

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32659

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K06955

研究課題名(和文)複製フォーク崩壊過程におけるレプリソーム動態制御

研究課題名(英文)The Regulation of Replisome Dynamics during Replication Fork Collapse

研究代表者

橋本 吉民 (Hashimoto, Yoshitami)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：50616761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：複製装置であるレプリソームは、複製終了時や停止した複製フォークが崩壊する際にクロマチンから解離する。本研究では、フォーク崩壊におけるレプリソーム解離の分子機構を明らかにするため、無細胞複製系による再構成実験を行い、間期から分裂期へ細胞周期を進行させることにより停止フォークからレプリソーム解離が起きることを見出した。この解離機構は、CDK活性、ユビキチン化制御、Mre11ヌクレアーゼ活性が必要であり、複製終了時の仕組みとは異なる新規の経路であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The DNA Replication machinery, or replisome is displaced from chromatin at the end of DNA replication and during the collapse of stalled replication forks. In this study, I aimed to elucidate the molecular mechanism of the replisome displacement during fork collapse by utilizing cell-free DNA replication system, and found that the replisome displacement was efficiently induced at stalled forks by enforcing cell cycle transit from interphase into mitotic phase. I also demonstrated that this mitotic displacement pathway is a novel one that requires CDK activity, ubiquitylation and Mre11 nuclease activity.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：DNA複製フォーク レプリソーム 無細胞複製系 CDK ユビキチン化 Mre11ヌクレアーゼ 細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

(1) DNA 損傷部位との衝突などにより複製進行が阻害されると、停止した複製フォークや複製装置であるレプリソームはしばらくの間は複製再開可能な状態で安定に維持されるが、長時間にわたる阻害により、複製フォークからレプリソームが脱離し、複製再開不可能な状態へと変化することが知られている。この過程はフォーク崩壊と呼ばれているが、Rad51 や BRCA2 などの組換え因子を欠損した細胞ではフォーク崩壊により細胞生存率が顕著に低下することから、崩壊したフォークは主に相同組換えによる修復を受けると考えられている。このように本研究の開始当初は、フォーク崩壊後どのように修復されるかという点についてはある程度明らかになっていたのに対して、フォークがどのように崩壊するのか、またその時レプリソームはどのように脱離するのかという崩壊過程そのものについては、ユビキチン化制御や構造特異的ヌクレアーゼの関与など断片的な報告があるに過ぎなかった。

例外的に、この数年の間に複製フォークが DNA 鎖間架橋 (ICL) 部位と衝突した場合については、レプリソームの制御からフォーク構造の変化、ICL 部位の修復反応に至るまで分子機構が非常に詳細に明らかにされてきた。このときレプリソームの解離には BRCA1 が必要であることが示されている。しかし、この一連の反応は 1 箇所の ICL 部位に両方向からフォークが衝突して始めて起きることも分かっており、停止したフォークが反対側からのフォークと収束することなく崩壊に至るような状況 (これが通常のフォーク崩壊である) においても ICL 部位への衝突と同様な機構が働いているのか不明である。

(2) 複製終了時のレプリソームの脱離制御については、研究開始当初から現在までの間で著しい進展があった。複製終了時は ICL 部位への衝突と同様に両方向からフォークが収束する。その後、レプリソーム因子である Mcm7 が Cullin 型ユビキチンリガーゼによってポリユビキチン化され、それを p97 複合体が認識してフォークからレプリソームを脱離するという仕組みが存在することが明らかとなった。BRCA1 の必要性を除くと、ほぼ同じ仕組みが ICL 部位と衝突したフォークからのレプリソーム脱離にも働いていることも明らかとなった。

(3) 本研究開始以前までは、代表者は組換えによる複製再開機構の解明をテーマに研究を行っていた。当初は、フォーク崩壊についての定義が研究者によって異なっており、再開不可能な状態となって始めてフォーク崩壊と呼ぶ研究者がいる一方、複製再開に Rad51 などの修復系因子を必要とする状態を崩壊と呼び、崩壊したフォークが再生可能

であると表現する研究者もいた。このような流れの中で、停止したフォークが崩壊に至るまでの過程において、幾つかの中間体のようなものが存在し、どこかの段階で再開可能から不可能な状態へと決定的な変化が起きるのではないかと考えるようになり、崩壊過程におけるレプリソーム構成因子の変化を追求することにした。

## 2. 研究の目的

(1) アフリカツメガエル卵無細胞系を用いて、停止したフォークが崩壊し、レプリソームがクロマチンから解離するという状況を試験管内で再構成する。

(2) 上記の系を用いてフォーク崩壊過程におけるレプリソーム解離を制御する分子機構の詳細を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究では、主な研究材料としてアフリカツメガエル卵抽出液による無細胞系を用いた。間期と分裂期の 2 種類の細胞周期特異的卵抽出液が調整可能であり、間期抽出液では、真核生物の染色体 DNA 複製、複製ストレス応答、DNA 損傷応答などを再現できる一方、分裂期抽出液では核膜崩壊や染色体凝縮、スピンドル形成などを再現できるという唯一無比とも言える特徴を備えている。間期と分裂期を組み合わせることで細胞周期進行における変化なども解析可能である。複製反応の鋳型としては、精子核 DNA を用いるが、この系では転写が起きないため、転写によるクロマチンへの間接的な影響を排除出来る上に、複製開始から複製進行、終了までが全ての核でほぼ同じタイミングで起きるため、単純にクロマチン画分を経時的に単離するだけでもレプリソーム形成から脱落までを生化学的に追跡できるという利点がある。

(2) 特定のタンパク因子の発現を抑制した条件で機能解析する際に、培養細胞では siRNA によるノックダウンやゲノム編集によるノックアウトを行うのが一般的であるが、卵無細胞系ではそれらの手法の代わりに特異的抗体を用いて免疫除去するのが標準的手法となっている。DNA 複製や細胞周期関連には生存必須因子が多いため解析困難となる場合が多いが、無細胞系では細胞生存率低下の影響を受けること無く解析できるという利点がある。

## 4. 研究成果

(1) ATR 欠損細胞においてヒドロキシ尿素によるヌクレオチド枯渇条件下で長時間停止したフォークが崩壊に至る場合には、CDK-Aurora A-PLK1 の分裂期キナーゼ経路の活性化が必要であることが報告されている。このとき実際に分裂期まで進行しているかどうかは調べられておらず、フォーク崩壊が

S 期内に起きるのか、G2 期あるいは M 期へ入ってから起きるのかも明らかではない。停止したフォークが崩壊するためには、分裂期キナーゼ経路がある程度の活性化レベル(少なくとも S 期後期から G2 期のレベル)に達している必要があるのではないかと考え、間期卵抽出液でのフォーク停止誘導後に恒常的活性化型 PLK1 を添加するという条件を試したが、レプリソームの脱離は起きなかった。一方、分裂期卵抽出液を添加すると非常に効率的にレプリソーム脱離が起きることが分かったため、この条件(以後、「分裂期誘導によるレプリソーム解離」と呼ぶ)における分子機構の解析に集中的に取り組むことにした。

(2) 本研究では、DNA ポリメラーゼ阻害剤である Aphidicolin を用いてフォーク停止を誘導したが、このとき ATR-Chk1 経路が活性化される。この経路は本来分裂期への進行を抑制する働きがあるが、分裂期卵抽出液を添加した場合には、ATR-Chk1 経路は速やかに解除されて、分裂期マーカーであるヒストン H3 の Ser10 のリン酸化が亢進し、染色体凝縮因子コンデンシンの染色体結合が起きていた。これらの分裂期イベントと平行して、レプリソームの解離が起きることが分かった。この解離に分裂期キナーゼが必要かどうか阻害剤を用いて調べた結果、CDK 活性は絶対的に必要であり、PLK1 活性は部分的に関与していることが明らかになった。

(3) 分裂期誘導によるレプリソーム解離の分子機構の詳細を明らかにするため、ユビキチン化、SUMO 化、プロテアソーム活性の必要性を検討した結果、ユビキチン化が関与することが分かった。ユビキチン化を阻害した条件では、CDK は活性化しており、コンデンシンの結合なども起きるため、CDK によるリン酸化やコンデンシンによる染色体凝縮が直接的にレプリソームを解離している訳ではないと考えられる。また、このユビキチン化には Lys48 および Lys63 の両方を介したポリユビキチン鎖が関与することも分かったが、その標的因子や責任となるユビキチンリガーゼは現在でも不明であり、今後の研究で同定する必要がある。

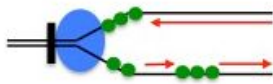
(4) 分裂期誘導によるレプリソーム解離が、複製終了時における解離と共通の仕組みを利用しているのかがどうか明らかにするため、複製終了時に必要とされる各種因子に対する阻害剤を用いて検討した。P97 複合体や Cullin ユビキチンリガーゼ、Topoisomerase II などが複製終了時のレプリソーム解離には必要であるが、これらに対する阻害剤はいずれも全く、あるいはわずかしき分裂期誘導による解離を阻害しなかった。このことから、分裂期誘導による解離は、複製終了時とは異なる機構であることが示唆される。複製終了

時には Mcm7 のポリユビキチン化が目印となるが、Aphidicolin で停止したフォークではそのようなユビキチン化は起きないことから、別の仕組みが存在することは強く支持される。

(5) 最近、低レベルの複製ストレスを与えることにより、未複製ゲノム領域を残した状態のまま分裂期へ進行し、そのような場所が分裂期において SLX4-MUS81 ヌクレアーゼ、組換え因子 Rad52、POLD3 依存的に修復合成を受けることが報告された。これらの修復系による働きの結果、レプリソーム解離が起きるかどうかを調べるため、MUS81 に対する抗体を作製して免疫除去を行った。MUS81 非存在下でも分裂期誘導によるレプリソーム解離に影響がなかったことから、本実験系で修復合成が起きるとしても、レプリソーム解離の後であると考えられる。レプリソームをフォークから除去するという過程が先にあることにより、修復合成に必要な因子群のリクルートに必要な場が提供されるのかもしれない。

(6) Mre11-Rad50-NBS1(MRN) は、ヌクレアーゼ活性および DNA tethering (繋ぎ止め) 活性をもつ複合体であり、特に 2 本鎖 DNA 切断(DSB)部位の組換え修復における初期の末端プロセッシングで重要な役割を果たす。MRN 複合体は、停止したフォークの安定化や複製再開など DNA 複製においても働くことが知られているが、その活性は厳密に制御される必要があることが分かってきた。Rad51 や BRCA2 は本来組換え修復因子であるが、これらを欠損すると停止したフォークにおいて MRN 複合体による異常な新生鎖のプロセッシングが起きることから、Rad51 や BRCA2 は組換え機能以外にフォーク安定化因子としても働くと考えられている。本研究の分裂期誘導によるレプリソーム解離が、MRN 複合体によるフォークのプロセッシングによるものかどうか阻害剤を用いて調べた結果、Mre11 ヌクレアーゼ活性が必要であることが明らかとなった。また、実際に新生鎖 DNA が分裂期への進行により分解されることを確認した。間期抽出液でフォークを停止させた状態では、組換え因子 Rad51 がクロマチン結合しているが、分裂期誘導により速やかにクロマチンから解離することが分かった。これらの結果から、停止したフォークは間期では Rad51 により Mre11 によるプロセッシングから保護されているが、分裂期への進行に伴い Rad51 が解離すると Mre11 による新生鎖 DNA の分解が起こり、これによってレプリソーム解離へ導かれるというモデル(次頁図参照)を提唱したい。

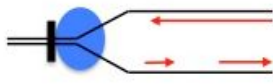
停止複製フォーク



CDK活性上昇



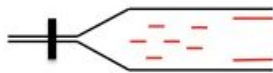
Rad51解離



ユビキチン化  
Mre11ヌクレアーゼ  
による新生鎖分解



レプリソーム解離



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計3件)

橋本吉民、田中弘文、停止した複製フォークからのレプリソーム解離機構の解析、第38回日本分子生物学会年会、2015年12月、神戸

橋本吉民、田中弘文、Replisome disassembly during replication fork stalling、第39回日本分子生物学会年会、2016年12月、横浜

橋本吉民、田中弘文、分裂期勇壮によるレプリソーム解離機構の invitro 解析、2017年12月、神戸

[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://www.ls.toyaku.ac.jp/~cellreg/xi\\_bao\\_zhi\\_yu\\_yi\\_ke\\_xue\\_yan\\_jiu\\_shi/HOME.html](http://www.ls.toyaku.ac.jp/~cellreg/xi_bao_zhi_yu_yi_ke_xue_yan_jiu_shi/HOME.html)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 吉民 (HASHIMOTO, Yoshitami)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：50616761

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし