

平成 23 年 5 月 16 日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17080003
 研究課題名（和文）染色体複製開始における分子集合と機能制御の解明
 研究課題名（英文）Studies on molecular assembly of replication proteins and regulation of their functions in initiation of chromosome DNA replication

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

研究成果の概要（和文）：分裂酵母染色体上の複製開始点を網羅的に同定し、ヘテロクロマチン構造をとるセントロメアと性決定領域はS期初期に複製開始し、サブテロメアは後期に複製することを明らかにした。これらの分子メカニズムを追求し、前者では複製に抑制的と考えられていたヘテロクロマチン蛋白質 HP1 が複製開始に必要な DDK キナーゼと相互作用して複製開始を促進し、後者ではテロメア結合因子が複製制御に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We determined whole-genome localization of replication origins on fission yeast chromosomes and found that heterochromatin in centromere and mating type locus replicates in early S phase, whereas that in subtelomere replicates late. We discovered that the heterochromatin protein HP1, which was considered as a negative factor to DNA replication, stimulate replication in early S phase at centromere and mating type locus through the interaction with DDK that is an essential kinase for DNA replication. On the other hand, in subtelomeric regions telomere binding proteins play roles in regulation of DNA replication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005 年度	36,500,000	0	36,500,000
2006 年度	36,500,000	0	36,500,000
2007 年度	36,500,000	0	36,500,000
2008 年度	36,500,000	0	36,500,000
2009 年度	36,500,000	0	36,500,000
総計	182,500,000	0	182,500,000

研究分野：真核生物の染色体複製

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：細胞周期、染色体、クロマチン、セントロメア、テロメア、MCM ヘリカーゼ、DNA 複製、分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

(1) 真核生物の染色体 DNA は細胞周期の S 期にただ一度だけ全体が複製されるよう厳密に制御されている。このためのしくみとして、

複製開始反応は細胞周期の G1 期と S 期でそれぞれ特有のタンパク質複合体を複製開始点上に形成することが明らかになっている。特に S 期移行時にはサイクリン依存キナー

ゼ(S-CDK)と Dbp4 依存 Cdc7 キナーゼ (DDK) によるリン酸化に依存して多数の複製因子が複製開始点に集合し活性化される。しかしながら、具体的にどのような分子メカニズムによって複製開始点が活性化され、複製フォークへと移行するかは明らかにされていなかった。

(2) 真核生物の染色体はヌクレオソーム構造とヒストン修飾によって領域特異的な高次構造を形成し、ヒストン修飾に依存して異なる相互作用因子が結合し、クロマチンを形成する。このように異なる染色体領域では複製タイミングが異なることが古くから観察されてきた。しかしながら、哺乳動物などでは個別の複製開始点の同定が困難であることから、クロマチン構造や結合因子による複製開始反応の制御メカニズムについては明らかにすることができていなかった。

(3) 複製反応は染色体上のほぼ全ての領域で複製フォークによるダイナミックな構造変化をもたらしつつ、染色体上を余すところなく進行する。このような複製反応は、チェックポイント機構、染色体接着、染色体凝縮、ヒストン修飾維持と変動などのさまざまな染色体維持機構と連携していることを示唆する事例が多く得られている。しかしながら分子レベルでの具体的反応機構は不明な点が多かった。

2. 研究の目的

(1) G1/S 期での複製開始複合体形成とその機能制御機構を明らかにすることために、分裂酵母を用いて複製開始点を網羅的に同定し、染色体領域毎の複製開始点の開始タイミングが複製因子結合のどの段階で制御されているかを明らかにする。

(2) これまでに、分裂酵母では S 期移行時に複製開始点に結合する Sld3 が細胞周期特異的にリン酸化されることを見いだしており、細胞周期による複製開始点での分子集合とタンパク質相互作用の制御機構を明らかにする。

(3) 異なる染色体領域で S 期の異なる時期にただ 1 度だけ複製を開始する制御には、クロマチン構造と結合タンパク質が関与すると考えられるが、分子メカニズムは不明であるため、特有のクロマチン構造をとる領域を選定し、複製開始へのクロマチン因子の作用メカニズムを明らかにする。

(4) 研究分担者である滝澤と石見の分担を得て、ツメガエル試験管内複製系ではタンパク質の除去と組換えタンパク質の添加による複製因子の機能を明らかにし、また精製したヒト複製タンパク質のタンパク質間相互作用の解析から特に MCMヘリカーゼタン

パク質の活性制御機構の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 分裂酵母染色体の複製開始点を網羅的に同定するために、G1 期で複製開始点に形成される複合体の成分となる Orc1, Mcm6 を免疫沈降法で回収し、結合している DNA 領域を精密タイリングアレイにより、同定した (東京工業大学、白髭克彦博士との共同研究)。また実際に複製開始した領域を同定するために、ヒドロキシ尿素存在下で新生 DNA をプロモデオキシウリジンで標識し、塩化セシウム密度勾配遠心法によって分離した DNA を上記同様にマイクロアレイで決定した。

(2) 複製開始因子の分子集合過程を明らかにするため、分裂酵母複製開始因子の温度感受性株を単離し、制限温度で複製開始が停止する条件での、種々の複製開始タンパク質の染色体局在を、クロマチン免疫沈降法とリアルタイム PCR 法により同定した。

(3) 細胞周期を同調した分裂酵母細胞でプロモデオキシウリジン標識を継続的に行い、染色体領域毎の複製開始タイミングを測定する系を構築した。この系を用い、セントロメアヘテロクロマチンの初期複製に関与する因子を、さまざまなクロマチン構造因子やチェックポイント因子の欠失株で解析し、関与する因子を同定した (理研発生研究所、中山潤一博士との共同研究)。

(4) S 期初期に複製開始点に結合し、細胞周期依存的にリン酸化される Sld3 と Drc1 のリン酸化部位を質量分析法で同定し (北海道大学、小布施力史博士との共同研究)、Sld3 ならびに Drc1 への CDK リン酸化部位変異株の作成し、クロマチン免疫沈降法により、複製開始点でのタンパク質集合メカニズムを解析した。また酵母 Two-hybrid 法により、Sld3, Drc1 と Cut5 の CDK 依存的相互作用を解析した。

(5) 分裂酵母細胞内で、植物ホルモンオーキシシン添加に依存して、標的タンパク質を迅速に分解除去する、オーキシンドグロン系を開発し (阪大、滝澤温彦、鐘巻将人博士との共同研究)、Mcm10, Pola, Pole などの複製因子をほぼ完全に除去した条件を作ることに成功し、これらの因子の機能解析を行った。

(6) アフリカツメガエル系において、RecQL4 が酵母 Sld2 とアミノ酸配列で類似しており、抗体を作成してツメガエル卵抽出液から免疫除去を行い、複製開始における RecQL4 の役割を解析した (滝澤)。

(7) 複製進行複合体 (Replication Progression Complex, RPC) の構成成分を同定するために、RPC の中心的タンパク質である Cdc45, Mcm2-7, GINS の抗体を用いてアフリカツメガエル卵抽出液から RPC を免疫沈降により回収し、質量分析により成分を同定し

た (滝澤)。

(8)複製ヘリカーゼの主成分である Mcm2-7 複合体と他のタンパク質との相互作用と活性制御を明らかにするために、昆虫細胞発現系を用いて、ヒト Mcm2-7 をはじめ多数のタンパク質群を発現し、相互作用を共沈降法などにより解析した (石見)。

4. 研究成果

真核生物における染色体複製開始における複製因子の分子集合とその機能制御機構の解明を目指して、分裂酵母 (升方)、アフリカツメガエル卵抽出液 (滝澤)、ヒト培養細胞 (石見) のモデル生物を用いた多面的解析を行った。

(1)分裂酵母での複製開始点への複製因子集合が細胞周期によって制御されるしくみを研究し、pre-RC (pre-replicative complex) への Sld3 の結合には DDK (Dbf4-dependent kinase) が必要であるのに対し、それに続く GINS 複合体、Cut5、Cdc45 の結合には CDK (cyclin-dependent kinase) が必要であることを明らかにした。これらは細胞周期の2つの必須キナーゼによる複製開始制御段階の違いを示すことができた。

(2)複製開始制御における分裂酵母複製開始因子 Sld3 の CDK 依存的リン酸化の意義を明らかにするために、免疫沈降法で回収した Sld3 の質量分析解析により、CDK リン酸化部位を同定した (北海道大学、小布施力史博士との共同研究)。アミノ酸置換変異の解析から、Sld3 の CDK によるリン酸化は Cut5 との相互作用に必要であることを明らかにした。さらに出芽酵母 Sld2 と類似性を示す Drc1 の CDK リン酸化部位のひとつが Cut5 との相互作用に必須であることを示し、CDK によるリン酸化依存的に Sld3-Cut5-Drc1 の複合体が形成されることが複製開始に必須であることを明らかにした。

(3)分裂酵母全染色体レベルの ChIP-chip、BrdU-chip 解析により、分裂酵母染色体の pre-RC 部位と初期複製開始部位を網羅的に同定した (東工大、白髭克彦博士との共同研究)。腕部ユークロマチン領域での初期ならびに後期複製開始点、セントロメアでの初期複製開始点、サブテロメアでの後期開始点を同定した。

(4)クロマチン構造因子が複製開始を制御するしくみを明らかにするために、セントロメア、性決定領域 (mat)、ならびにサブテロメアでの複製開始タイミングを種々のクロマチン蛋白質欠損株で解析し、ヘテロクロマチン蛋白質 HP1 が、セントロメアと mat の初期複製開始に必要であることを見いだした。さらに HP1 は DDK と直接相互作用してセントロメアヘリクルートし複製開始を促進することを発見した (理研、中山潤一博士との共同

研究)。

(5)分裂酵母細胞内で条件特異的にタンパク質を分解除去するオーキシンドグロン系を構築し、Mcm4 除去条件では、Mcm2, 3, 5, 6, 7 は安定に存在するが複製開始不能や、複製フォーク停止を引き起こすことを示した。さらに約 20 種類の染色体機能タンパク質を除去可能し、細胞周期停止などの表現型を示す条件を得た。

(6)Xenopus 卵抽出液を用いて、酵母での複製開始必須因子である Sld2 と部分的相同性を持つ新規複製開始因子 RecQL4 を同定した。RecQL4 は高等動物特有の複製開始因子であり DNA ポリメラーゼ α の染色体結合に必要である。RecQL4 はレプリソーム形成の最終段階で CDK 依存的な DNA 二本鎖の開裂ステップに関わる事を明らかにした (滝澤)。

(7)複製フォークを構成すると考えられるレプリソーム進行複合体 RPC の構成成分の同定とその機能解析を行い、RPC のコアとなる CMG 複合体 (Cdc45, Mcm2-7, GINS) の特異的抗体を用いた免疫沈降産物を質量分析法により分析し RPC の成分を同定した。その結果 Tim1-Tipin, Claspin, AND-1, FACT, Mcm10 が CMG 複合体と会合している事を見いだした。

(8)さらにこれら因子の機能解析を行い、Tim1-Tipin, Claspin は複製チェックポイントに、AND-1 は姉妹染色体接着に、FACT は複製フォークの進行と RPC の安定化に関わっている事を明らかにした (滝澤)。

(9)DNA 複製ヘリカーゼである Mcm2-7 タンパク複合体の活性発現制御機能を明らかにする目的で、DNA 複製フォークの進行を制御すると考えられるヒト因子群と Mcm2-7 タンパク質の直接的な結合を昆虫細胞内の共発現実験で解析した。Claspin や Rb タンパク質は、限られたメンバーとの結合性を示すのに対し、Tim1 と Tipin は、Mcm3-7 のすべてに結合する特徴を示した。全体的に、Mcm3 と Mcm6 は多くの因子と結合することから結合のプラットフォームである可能性があり、Mcm7 との結合性を示す因子はフォーク進行を抑制するものが多かった。いっぽう Mcm2 との結合性を示すのは MCM-BP のみであった。また MCM ヘリカーゼ活性制御に関連して、Mcm4/6/7 ヘリカーゼの阻害剤である抗生物質ヘリキノマイシンを同定した。複製フォークに存在する RPA タンパク質は複製タンパク質うち、10 種類と結合することを明らかにした。また DNA 複製に関与する因子である RecQL4 タンパク質が試験管内で DNA ヘリカーゼ活性を発揮することを明らかにした (石見)。

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 31 件)

原著論文 (22 報)

- ① Fukuura M, Nagao K, Obuse C, Takahashi TS, Nakagawa T and *Masukata H. CDK promotes interactions of Sld3 and Drc1 with Cut5 for initiation of DNA replication in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* (査読有) in press (巻、ページ数未定) (2011).
- ② Ode KL, Fujimoto K, Kubota Y, *Takisawa H. Inter-origin cooperativity of geminin action establishes an all-or-none switch for replication origin licensing. *Gene Cells.* (査読有) 16: 380-396 (2011).
- ③ Kanke M, Nishimura K, Kanemaki M, Kakimoto T, Takahashi TS, Nakagawa T, *Masukata H. Auxin-inducible protein degradation system in fission yeast. *BMC Cell Biol.* (査読有) 11:12:8 (2011).
- ④ Hayashi MT, *Masukata H. Regulation of DNA replication by chromatin structures: accessibility and recruitment. *Chromosoma.* (査読有) 120: 39-46 (2011).
- ⑤ Numata Y, Ishihara S, Hasegawa N, Nozaki N, and *Ishimi Y. Interaction of human MCM2-7 proteins with TIM, TIPIN and Rb. *J. Biochem.* (査読有) 147: 917-927 (2010).
- ⑥ Hayashi MT, Takahashi TS, Nakagawa T, Nakayama J, *Masukata H. The heterochromatin protein Swi6/HP1 activates replication origins at pericentromeres and silent mating-type locus. *Nature Cell Biol.* (査読有) 11: 357-362, 2009.
- ⑦ Tanaka H, Kubota Y, Tsujimura T, Kumano M, Masai H, *Takisawa H. Replisome progression complex links DNA replication to sister chromatid cohesion in *Xenopus* egg extracts. *Gene Cells* (査読有) 14: 949-963, 2009.
- ⑧ Nishimura K, Fukagawa T, Takisawa H, Kakimoto T, *Kanemaki M. An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in animal cells and yeast. *Nature Methods* (査読有) 12: 917-922, 2009.
- ⑨ Ishimi Y, Sugiyama T, Nakaya R, Kanamori M, Kohno T, Enomoto T, *Chino M. Effect of heliominomycin on the activity of human minichromosome maintenance 4/6/7 helicase. *FEBS J.* (査読有) 276: 3382-3391, 2009.
- ⑩ Suzuki T, Kohno T, *Ishimi Y. DNA helicase activity in purified human RECQL4 protein. *J. Biochem.* (査読有) 146: 327-335, 2009.
- ⑪ Nitani N, Yadani C, Yabuuchi H, Masukata H, *Nakagawa T. Mcm4 C-terminal domain of MCM helicase prevents excessive formation of single-stranded DNA at stalled replication forks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (査読有) 105: 12973-12978, 2008.
- ⑫ Nakamura KI, Okamoto A, Katou Y, Yadani C, Shitanda T, Kaweteerawat C, Takahashi TS, Itoh T, Shirahige K, Masukata H, *Nakagawa T. Rad51 suppresses gross chromosomal rearrangement at centromere in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* (査読有) 27: 3036-3046, 2008.
- ⑬ Komamura-Kohno Y, Tanaka R, Omori A, Kohno T, *Ishimi Y. Biochemical characterization of fragmented human MCM2. *FEBS J.* (査読有) 275: 727-738, 2008.
- ⑭ Hayashi M, Katou Y, Itoh T, Tazumi A, Yamada Y, Takahashi ST, Nakagawa T, Shirahige K, *Masukata H. Genome-wide localization of pre-RC sites and identification of replication origins in fission yeast. *EMBO J.* (査読有) 26: 1327-1339, 2007.
- ⑮ Yabuuchi H, Yamada Y, Uchida T, Sunathvanichkul T, Nakagawa T, *Masukata H. Ordered assembly of Sld3, GINS and Cdc45 is distinctly regulated by DDK and CDK for activation of replication origins. *EMBO J.* (査読有) 25: 4663-4674, 2006.
- ⑯ Pacek M, Tutter AV, Kubota Y, Takisawa H, *Walter JC. Localization of MCM2-7, Cdc45 and GINS to the site of DNA unwinding during eukaryotic DNA replication. *Mol. Cell* (査読有) 21: 581-587, 2006.
- ⑰ Matsuno K, Kumano M, Kubota Y, Hashimoto Y, *Takisawa H. The N-terminal noncatalytic region of *Xenopus* RecQ4 is required for chromatin binding of DNA polymerase α in the initiation of DNA replication. *Mol. Cell Biol.* (査読有) 26: 4843-4852, 2006.
- ⑱ Hashimoto Y, Tsujimura T, Sugino A, *Takisawa H. The phosphorylated C-terminal domain of *Xenopus* Cut5 directly mediates ATR-dependent activation of Chk1. *Gene Cells* (査読有) 11: 993-1007, 2006.
- ⑲ Komamura-Kohno Y, Karasawa-Shimizu K, Saitoh T, Sato M, Hanaoka F, Tanaka S, *Ishimi Y. Site-specific phosphorylation of MCM4 during the cell cycle in mammalian

cells. *FEBS J.* (査読有) 273: 1224-1239, 2006.

⑳ Kudoh A, Daikoku T, Ishimi Y, Kawaguchi Y, Shirata N, Iwahori S, Isomura H, *Tsurumi T. Phosphorylation of MCM4 at sites inactivating DNA helicase activity of the MCM4-MCM6-MCM7 complex during Epstein-Barr virus productive replication. *J. Virol.* (査読有) 80: 10064-10072, 2006.

㉑ Yoshida K, Takisawa H, *Kubota Y. Intrinsic nuclear import activity of geminin is essential to prevent re-initiation of DNA replication in *Xenopus* eggs. *Genes Cells* (査読有) 10: 63-73, 2005.

㉒ Zhu Y, Ishimi Y, Tanudji M, *Lees E. Human CDK2 inhibition modifies the dynamics of chromatin-bound minichromosome maintenance complex and replication protein A. *Cell Cycle* (査読有) 4: 1254-1263, 2005.

総説 (9報)

㉓ 升方久夫.複製開始点活性化の時間的・空間的制御のしくみ.蛋白質核酸酵素増刊号(査読無)「染色体サイクル」54巻4号,pp356-363,2009(共立出版)

㉔ 石見幸男.複製開始と進行におけるMCM蛋白質複合体.核酸酵素増刊号(査読無)「染色体サイクル」54巻4号,pp364-369,2009(共立出版)

㉕ 大出晃士,滝澤温彦.アフリカツメガエル卵抽出液におけるpreRC形成.蛋白質核酸酵素増刊号(査読無)「染色体サイクル」54巻4号,pp334-342,2009(共立出版)

㉖ 升方久夫,林 真理.染色体DNA複製開始点のゲノムワイド動態と活性化タイミング.細胞工学(査読無)27巻10号,pp967-973,2008(秀潤社)

㉗ 鐘巻将人,久保田弓子,滝澤温彦.複製フォーク形成複合体の染色体サイクルにおける働き.細胞工学(査読無)27巻10号,pp992-997,2008(秀潤社)

㉘ 升方久夫,林 真理.分裂酵母染色体複製開始点の網羅的解析.実験医学(査読無)25巻5号,pp596-602,2007(羊土社)

㉙ 林 真理,升方久夫.染色体維持におけるDNA複製の制御と役割:DNA複製から染色体へ.蛋白質核酸酵素(査読無)51巻pp2117-2122,2006(共立出版)

㊀ 吉田和真,滝澤温彦,久保田弓子.DNA複製のライセンス化制御.実験医学(査読無)23巻9号, pp1340-1346,2005(羊土社)

㊁ 久保田弓子,橋本吉民,滝澤温彦.DNA複製装置・レプリソームの形成・維持を制御する機構.化学と生物(査読無)43巻8号,pp519-527,2005(日本農芸化学会)

[学会発表] (計114件)

① H. Masukata (招待講演), Regulation of DNA replication by chromatin structures. Eukaryotic DNA replication and genome maintenance, 2009年9月1-5日, Cold Spring Harbor, NY, USA.

② Y. Ishimi, Effect of heliquinomycin on human MCM4/6/7 helicase. Eukaryotic DNA replication and genome maintenance. 2009年9月1-5日, Cold Spring Harbor, NY, USA.

③ H. Masukata (招待講演), Regulation of DNA replication by chromatin structures. Switzerland-Japan joint meeting on Chromosome Dynamics and Genome Stability, 2009年5月14-16日, Villars-sur-Ollons, Switzerland.

④ H. Takisawa (招待講演), Replisome formation and sister chromatid cohesion in *Xenopus* egg extracts. Switzerland-Japan joint meeting on Chromosome Dynamics and Genome Stability, 2009年5月14-16日, Villars-sur-Ollons, Switzerland.

⑤ H. Masukata (招待講演), Regulation of replication origins in sub-telomeres. Telomere and telomerase, 2009年4月28日-5月1日, Cold Spring Harbor, NY, USA

⑥ H. Takisawa (招待講演), Coupling of initiation of DNA replication and establishment of sister chromatid cohesion in *Xenopus* egg extracts. ASBMB symposium, Experimental Biology 2009, 2009年4月18-22日, New Orleans, USA.

⑦ H. Masukata (招待講演), Regulation of DNA replication by cell cycle and chromatin structures. Salk/Caltech/USC Conference on DNA Replication and Genome Integrity, 2008年7月18-22日, Salk Institute, La Jolla, USA.

⑧ H. Masukata (招待講演), DDK-HP1 interaction is crucial for early replication of heterochromatin regions. Cold Spring Harbor Meeting on The Cell Cycle, 2008年5月14-18日, Cold Spring Harbor, USA.

⑨ H. Masukata (招待講演), Control of chromosome DNA replication in fission yeast. Fourth International Fission Yeast Meeting, 2007年6月11-16日, Copenhagen, Denmark.

[図書] (計1件)

升方久夫, 分子生物学(深見泰夫編著)化学同人, 2010年, pp18-30, 71-100, 167-180.

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: 非植物生物におけるオーキシン誘導的蛋白質分解系

発明者: 鐘巻将人、西村浩平、柿本辰男、滝澤温彦

権利者: 鐘巻将人、西村浩平、柿本辰男、滝

澤温彦

種類：特開

番号：特開 2008-187958 発明 K20080443

出願年月日：2007年2月

国内外の別：国内

〔その他〕

報道関連情報

升方久夫, 読売新聞、平成21年3月9日
朝刊

ホームページ等

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

<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~takisawa/Top.html>

<http://idna.sci.ibaraki.ac.jp/>

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

滝澤 温彦 (TAKIZAWA HARUHIKO)

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：60154944

石見 幸男 (ISHIMI YUKIO)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：80159772

(3) 連携研究者

()

研究者番号：