), 1341-1347. (査読あり) doi:10.1016/j.str.2014.07.001
- ⑤ Hizume, K., Yagura, M. and Araki, H. (2013) Concerted interaction between origin recognition complex (ORC), nucleosomes, and replication origin DNA ensures stable ORC-origin binding. *Genes Cells* 18, 764-779. (査読あり) 10.1111/gtc.12073

[学会発表] (計 2 5 件)

- ① 荒木弘之、出芽酵母の複製開始複合体の形成機構、第 3 8 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 3 日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ② 日詰光治、真核生物複製ヘリカーゼ CMG 複合体のクロマチン基質に対する活性、第 3 8 回日本分子生物学会年会、2015 年 12 月 1 日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ③ 荒木弘之、Bidirectional initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast、2015 Cold Spring Harbor Meeting on “Eukaryotic DNA replication & genome maintenance”、2015 年 9 月 2 日、Cold Spring Harbor (米国)
- ④ 日詰光治、Nucleosome on helicase activity of CMG complex、2015 Cold

Spring Harbor Meeting on “Eukaryotic DNA replication & genome maintenance”、2015 年 9 月 2 日、Cold Spring Harbor (米国)

- ⑤ 荒木弘之、出芽酵母染色体 DNA の複製開始機構、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 27 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)
- ⑥ 荒木弘之、Molecular mechanism that ensures bidirectional initiation of chromosomal DNA replication in budding yeast、The 9th 3R Symposium (International Symposium on DNA Replication, Recombination and Repair)、2014 年 11 月 21 日、御殿場高原ホテル (静岡県・御殿場)
- ⑦ 荒木弘之、The cell cycle regulated initiation mechanism of chromosomal DNA replication in budding yeast、国際生化学・分子生物学会、2014 年 10 月 23 日、台北 (台湾)
- ⑧ 日詰光治、クロマチンファイバー上での DNA 複製のライセンスング：原子間力顕微鏡による可視化解析、第 3 6 回日本分子生物学会年会、2013 年 1 2 月 3 日、神戸国際会議場 (兵庫県・神戸市)
- ⑨ 荒木弘之、Formation of active replicative helicase in budding yeast、2013 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on EUKARYOTIC DNA REPLICATION & GENOME MAINTENANCE、2013 年 9 月 9 日、Cold Spring Harbor (米国)
- ⑩ 荒木弘之、Establishment of replication forks at origins、Genome instability, evolution and human diseases、2013 年 6 月 1 5 日、Saint Petersburg (ロシア)

[その他]

ホームページ

<https://www.nig.ac.jp/labs/MicGen/index.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

荒木 弘之 (ARAKI, Hiroyuki)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授  
研究者番号：2 0 1 5 1 1 6 0

(2) 研究分担者

日詰 光治 (HIZUME, Kohji)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教  
研究者番号：1 0 3 7 8 8 4 6