

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18482

研究課題名(和文)「非通常型DNA複製」におけるMCMヘリカーゼファミリーの役割分担の解析

研究課題名(英文) Division of labor between MCM2-7 and MCM8-9 helicases in non-canonical DNA replication

研究代表者

夏目 豊彰 (Natsume, Toyoaki)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・助教

研究者番号：10435513

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：通常のDNA複製とは様式が異なる「非通常型DNA複製」が知られているが、その分子メカニズムはよく分かっていない。私は、通常のDNA複製を司るMCM2-7複製ヘリカーゼを迅速に壊してDNA複製を阻害し、それに対する細胞の応答を観察した。このためにまず、目的タンパク質をごく短時間に分解できるオーキシソングロン法を、ヒト細胞で容易に利用できるシステムを確立した。次に、このシステムをMCM2タンパク質の分解に用いた結果、MCM2-7複製ヘリカーゼを破壊した後でも、そのパラログであるMCM8-9ヘリカーゼに依存してDNA合成が再開されるという、新しいタイプの非通常型DNA複製を見出した。

研究成果の概要(英文)：DNA replication takes place once per cell cycle during S phase. It is known that some types of DNA replication are deviated from the normal one (hereinafter called 'non-canonical DNA replication'), but their molecular basis is not well understood. By inhibiting the MCM2-7 replicative helicase, which works in the normal replication, I studied how cells respond when the normal replication is perturbed. First, I established an experimental system, in which target proteins are rapidly degraded within human cells using the auxin-inducible degron (AID) technology. By applying this system to the MCM2-7 helicase, I found a new type of the non-canonical DNA replication, in which the MCM8-9 helicase, a paralog of the MCM2-7 helicase, restarts DNA replication after MCM2-7 is destructed.

研究分野：分子遺伝学、細胞遺伝学

キーワード：非通常型DNA複製 MCM2-7複製ヘリカーゼ MCM8-9ヘリカーゼ オーキシソングロン法 DNA複製バックアップシステム 複製フォーク 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

S期のDNA複製は、染色体上の複製開始点から細胞周期に1回だけ開始する。DNA複製は二つのステップに大きく分けられる。まずG1期に、複製開始点上にMCMファミリーのMCM2-7複製ヘリカーゼが不活性化状態で呼び込まれる(ライセンシング)。次に、S期になると、複数の因子の働きによりMCM2-7は活性化され、開始点上のDNA二本鎖を開裂しDNA合成を開始する(複製フォークの形成)。S期には、さらなるMCM2-7の染色体への呼び込みは厳密に抑制されるので、同じ場所が2回以上複製されることはない。この仕組みの破綻は、ゲノム不安定性を引き起こし、遺伝病や発がんの原因となり得る。

一方、このような通常のDNA複製の様式から逸脱した「非通常型DNA複製」が存在し、発生分化や細胞のがん化と関連がある事が知られている。例として、1) DNA損傷により複製フォークの進行が一旦停止した際に生じる複製の再スタート、2) 細胞分裂を伴わず全体または一部の染色体領域が複製を繰り返すエンドレプリケーションや遺伝子増幅、3) 細胞周期あたり1回の複製を保証するライセンシング機構の異常によって生じる再複製、4) テロメラーゼ非依存的なテロメアの伸長等が挙げられる。しかし、これらの非通常型複製の分子機構はよく理解されていなかった。

非通常型DNA複製を行う際には、通常G1期にしか生じないMCM2-7の染色体上への呼び込みを、どのように細胞周期に関係なく行うかという問題がある。興味深い事に、一部の生物種を除き、真核生物にはMCM2-7のパラログである、MCM8-9ヘリカーゼが存在し、所属研究室を含む複数のグループの解析から、DNA修復反応に関与することが示唆されていた。しかし、MCM2-7に比べ、MCM8-9の機能に関しては不明な点が多く、さらなる解析が必要であった。

2. 研究の目的

MCM2-7とMCM8-9ヘリカーゼは、それぞれ異なる制御を受けると考えられる。本研究では、非通常型DNA複製においてMCM2-7およびMCM8-9ヘリカーゼがどのように役割分担しているかを解析した。また、本研究で得られる知見は、通常のDNA複製の理解にも還元できると考えた。

3. 研究の方法

非通常型DNA複製を観察するために、通常のDNA複製を行うMCM2-7ヘリカーゼを不活性化し、それに対する細胞の応答を観察した。MCM2-7の不活性化には、所属研究室で以前に開発された、目的タンパク質をごく短時間で分解できるオーキシソグロン(AID)法を用

いた。AID法を用いて複製フォーク上のMCM2タンパク質を分解し、DNA複製を阻害した際の細胞の応答を、蛍光顕微鏡観察、フローサイトメーターやDNAファイバー法によるDNA合成の定量、CRISPR/Casによる遺伝子機能阻害等を組み合わせ、統合的に解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト培養細胞におけるAID法のシステムの確立

内在性のMCM2を分解するために、それまで主に酵母で利用されてきたAID法を、ヒト細胞でも簡便に利用できるシステムを確立した(図1、Natsume et al. Cell Reports, 2016)。この方法に必要なプラスミドや細胞株はバイオリソースセンターから入手可能にしてあり、現在世界中の研究者に使われている。

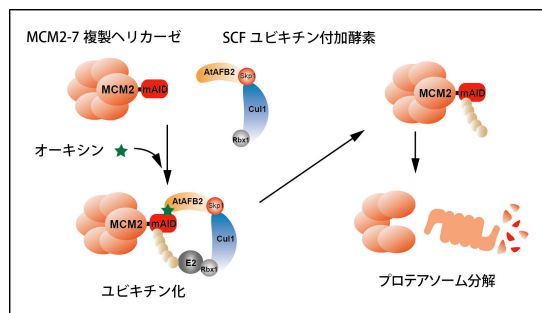


図1 オーキシソグロン(AID)法

(2) 新しいタイプの非通常型DNA複製であるMCM8-9依存性複製バックアップシステムの発見

次に、この方法を用いてMCM2-7複製ヘリカーゼを破壊した結果、MCM2-7非存在下でも、そのパラログであるMCM8-9ヘリカーゼに依存した形でDNA合成が再開されるという、新しいタイプの非通常型DNA複製を見いだした(図2、Natsume et al. Genes & Dev, 2017)。

AID法で複製フォーク上のMCM2を分解すると、フォークが崩壊してDNA二本鎖切断が生じ、組換え因子のRAD51が呼び込まれた。MCM8-9は、このRAD51に依存した形で壊れたフォークに呼び込まれ、MCM2-7非存在下におけるDNA合成を促進した。また近年報告された非通常型DNA複製の一つである、Mitotic DNA synthesis (MiDAS)にはMCM8-9は関与しておらず、別の経路であることを示した。

私達はこの経路が、紫外線や抗がん剤などによってMCM2-7複製ヘリカーゼの進行が阻害された際、DNA複製を再開させるための細胞のバックアップシステムであると考えている(図2)。MCM8-9ヘリカーゼは、正常細胞においては自然に生じる複製障害に対処して細胞死やがん化防衛一方、がん細胞においては、抗がん剤への抵抗性を高めている可能性が考えられる。MCM8-9ヘリカーゼの阻害剤

を開発すれば、既存の抗がん剤の作用をさらに高めることができるかもしれない。

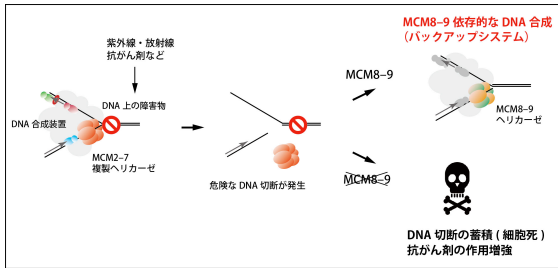


図2 DNA複製バックアップシステム

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5件)

1. Natsume T, Kanemaki M. Conditional Degrons for Controlling Protein Expression at the Protein Level. *Annu Rev Genet.* in press. 査読有

2. Natsume T, Nishimura K, Minocherhomji S, Bhowmick R, Hickson ID, Kanemaki MT. (2017) Acute inactivation of the replicative helicase in human cells triggers MCM8-9-dependent DNA synthesis. *Genes Dev.* 31(8):816-29. doi: 10.1101/gad.297663.117. 査読有

3. Takagi M, Natsume T, Kanemaki MT, Imamoto N. (2016) Perichromosomal protein Ki67 supports mitotic chromosome architecture. *Genes Cells.* 21(10):1113-24. doi: 10.1111/gtc.12420. 査読有

4. Natsume T, Kiyomitsu T, Saga Y, Kanemaki MT. Rapid Protein Depletion in Human Cells by Auxin-Inducible Degron Tagging with Short Homology Donors. (2016) *Cell Rep.* 15(1):210-8. doi: 10.1016/j.celrep.2016.03.001. 査読有

5. Hoa NN, Akagawa R, Yamasaki T, Hirota K, Sasa K, Natsume T, et al. (2015) Relative contribution of four nucleases, CtIP, Dna2, Exo1 and Mre11, to the initial step of DNA double-strand break repair by homologous recombination in both the chicken DT40 and human TK6 cell lines. *Genes Cells.* 20(12):1059-76. doi: 10.1111/gtc.12310. 査読有

[学会発表] (計8件)

1. 人為的複製フォーク破壊システムから見てきたヒト MCM8-9 依存的なフォークの再

生メカニズム、夏目豊彰

第34回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会、2017年1月11日、かずさアカデミアホール(千葉県木更津市)

2. ヒト細胞における人為的複製フォーク破壊システムから見てきた Mcm8-9 依存的な複製フォークの再生メカニズム、夏目豊彰
第39回日本分子生物学会年会、2016年11月30日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

3. Cell-cycle specific perturbation of human MCM2-7 and cohesin complexes by the use of the auxin-inducible degron (AID) technology、夏目豊彰
The 10th 3R Symposium、2016年11月13日、Hotel Ichibata(島根県松江市)

4. Rapid protein depletion in human cells by auxin-inducible degron (AID) tagging with short homology donors、夏目豊彰
第68回日本細胞生物学会大会、2016年6月15日、京都テルサ(京都府京都市)

5. 人為的複製フォーク破壊システムを用いたヒト細胞におけるフォーク再生機構の解析、夏目豊彰
第33回染色体ワークショップ・第14回核ダイナミクス研究会、2016年1月12日、松島一の坊(宮城県松島町)

6. Artificial destruction of active DNA replication forks reveals the HR-dependent fork recovery involving Mcm8-9、夏目豊彰
BMB2015、2015年12月1日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

7. 人為的複製フォーク破壊システムを用いたヒト細胞におけるフォーク再生機構の解析、夏目豊彰
第23回DNA複製・組換え・修復ワークショップ研究会、2015年10月19日、焼津グランドホテル(静岡県焼津市)

8. A PCR-based tagging method for generation of human conditional mutants by use of the auxin-inducible degron technology、夏目豊彰
Genome Engineering: The CRISPR/Cas Revolution、2015年9月24日、Cold Spring Harbor Laboratory (New York, USA)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 動物細胞ゲノム部位特異的外来DNA挿入方法
発明者: 鐘巻将人、夏目豊彰

権利者：大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構
種類：特許
番号：2015-162612
出願年月日：平成 27 年 8 月 20 日
国内外の別： 国内

〔その他〕
ホームページ等

研究所内 HP
<https://www.nig.ac.jp/nig/ja/research/organization-top/laboratories/kanemaki>

研究室 HP
<https://www.nig.ac.jp/labs/MolFunc/Jpn/>

リサーチハイライト
https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2017/05/research-highlights_ja/20170510.html

https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2016/03/research-highlights_ja/20160325.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏目豊彰 (NATSUME TOYOAKI)
国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・助教
研究者番号：10435513

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし