

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04330

研究課題名(和文)複製開始点の選択と活性化機構の解明

研究課題名(英文)Regulatory mechanisms of replication origin activation.

研究代表者

升方 久夫 (Masukata, Hisao)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：00199689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母複製開始必須因子Sld3のN末端119アミノ酸領域は互いに相互作用し、Sld3タンパク質を安定化すると共に、2分子のSld3を複製開始点に供給する役割を担うことを示した。また、分裂酵母生細胞での複製開始点をlacO/LacI-GFPにより可視化した解析により、染色体腕部のTaz1依存の後期開始点は核膜に局在し、さらにG1/S期特異的にテロメアに隣接することを発見した。後期複製開始点は近傍にあるテロメア配列にTaz1が結合し、テロメアにあるshelterin複合体との相互作用を介してテロメアに近接し、テロメアにあるRif1-PP1(脱リン酸化酵素)により制御されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that the N-terminal 119 amino acid region of fission yeast Sld3 interacts each other and stabilizes Sld3 protein in the cells. Thus, it contributes to formation of bidirectional replication forks in replication initiation. On the other hand, the Taz1-dependent late replication origins that are visualized by lacO/LacI-GFP are localized at the nuclear periphery throughout the interphase, and associate with the telomeres specifically in the G1/S phase. The shelterin components play roles in tethering of the internal replication origins to the telomeres. The telomeric association of the replication origins causes suppression of early initiation by Rif1 and PP1 that are enriched at the telomeres.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：テロメア 複製開始 細胞周期 分裂酵母 shelterin Taz1 Rif1 PP1

1. 研究開始当初の背景

真核生物では、クロマチン構造に被われた長大なDNAをS期中に完全に複製するため、数百から数万箇所の複製開始点が必要である。それぞれの複製開始点は、S期の特定の時期にただ1回だけ複製を開始するしくみを持つ。複製開始に必須なすべての因子は同定され、出芽酵母では精製タンパク質を用いての試験管内反応系が確立され複製開始メカニズムの解明が進められようとしている。しかしながら、生物種毎に多様化した反応に関する包括的な理解は得られていない。またクロマチン上で起こる個々の複製開始点の制御と核内での時空間的制御についての理解は進んでいない。そこで、染色体上のすべての複製開始点が同定され、クロマチン構造の制御機構の研究が進んでいる分裂酵母細胞を用いて、複製開始点の活性化反応機構を解明し、試験管内では解明できない染色体上の時空間的制御を明らかにしようと考えた。

2. 研究の目的

遺伝物質であるDNAを正確に複製し継承するしくみを理解することは重要である。真核生物では、長大な染色体DNAをS期中にただ一度だけ完全に複製するため、染色体上の多数の部位から、時間的・空間的に制御された様式で複製反応を開始する。複製開始は、50種類を超える因子が一過的に複製開始点に集合し、複製ヘリカーゼによるDNA鎖開裂を経て複製装置を形成するダイナミックな反応である。複製開始に必要な必須因子はすべて同定されたが、複製開始点毎の活性化制御メカニズムの解明と、生物種毎の相違を包括する普遍的パラダイムの構築が求められている。本研究では、染色体機能解析に適する分裂酵母を用い、複製ヘリカーゼ活性化反応に関わる因子の具体的機能を明らかにするとともに、核内の時空間的複製プログラム決定機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 複製開始必須因子 Sld3/Treslin は、S期開始段階で最初に複製開始点に結合する重要な因子であるが生物種毎のアミノ酸保存度が低く機能不明な点が多い。出芽酵母ではN末端領域で Sld7 と相互作用し、安定なヘテロ四量体を形成することが示されている。分裂酵母では機能不明であるN末端領域の欠失変異を作成し、細胞増殖と複製開始反応を解析する。また、酵母 Two-hybrid 法を用いて、相互作用する因子を解析し、複製開始反応における役割を明らかにする。

(2) 複製ヘリカーゼの活性中心となる Mcm2-7 は複製開始過程でダイナミックな構造変化を経て Cdc45-GINS と結合してヘリカーゼ活性を持つ CMG 複合体を形成する。細胞内に存在する Mcm2-7 六量体は G1 期に複製開始点上でダブル六量体となり、活性化段階で再びシングル六量体となり、2つの複製フォ

ークを形成する。このしくみを詳細に明らかにするために Mcm4 に PA-tag を付加し、さらに c-myc タグを付加した2つ目の Mcm4-myc を native promoter から発現する株を作成し、Mcm2-7 ダブル六量体を検出できる細胞を構築する。様々の複製開始因子をオーキシデグロン法で消失させた条件で Mcm2-7 ダブル六量体を定量して、シングル六量体に変化するのに必要な因子を同定する。

(3) 複製タイミング制御における複製開始点の核内空間配置の寄与を明らかにするため、分裂酵母の初期複製開始点、テロメア因子 Taz1 依存後期開始点、Taz1 非依存複製開始点のそれぞれ近傍に *lacO* リピート配列を挿入し、LacI-GFP の結合を、核膜構成因子 Ish1-mCherry とテロメア結合タンパク質 Taz1-mCherry を指標に用いて生細胞で明らかにする。核内配置と複製制御におけるテロメア結合因子である Taz1、Rif1、Rap1、Poz1 などの役割を明らかにする。

(4) テロメア結合因子 Rif1 は、分裂酵母ですべての後期開始点のタイミング制御に必要であり、他の生物種でも複製制御やDNA傷害修復に関与する重要な因子である。しかしながら、1400アミノ酸の巨大タンパク質であり、大部分が HEAT リピートモチーフで構成されるため、N末端領域の脱リン酸化酵素 PP1 結合部位以外には機能が明らかになっていない。そこで酵母 Two-hybrid 法と分裂酵母での変異株作成を用いて、Taz1 結合部位を同定し、さらにC末端の高度保存領域の機能を明らかにする。

4. 研究成果

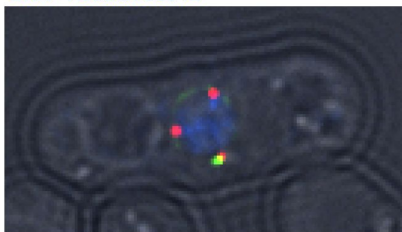
(1) 分裂酵母種間で保存されている Sld3 のN末端の119アミノ酸を欠失させると (*sld3-N119*)、細胞増殖が減弱し複製開始頻度が約1/3に減少した。酵母 Two-hybrid 法での解析により Sld3 のN末端119アミノ酸領域同士が強く相互作用し(田中誠司博士、現高知工大教授との共同研究)、全長 Sld3 同士の相互作用にもN末端が必要であることがわかった。また、細胞内では Sld3-N119 タンパク質は全長 Sld3 に比べタンパク質量が減少した。いっぽう、出芽酵母 Sld7 に相当する分裂酵母遺伝子候補を探索し破壊株を作成したが有意な表現型を示さなかった。これらの結果から、Sld3 のN末端領域は互いに相互作用し Sld3 タンパク質を安定化すると共に、2分子の Sld3 を複製開始点に供給する役割を担うことが考えられた(林みず紀; 日本分子生物学会第39回年会発表2016年)。

(2) Mcm4-PA と Mcm4-Myc を等量発現する細胞を *cdc10-129* 変異で G1 期に停止させ、Cdc18 と Cdt1 の発現依存的に Mcm-myc 免疫沈降産物中に Mcm4-PA の共沈降を確認し、Mcm2-7 ダブル六量体検出系を構築した(申麗紅; 日本分子生物学会第39回年会発表2016年)。

(3) 分裂酵母生細胞での *lacO*/LacI-GFP シ

グナルを Ish1-mCherry (核膜)あるいは Taz1-mCherry (テロメア)との局在解析により、Taz1 依存的後期開始点が細胞周期間期に核膜に局在し、さらに G1/S 期特異的にテロメアに隣接することを発見した。核膜タンパク質 Bqt3/4 は Taz1 依存複製開始点の核膜局

後期複製開始点 AT2088 : LacO- LacI-GFP
テロメア: Taz1-mCherry
DNA : Hoechst 33342



後期複製開始点 AT2088 のテロメア隣接

在に必要であるが、Taz1 依存複製開始点のテロメア近接には必要ではなく、また後期タイミング制御にも不要であった。よって、核膜局在は、複製タイミング制御機構に関与しないことが結論された。いっぽう、テロメアタンパク質 shelterin 複合体は、テロメアの複製タイミング制御には関与しないが、染色体内部の Taz1 依存後期開始点のテロメア隣接とタイミング制御に必要であり、遠く離れた染色体内部に結合した Taz1 との相互作用を介し、テロメアに近接させる役割を担うと考えられた (城戸; 日本分子生物学会第 40 回年会発表 2017 年, Ogawa et al., EMBO Journal, revision 中)。

(4) 酵母 Two-hybrid 法を用いて、Taz1 との相互作用に必要な Rif1 領域を探索し、Rif1 中央部の HEAT リピート 588-1005 アミノ酸領域が Taz1 との相互作用に十分であることを示した。さらに、588-620 アミノ酸領域と 985-1005 アミノ酸領域が重要であり、Leu977、Pro979 のアミノ酸が重要であることを見いだした。また、Rif1-C 末領域 46 アミノ酸が Rif1 同士の相互作用に必要十分であることを見いだした。さらに Ile1395 がこの相互作用に必要であり、C 末相互作用は Rif1 のテロメアへの局在と染色体内部の Taz1 依存複製開始点の制御に必要であることを見いだした。

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7件)

Terui, R., Nagao, K., Kawasoe, Y., Taki, K., Higashi, T. L., Tanaka, S., Nakagawa, T., Obusae, C., Masukata, H., Takahashi, T. S., Nucleosomes around a mismatched base pair are excluded via an Msh2-dependent reaction with the aid of SNF2-family ATPase Smrcad1. *Genes. Dev.* 査読有, accepted (2018).

Zafar, F., Okita, A. K., Onaka, A. T., Su, J., Katahira, Y., Nakayama, J., Takahashi, T. S., Masukata, H., Nakagawa, T., Regulation of mitotic recombination between DNA repeats in centromeres. *Nucle. Acids Res.* 査読有, 44(22), 11222-11235, doi.org/10.1093/nar/gkx763 (2017)

Onaka, A. T., Toyofuku, N., Inoue, T., Okita, A. K., Sagawa, M., Su, J., Shitanda, T., Matsuyama, R., Zafar, F., Takahashi, T. S., Masukata, H., Nakagawa, T., Rad51 and Rad54 promote noncrossover recombination between centromere repeats on the same chromatid to prevent isochromosome formation. *Nucle. Acids Res.* 査読有, 44(22), 10744-10757, doi:10.1093/nar/gkw874 (2016).

Kawasoe, Y., Tsurimoto, T., Nakagawa, T., Masukata, H., Takahashi, T. S. MutS maintains the mismatch repair capability by inhibiting PCNA unloading. *eLIFE.* 査読有, 12;5. pii: e15155. doi:10.7554/eLife.15155(2016).

Tashiro, S., Handa, T., Matsuda, A., Ban, T., Takigawa, T., Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, Y., Masukata, H. and Kanoh, J. Shugoshin forms a specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. *Nature Communications* 7 (3), Article number: 10393. doi: 10.1038/ncomms10393 (2016).

Ruan, K., Yamamoto, T. G., Asakawa, H., Chikashige, Y., Kimura, H., Masukata, H., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. Histone H4 acetylation required for chromatin decompaction during DNA replication. *Scientific Reports.* 査読有, 5, 12720. doi: 10.1038/srep12720 (2015).

Ruan, K., Yamamoto, T. G., Asakawa, H., Chikashige, Y., Masukata, H., Haraguchi, T., Hiraoka, Y. Meiotic nuclear movements in fission yeast are regulated by the transcription factor Mei4 downstream of a Cds1-dependent replication checkpoint pathway. *Genes Cells.* 査読有, 20 (3), 160-172. doi: 10.1111/gtc.12207, (2015).

[学会発表](計27件)

城戸沙友里、小川志帆、高橋達郎、中川拓郎、升方久夫、分裂酵母シェルタリンによる複製開始タイミング制御機構、第40回日本分子生物学会年会、(神戸、2017年)。

小川志帆、半田哲也、中村優太、高橋達郎、中川拓郎、小川英知、浅川東彦、平岡泰、升方久夫、テロメア結合タンパク質およびシェルタリン構成因子による DNA 複製の時空間的制御機構の解明、第40回日本分子生物学会年会、(神戸、2017年)。

小川志帆、城戸沙友里、小川英知、淺川東彦、高橋達郎、中川拓郎、平岡泰、升方久夫、Spatial and temporal control of chromosome DNA replication by telomere binding proteins. Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (Cold Spring Harbor, NY USA, 2017年)(国際).

升方久夫、Spatial and temporal control of chromosomal DNA replication by telomere sequence and telomere binding proteins in the fission yeast nucleus、The 9th International Fission Yeast Meeting. (Banff, Canada, 2017年)(国際).

申麗紅、菅家舞、高橋達郎、中川拓郎、升方久夫、複合体構造変化を介した分裂酵母 Mcm2-7 ヘリカーゼ活性化機構、(横浜、2016年).

林みず紀、升方久夫、分裂酵母 Sid3-N 末端領域の効率的複製開始に果たす役割、第39回日本分子生物学会年会、(横浜、2016年11月).

小川志帆、半田哲也、中村優太、高橋達郎、中川拓郎、小川英知、淺川東彦、平岡泰、升方久夫、Temporal and spatial regulation of replication by telomere binding proteins in fission yeast. 第10回3R Symposium (松江、2016年)(国際).

升方久夫、Control of DNA replication timing and location by telomere-binding proteins in fission yeast. 第10回3R Symposium (松江、2016年)(招待、国際).

升方久夫、Control of subnuclear localization and replication timing by telomere binding proteins in fission yeast、FASEB Science Research Conferences, Yeast Chromosome Structure, Replication and Segregation、(Snowmass, Colorado, USA、2016年)(招待、国際).

升方久夫、Control of replication timing and subnuclear localization by telomere binding proteins in fission yeast、DNA Metabolism, Genomic Stability and Disease、Cold Spring Harbor Asia、(Suzhou, China、2016年)(招待、国際).

沖慶太郎、豊福直子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎、セントロメア領域での染色体再編に必要な新規因子の同定、第38回日本分子生物学会年会ポスター発表(神戸、2015年).

中村優太、半田哲也、高橋達郎、中川拓郎、升方久夫、Rif1 と PP1 による分裂酵母染色体の複製タイミング制御機構、第38回日本分子生物学会年会ポスター発表(神戸、2015年).

織田里美、照井利輝、鐘巻将人、中川拓郎、升方久夫、高橋達郎、MutS / 依存的にDNAに呼び込まれる新規ミスマッチ修復関連因子、第38回日本分子生物学会年会ポスター発表(神戸、2015年).

粥川太貴、東寅彦、中川拓郎、升方久夫、高橋達郎、コヒーシオンが複製後のDSB修復に機能する機構の新規試験管内系による解析、

第38回日本分子生物学会年会ポスター発表(神戸、2015年).

豊福直子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎、分裂酵母セントロメアで起こる染色体再編の分子メカニズム、第38回日本分子生物学会年会ポスター発表(神戸、2015年).

蘇傑、沖田暁子、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎、Fission yeast CENP-T nucleosomes promote the isochromosome formation in centromere.、第38回日本分子生物学会年会ポスター発表(神戸、2015年).

照井利輝、滝佳菜恵、長尾恒治、田中誠司、久保田弓子、中川拓郎、滝澤温彦、小布施力史、升方久夫、高橋達郎、MutS はクロマチンリモデリング因子やヒストンシャペロンを呼び込むことでミスマッチ塩基周辺のヌクレオソーム排除を促進する、第38回日本分子生物学会年会口頭発表(神戸、2015年).

小川志帆、中村優太、高橋達郎、中川拓郎、小川英知、淺川東彦、平岡泰、升方久夫、テロメア結合タンパク質によるDNA複製の時空間的制御機構、第38回日本分子生物学会年会ワークショップ(神戸、2015年).

高橋達郎、河添好孝、釣本敏樹、中川拓郎、升方久夫、DNA複製とミスマッチ修復の機能的相関、第38回日本分子生物学会年会ワークショップ(神戸、2015年).

高橋達郎、河添好孝、釣本敏樹、中川拓郎、升方久夫、The mechanism of the MutS-dependent strand memory reaction in Xenopus egg extract. Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (Cold Spring Harbor, NY USA、2015年)(国際).

②小川志帆、中村優太、半田哲也、小川英知、淺川東彦、高橋達郎、中川拓郎、平岡泰、升方久夫、Replication timing control by telomere-adjacent nuclear localization." Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance (Cold Spring Harbor, NY USA、2015年)(招待、国際).

②蘇傑、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎、CENP-T histone-fold protein suppresses translocation in fission yeast. 第8回 International Fission Yeast Meeting (神戸、2015年)(国際).

③大仲惇司、片平泰弘、沖田暁子、浅井麗伊、高橋達郎、升方久夫、中川拓郎、Rad51-independent recombination between centromere repeats causes gross chromosomal rearrangement in fission yeast. 第8回 International Fission Yeast Meeting (神戸、2015年)(国際).

④小川志帆、中村優太、高橋達郎、中川拓郎、小川英知、淺川東彦、平岡泰、升方久夫、Temporal and spatial regulation of replication in fission yeast. 第8回 International Fission Yeast Meeting (神戸、2015年)(国際).

⑤中川拓郎、沖田暁子、高橋達郎、升方久夫、H3K9 methylation in heterochromatin

suppresses gross chromosomal rearrangement in centromere in mitotic cells.第8回 International Fission Yeast Meeting (神戸、2015年)(国際).

②⑥田代三喜、半田哲也、松田厚志、坂琢人、瀧川徹、宮里和実、石井浩二郎、久郷和人、太田邦広、平岡泰、升方久夫、加納純子、Shugoshin forms a specialized chromatin domein at subtelomeres, repressing transcription and replication.、第8回 International Fission Yeast Meeting (神戸、2015年)(国際).

②⑦升方久夫、中村優太、小川英知、淺川東彦、高橋達郎、中川拓郎、平岡泰、小川志帆、Replication timing control by telomere-adjacent nuclear localization in fission yeast.第8回 International Fission Yeast Meeting(神戸、2015年)招待、国際).

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/dbs01/re-paper-temp.php?id=14>

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/masukata/thesis/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

升方 久夫 (MASUKATA, Hisao)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号: 00199689

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: