

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07338

研究課題名(和文) DNA探索走査装置の多彩な高次複合体構築原理と機能分担

研究課題名(英文) Structure-function relationship of specific DNA recognition machinery

研究代表者

川上 広宣 (Kawakami, Hironori)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50403952

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)：本研究は出芽酵母の染色体複製起点DNAを特異的に認識するORC複合体に主に着目した。まず、複製起点認識に必須なモチーフとして代表者が独自に見いだしたORCモチーフEOSが、一本鎖DNAと連係して高次複合体形成と活性制御にかかわる新機能を持つことを見いだした。また、ORCとある種の非典型DNAとの結合能の意義を解明し、更にORC関連蛋白質における類似機能の重要性も明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種々の蛋白質が染色体DNAの特定領域を走査探索・認識して高次複合体を形成することは、細胞内の普遍的プロセスである。染色体上の複製起点DNAに作られる高次複合体は、細胞周期制御の要であり、この形成過程が破綻すると、がん化や染色体異常の原因となる。本研究により、蛋白質とDNAとの結合メカニズムという根本的問題の一端が理解できたことに加え、高次複合体構築原理と機能分担、ならびにその普遍性が明らかとなった。関連分野における斬新なコンセプトを提示できたことに加え、がんの理解やORCを標的とした創薬の可能性が期待できる。

研究成果の概要(英文)：The origin recognition complex, an initiator of eukaryotic DNA replication, was analyzed in vitro, in vivo, and in silico. The eukaryotic origin sensor motif in ORC, which was originally identified by our group, was shown to have a novel function. Another ORC-related protein was also analyzed. Based on these findings, possible models regarding DNA recognition processes were proposed.

研究分野：生物学

キーワード：染色体複製 ORC 機能構造解析 DNA結合 高次複合体形成 Cdc6

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

種々の蛋白質が染色体 DNA の特定領域を走査探索・認識して高次複合体を形成することは、細胞内の普遍的プロセスである。このうち染色体上の複製起点 DNA に作られる高次複合体は、細胞周期制御の要である。この形成過程が破綻すると、がん化や染色体異常の原因となる。真核生物の ORC (origin recognition complex)ヘテロ 6 量体は複製起点と特異的に複合体形成する複製開始蛋白である。ORC による染色体複製の最初期過程を理解するには、ORC がどのように(i)染色体 DNA を走査探索し、(ii)複製起点を特異的に認識し、(iii)複製起点と高次複合体を形成するか、といった素過程のメカニズムを実験的に示すことが重要である。

代表者は米国コールドスプリングハーバー研究所 Bruce Stillman 所長研究室への留学中に、出芽酵母 ORC と複製起点との「(iii)結合」に関する独自の構造モデルを提唱している(Structure 2012; Nat. Struct. Mol. Biol. 2013)。この構造情報を元にした変異 ORC の解析は、ORC 6 量体の精製が煩雑で困難なため不可能であった。そこで帰国後、最新の多量生産法を用いるなどして変異 ORC の高速精製法を確立し、前述の構造的基盤と組み合わせることで、ORC の機能構造解析を可能にした(Kawakami et al., 2016, Front. Microbiol.)。その最初の成果として、複製起点の「(ii)特異的認識」に必須な ORC 機能構造を最大サブユニット Orc1 中に見出し EOS (eukaryotic origin sensor) と命名した。ORC と複製起点との安定な複合体形成に先立ち EOS 単独で複製起点を認識する過程が存在することを初めて示し、15 年以上信じられた ORC・複製起点複合体形成機構の予想では想定されなかった新概念が提唱できた (Kawakami et al., 2015, Sci. Rep.)。

一方、染色体 DNA は二重鎖 DNA 以外にも一本鎖 DNA などの多様な構造を含んでおり、ORC は一本鎖 DNA とも試験管内で結合できる。多種多様な DNA 上で ORC がどのように高次複合体を構築仕分けしているか不明であり、機能分担するかも明らかで無かった。また、このようなメカニズムが ORC 以外の蛋白質でも普遍的に見られるかも不明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず EOS の一本鎖 DNA 上における役割を解明し、ORC と結合する DNA の違いによる ORC-DNA 高次複合体構築機構の保存性と多様性ならびに機能分担を明らかにすることを第 1 の目的とした。次に、ORC における EOS とは異なる DNA 結合モチーフを同定し、特に非典型 DNA 結合能の細胞内における役割や重要性を明らかにすることを第 2 の目的とした。更に、上述の知見が ORC パラログ Cdc6 でも保存されるかを明らかにすることを第 3 の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)ORC 6 量体の機能構造解析

代表者の確立した変異 ORC の高速精製法(Kawakami et al., 2016, Front. Microbiol.)を用いて出芽酵母 ORC 6 量体を 293T 細胞中から高速精製した。DNA 結合能、ATP 結合能、ATPase 結合能を指標として変異 ORC の表現型を評価した。新たな変異を持つ ORC を精製する場合は、代表者独自の構造情報(Structure 2012; Nat. Struct. Mol. Biol. 2013)や情報解析を元に変異導入部位を決定し、ORC 発現プラスミドに部位特異的変異導入を行った。同様に高速精製と生化学的解析を行い、有望な変異 ORC の酵母細胞内における解析も行った。

## (2)ゲノミクス解析

出芽酵母ならびにヒトのリファレンスゲノムならびに、ORC と一本鎖結合蛋白質の ChIP-seq データを用いて共局在解析を行い、ORC がゲノムの特異的領域で一本鎖結合能を持ちうるか検証した。

## (3)Cdc6 の機能構造解析

既報で用いた精製法(Structure 2012)に従い、GST タグ融合型変異 Cdc6 を大腸菌中で発現させ、精製した後にタグを切断した。得られた変異 Cdc6 蛋白質の非典型 DNA や二重鎖 DNA との結合能を評価した。非典型 DNA 特異的に表現型を有するような有望な変異 Cdc6 を同定後、この蛋白質の温度感受性 *cdc6* 変異株における表現型を遺伝学的に評価した。

## (4)研究体制

代表者は以下の所属先で研究を遂行した。

- ・平成 29～30 年度

九州大学大学院薬学研究院 助教

- ・平成 31 年度

山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部

准教授

## 4. 研究成果

まず、代表者は ORC の機能構造解析法の確立や、独自に見いだした EOS に関する総説を発表した(川上、片山、2018; Kawakami, 2019)。

次に、EOS の知見を発展させた。ORC は一本鎖 DNA にも EOS に依存しない方法で結合するが、EOS が一本鎖 DNA 上の ORC を制御するかどうか不明であった。独自の ORC 高速精製法(Kawakami et al., 2016, *Front. Microbiol.*)を利用して ORC の生化学的な解析を行い、ORC が一本鎖 DNA 上でアデニンヌクレオチドと無関係に重合することを見いだした。次に、ORC が EOS に依存して重合体を形成し、ORC ATPase 活性を促進すると明らかにした。また、出芽酵母やヒトのゲノミクスデータの解析により、ORC の一本鎖 DNA 結合は複製起点以外の特異的なゲノム部位で起こるという考えが支持された。以上の結果から、EOS は ORC に結合した一本鎖 DNA によって機能分化し、ORC の自己重合や ATPase 促進をもたらすと示唆された。これにより、これまで長年不明であった ORC の一本鎖 DNA 結合能に関する役割を解明する突破口が開けた(Kawakami et al., 2019, *Genes Cells*)。

EOS は最大サブユニット Orc1 内に存在する一方、その DNA との親和性は ORC 6 量体の 1/100 未満である(Kawakami et al., 2015, *Sci. Rep.*)。従って、ORC の DNA 結合能には更なる DNA 結合モチーフが関わりと示唆される。そこで我々は ORC の複数サブユニットを対象とした体系的機能構造解析を行い、ORC の DNA 結合能や高次構造形成に関わる新たなモチーフを複数見出した。変異 ORC 複合体の簡便精製法を用いてこのうち 1 種を詳細に解析したところ、とある非典型 DNA に対しての親和性が亢進していた。また複製起点 DNA への結合特異性が欠損していた。

一方、ATP 結合能や ATPase 能は野生型と同程度保持されていた。この変異 ORC を細胞内で発現させると、特定の条件で温度感受性 *orc* 変異株の増殖を阻害することが判明した。すなわち、ORC が非典型 DNA への結合能を適切なレベルに保つことが適切な細胞増殖に重要と示唆される（国際学会等で発表済み；論文執筆中）。

次に我々は、ORC の非典型 DNA との結合能の試験管内解析を行い、既存の非典型 DNA 結合蛋白質と同程度の親和性を持つことを見いだした。また、ORC のこの結合に配列選択性があることを見いだした。以上の結果は、ORC の非典型 DNA 結合が既知の代表的な蛋白質に比類し、ゲノム上の特異的領域で起こるという可能性を支持している（国際学会等で発表済み；論文執筆中）。

更に、本解析を ORC パラログ Cdc6 に拡張した。まず、Cdc6 の非典型 DNA 結合能を鋭敏に検出する生化学システムを確立し、次に非典型 DNA 結合能を低下させる Cdc6 欠失変異の同定に成功した。次に、非典型 DNA 結合能に関わるドメインの領域限定を行い、二重鎖 DNA への結合能を野生型と同程度保持しつつ、非典型 DNA への結合能が不安定化する変異 Cdc6 の同定に成功した。また、この変異 Cdc6 が細胞増殖を阻害する条件を見いだした。これにより Cdc6 の非典型 DNA 結合を指標とした機能構造解析が可能となり、この結合の細胞内における重要性が示唆された（学会発表済み）。

以上をまとめると、代表者独自の ORC 機能構造解析基盤を発展させることで、EOS と DNA の種類に応じた ORC の特異的高次構造と機能の制御という新概念が提唱できた。これにより、ORC と染色体 DNA との動的な結合動態とその連係制御が協同したメカニズムであると示唆された。また、ORC と非典型 DNA との結合が細胞内の特異的領域で起こりうることや細胞内における重要性も初めて示唆された。加えて、非典型 DNA との結合能の重要性は ORC パラログ Cdc6 においても示唆された。これらの成果は、蛋白質と DNA との結合メカニズムや制御という根本的問題の理解において重要な内容を含むことに加え、当該メカニズムの普遍性と多様性の理解をもたらすものと思われる。以上を踏まえ、当初の目的を十分達成することができたと判断した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hironori Kawakami (co-corresponding author), Ryuya Muraoka, Eiji Ohashi, Kenta Kawabata, Shota Kanamoto, Takeaki Chichibu, Toshiki Tsurimoto, Tsutomu Katayama	4. 巻 24
2. 論文標題 Specific basic patch-dependent multimerization of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ORC on single-stranded DNA promotes ATP hydrolysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 608-618
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12710	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 川上 広宣, 片山 勉	4. 巻 3
2. 論文標題 真核細胞ゲノムにおける複製起点探しの分子機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 九州大学アイソトープ総合安全管理センターニュース	6. 最初と最後の頁 7-8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計20件（うち招待講演 4件/うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Hironori Kawakami, Ryuya Muraoka, Takuya Kurihara, Takeaki Chichibu, Shota Kanamoto, Kenta Kawabata, Eiji Ohashi, Toshiki Tsurimoto, Tsutomu Katayama
2. 発表標題 DNA binding of replication initiator in budding yeast
3. 学会等名 The 42nd Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, workshop 2PW-04 New Frontier in studies of DNA replication (organizers: Hisao Masai and Hiroyuki Araki) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hironori Kawakami, Takeaki Chichibu, Shota Kanamoto, Takuya Kurihara, Ryuya Muraoka, Kenta Kawabata, Eiji Ohashi, Toshiki Tsurimoto, Tsutomu Katayama
2. 発表標題 Single-stranded DNA binding of eukaryotic replication initiators: possible roles in cellular events
3. 学会等名 The 92nd annual meeting of the Japanese Biochemical Society, Symposium #1S13a Flexibility of genome maintenance machineries on diverse genome structures (organizers: Asako Furukohri and Hisao Masai) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上広宣、栗原拓也、川畑健太、村岡龍哉、千々布壮陽、金本祥太、大橋英治、釣本敏樹、片山 勉
2. 発表標題 出芽酵母複製開始タンパク質の一本鎖DNA結合の役割と普遍性の解析
3. 学会等名 第25回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上広宣、栗原拓也、川畑健太、村岡龍哉、千々布壮陽、金本祥太、大橋英治、釣本敏樹、片山 勉
2. 発表標題 出芽酵母における複製開始蛋白質の一本鎖DNA結合能と普遍性
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上広宣、千々布壮陽、金本祥太、栗原拓也、村岡龍哉、川畑健太、大橋英治、釣本敏樹、片山 勉
2. 発表標題 真核生物ゲノム複製開始蛋白質における一本鎖DNAを介した多重制御系
3. 学会等名 第31回微生物シンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上広宣、千々布壮陽、金本祥太、栗原拓也、村岡龍哉、大橋英治、釣本敏樹、片山 勉
2. 発表標題 ゲノム複製起点の特異的認識を保證する、一本鎖DNAを介した動的制御
3. 学会等名 第60回日本生化学会中国・四国支部例会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 栗原拓也, 川畑健太, 千々布壮陽, 川上広宣, 片山 勉
2. 発表標題 真核生物の複製開始因子Cdc6における一本鎖DNA結合能と結合モチーフの探索解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀之内遥香, 山室優香, 飯野美穂, 川上広宣, 片山 勉, 由良 敬, 和賀 祥
2. 発表標題 ヒトORC1とORC2におけるグアニン四重鎖形成可能1本鎖DNAとの結合に関するドメインの解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 広宣
2. 発表標題 複製起点認識蛋白質ORCの超高次複合体形成様式と動的制御
3. 学会等名 2018年度遺伝研研究会「単細胞生物における細胞装置の機能と連携」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 広宣, 千々布 壮陽, 金本 祥太, 栗原 拓也, 村岡 龍哉, 大橋 英治, 釣本 敏樹, 片山 勉
2. 発表標題 真核生物ゲノム複製の特異性を保証する、一本鎖DNAを介したゲノムワイド制御系
3. 学会等名 第13回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上広宣
2. 発表標題 真核生物におけるゲノム複製開始と制御の分子基盤の理解に向けて
3. 学会等名 帝京大学医真菌センター研究セミナー（世話人：関水和久）（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川上 広宣, 千々布 壮陽, 金本 祥太, 栗原 拓也, 大橋 英治, 釣本 敏樹, 片山 勉
2. 発表標題 複製起点の特異的認識を保證する、動的かつゲノムワイドなORC・一本鎖結合制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会ワークショップ3A-10 見えてきた！フレキシブルでダイナミックなゲノム維持機構のすがた
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川上 広宣, 千々布 壮陽, 金本 祥太, 栗原 拓也, 大橋 英治, 釣本 敏樹, 片山 勉
2. 発表標題 ORCの複製起点結合能を保證するための一本鎖結合制御系
3. 学会等名 第91回生化学会大会シンポジウム2S06m「遺伝情報の維持継承におけるマイクロとマクロの統合的理解：生化学の新たな挑戦」（オーガナイザー：川上広宣、正井久雄）（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川上 広宣, 千々布 壮陽, 金本 祥太, 栗原 拓也, 大橋 英治, 釣本 敏樹, 片山 勉
2. 発表標題 複製起点二重鎖DNAの認識過程における一本鎖DNAの役割
3. 学会等名 平成30年度日本生化学会九州支部例会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hironori Kawakami, Takeaki Chichibu, Shota Kanamoto, Takuya Kurihara, Ryuya Muraoka, Eiji Ohashi, Toshiki Tsurimoto, Tsutomu Katayama
2. 発表標題 ssDNA as a dynamic and genome-wide mediator governing specificity of eukaryotic replication origin selection
3. 学会等名 3R+3C Symposium: Replication, Recombination and Repair (3R) with special focus on Chromosome, Chromatin and Cell Cycle (3C) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hironori Kawakami, Takeaki Chichibu, Shota Kanamoto, Eiji Ohashi, Toshiki Tsurimoto, Tsutomu Katayama
2. 発表標題 ssDNA-related multifaceted safeguards in ORC dynamics govern specific replication origin selection
3. 学会等名 EMBL Symposia: DNA Replication: From Basic Biology to Disease (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 栗原 拓也, 川畑 健太, 千々布 壮陽, 川上 広宣, 片山 勉
2. 発表標題 真核生物の複製開始因子Cdc6における一本鎖DNA結合モチーフの探索
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川上広宣、千々布壮陽、川畑健太、金本祥太、大橋英治、釣本敏樹、片山勉
2. 発表標題 ORCの一本鎖結合能を介した双方向機能動態制御
3. 学会等名 第24回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川畑健太、千々布壮陽、川上広宣、大橋英治、釣本敏樹、片山勉
2. 発表標題 真核生物の複製開始に必須なORCとCdc6における二重鎖ならびに一本鎖DNA結合部位の探索
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会、第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 川上広宣、千々布壮陽、金本祥太、川畑健太、大橋英治、釣本敏樹、片山勉
2. 発表標題 複製起点認識蛋白質ORCによる一本鎖DNA結合とその制御の役割
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会、第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hironori Kawakami	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Cold Spring Harbor Laboratory Press (New York)	5. 総ページ数 481-483
3. 書名 Seeing is believing: dawn of the structure-function relationship analysis of ORC. In ORChestrating Science: Bruce Stillman's 40th Years at the Frontier of DNA Replication Research. Inglis, J.R. and Mazzullo M. S. (eds) (not for sale).	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>川上 広宣   山陽小野田市立山口東京理科大学  <a href="http://www.socu.ac.jp/departments/faculty/hironori-kawakami.html">http://www.socu.ac.jp/departments/faculty/hironori-kawakami.html</a>          川上 広宣 - 研究者 - researchmap  <a href="https://researchmap.jp/read0091781/">https://researchmap.jp/read0091781/</a>          Hironori Kawakami - Google Scholar Citations  <a href="https://scholar.google.co.jp/citations?user=Cij641QAAAAJ">https://scholar.google.co.jp/citations?user=Cij641QAAAAJ</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----