

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06124

研究課題名（和文）Claspinのリン酸化と形態変化による複製フォーク複合体の活性制御機構の解析

研究課題名（英文）Investigation of the regulation mechanism of the replication fork by phosphorylation and intramolecular interaction of Claspin

研究代表者

Zhiying You (ZHIYING, You)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：90332270

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：Claspinは保存された複製チェックポイントメディエーターであり、通常の複製フォークの進行においても役割を果たす。細胞から精製されたClaspinはDNAにほとんど結合しなかったのに対し、脱リン酸化したClaspinは効率的にDNAと結合することになった。ClaspinはMCMと複合体を形成し、MCMのヘリカーゼ活性を阻害することを見出した。また、リン酸化によって、ClaspinのDNA結合が阻害され、ClaspinのN端とC端の相互作用も阻害されたことでN末端セグメントのリン酸化がClaspinの分子内相互作用およびDNA結合を調節している可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

外的内的な要因による複製フォークの停止は、ゲノムの不安定化をもたらす、疾患や腫瘍形成の根源的な原因となる。Claspinは、複製ストレス仲介分子としての解析はされてきたが、複製開始進行における役割についての解析はほとんどなされていない。従って、本研究は、複製フォークの制御機構に関して独創的な研究成果をもたらすことで、がん治療法につながることを考えている。今回の研究から、ClaspinがMCMヘリカーゼ活性を抑制することを見出し、リン酸化がClaspinの分子内相互作用およびDNA結合を調節していることにより、複製フォークの安定化、ゲノムの崩壊を防ぐという重要な働きをしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Claspin is a conserved replication checkpoint mediator and plays a role also in the normal replication fork progression. We reported that Claspin has an acidic patch domain that interacts specifically with Cdc7, and that this domain may also be involved in intramolecular interaction with its N-terminal segment. Purified Claspin from cells barely bound to a fork DNA, whereas the dephosphorylated Claspin changed it to an efficient binder. Claspin form a complex with MCM and inhibit the helicase activity of MCM. In addition, phosphorylation inhibited the DNA binding of Claspin and also inhibited the interaction between the N-terminal and C-terminal of Claspin, suggesting that the phosphorylation of the N-terminal segment regulated the intramolecular interaction and DNA binding of Claspin. We are now identifying the phosphorylated residues that regulate the interactions, and responsible kinase, and their physiological significance.

研究分野：生化学・分生生物学

キーワード：Claspin DNA複製 フォーク安定化 DNA結合 タンパク質のリン酸化 分子内結合

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

複製開始により形成される複製フォーク上には、MCM ヘリカーゼの他に、DNA ポリメラーゼおよび複製の安定保護に関与する因子 Claspin などが集合し、巨大複合体 RPC (replisome progression complex)が形成され、複製フォークの活性化、安定維持と進行を担う。Claspin はフォーク停止の際にチェックポイントの仲介分子であり、複製フォークの進行の促進因子として機能する。Cdc7 キナーゼは、MCM をリン酸化することにより複製開始の引き金をひく。最近、正常な複製フォークの進行において、Claspin は Cdc7 と直接相互作用し複製複合体へとリクルートし、MCM のリン酸化を促進することを発見した。さらに、Claspin は Cdc7 によるリン酸化により分子形態が大きく変化する可能性を見出した。しかし、この形態変化が他の分子との相互作用や、その機能、さらに MCM を含む他の複製因子の酵素活性や機能に及ぼす影響は不明である。

2. 研究の目的

Cdc7 は複製開始を促進する保存されたキナーゼであり、この過程での最も重要な基質は複製ヘリカーゼ MCM 複合体と複製フォーク安定化因子 Claspin である。当研究室では Claspin が、MCM に加えて Cdc7 の重要な基質であることを発見した。また、Claspin は Cdc7 をリクルートすることにより MCM のリン酸化及び複製制御ストレス応答を促進することを報告した。本研究は、Claspin を基盤として、Claspin のリン酸化修飾による、Claspin の DNA への結合への影響、Claspin と MCM や他のタンパク質との相互作用やその酵素活性、複製開始、フォークの進行、複製ストレス応答、さらに、Claspin の分子形態への影響を詳細に解析することにより、Claspin-MCM による複製開始と複製フォーク進行制御の機構を解明する。

3. 研究の方法

Claspin は Cdc7 キナーゼの重要な標的である。Claspin は Cdc7、MCM と共に Cdc45、Tim-Tipin、Pol ϵ 、PCNA 等多くの複製因子と相互作用し、複製フォークの効率良い進行と、複製ストレスに対する応答に必要である。

(1) Claspin の DNA 結合、MCM 等他の複製因子との相互作用の Claspin リン酸化による制御機構とその複製制御における役割は何か？

リン酸化型と非リン酸化型の Claspin による Mcm2-7 複合体と CMG 複合体のアニールング、ヘリカーゼ活性と ATP 加水分解能などへの影響を比較・検討する。

Claspin 分子上の N 端領域がリン酸化の候補であるので、この領域のすべてのセリンスレオニンをアラニン(A 変異)、あるいはグルタミン酸(E 変異)に置換した変異体を作製する。これらの変異体を精製し、その DNA 結合活性や、ほかの複製因子との相互作用を調べる。

293T 細胞で一過性に発現し、pull down により複製タンパク質の結合を調べる。

A 変異と E 変異の機能を調べるために、動物細胞で誘導型プロモーターの下流に発現する安定細胞株を樹立する。内在性の Claspin をノックダウンし、変異体の機能を調べる。もし変異が、機能に影響を与えない場合には、別の領域の変異体を作製する。

(2) Claspin の分子内相互作用による環状分子の形成と消失は、どのように制御され、Claspin の機能にどのように影響を与えるのか？

Claspin の分子内結合の役割を解明するために、Claspin の N 端と C 端にそれぞれ FKBP と FRB を融合させて、有機小分子ラパマイシンの添加によって Claspin の分子内結合をするバリエーションを作製した。

ラパマイシン添加により分子内相互作用を誘導し、形態の変化を誘導した Claspin の Cdc7 によるリン酸化、DNA や PCNA への結合活性などを測定する。

Duolink PLA (Proximity Ligation Assay : 近接ライゲーションアッセイ)

分子内結合の役割を明確で視覚的なシグナルとして Claspin の N 端と C 端にそれぞれ Flag と HA-tag を融合させて、分子内相互作用を検出する。

4 . 研究成果

本研究では、Claspin のリン酸化制御による、Cdc7 と MCM を含むタンパク質との相互作用やその酵素活性、フォークの進行、複製ストレス応答、さらに、Claspin の分子形態への影響を詳細に調べることで、Claspin-MCM による複製フォーク進行制御の機構を明らかにする。精製した Claspin タンパク質複合体を用いた実験から以下のことが明らかになった。

Claspin は細胞周期に通じてリン酸化レベルが大きく変動する。G1 期はリン酸化レベルが最も低く、S 期に最も高くなる。293T 細胞から精製されたタンパク質は、293T 細胞に存在するキナーゼによってすでにリン酸化されていたため、DNA にほとんど結合できない。しかし、λ-PPase で脱リン酸化処理後精製した Claspin は DNA の結合は著しく強くなった。つまり、リン酸化が Claspin の DNA 結合を阻害することを発見した(図 1、レーン 2 と 3 を比較)。また、免疫沈降プルダウンの実験から、高リン酸化型の Claspin N 端ポリペプチドは非リン酸化型の N 端に比較して C 端との相互作用が減弱した。さらに、ネイティブゲルでは、Claspin の脱リン酸化された N 末端のみがクラスピンの C 末端と複合体を形成している。トリプシン処理でもリン酸化した Claspin と脱リン酸化させた Claspin の限定分解の様式が大きく異なった、つまりリン酸化調節を介して Claspin の分子形態が変化すると考えられる。したがって、上記の結果は、特に Claspin の N 末端のリン酸化が N 末端と C 末端の Claspin 相互作用を阻害することを示し、リン酸化が Claspin の分子内相互作用と DNA 結合を調節している可能性が示唆された。

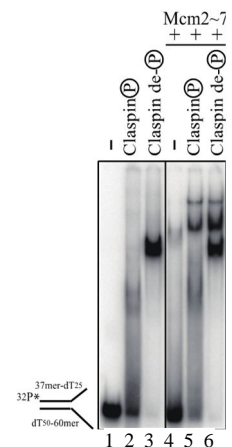


図 1: リン酸化が Claspin の DNA 結合及び MCM との複合体形成を阻害する。

Claspin が複製ヘリカーゼ MCM 複合体のヘリカーゼに及ぼす影響を解析した。Claspin が特異的にフォーク DNA に強く結合する。そこで、精製した Claspin と MCM の DNA 結合活性との相乗効果を調べた。Claspin は MCM と複合体を形成し、DNA 結合活性を促進することが分かった (図 1: レーン 4-6)。また、精製したリン酸化型 Claspin 野生型、デグロン変異体、および Claspin -FKBP / FRB + & -ラパマイシンはフォーク DNA にほとんど結合しなかったが、C-del7 および DE-A 変異体はフォーク DNA に強く結合した。さらに、野生型 Claspin は、用量依存的に Mcm2~7 ヘリカーゼ活性を阻害することが見出された。対照的に、酸性パッチ領域を削除したクラスピンの C-del 7 変異体は、阻害効果はなく、Mcm ヘリカーゼ活性をわずかに増加させた。293T 細胞から精製された Claspin はすでにリン酸化されているため、MCM ヘリカーゼに対する非リン酸化 Claspin の影響を調査する必要がある。

Claspin は DNA ポリメラーゼ ε、δ と相互作用し、複製フォークの効率よい進行に必要と考え、293T 細胞から精製した Claspin を用いて、直接に精製したポリメラーゼの酵素活性に及ぼ

す影響を調べた。しかし、出芽酵母 Mrc1 のような DNA ポリメラーゼ ϵ 活性の促進効果は得られなかった。今後、Claspin のリン酸化による阻害的な影響を与えるかどうか、また、Cdc7 のリン酸化を受けない Claspin_DE/A 変異体を用いて、CMG ヘリカーゼとポリメラーゼ ϵ の活性に及ぼす影響を調べる予定である。

実験結果から Claspin の N 端領域が強くリン酸化され、Claspin の機能を制御する候補領域と考え、この領域のすべてのセリン、スレオニンをアラニン(A 変異)、またはグルタミン酸とアスパラギン酸 (E & D 変異) に置換した変異体を作製した。Claspin 変異体の細胞内機能解析に向けて、Tet-on 誘導発現システムを用いて、Claspin 変異体らの安定細胞株の樹立を進めている。これらの変異体が他のタンパク質との相互作用や複製フォークスピード、複製ストレス応答、と細胞局在などの変化を調べることで、Claspin の機能を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Zhiying You、Chi-Chun Yang、Hisao Masai
2. 発表標題 DNA複製制御におけるClaspinの分子内相互作用の役割 Roles of the intramolecular interaction of Claspin in regulation of DNA replication
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Zhiying You、Chi-Chun Yang、Hisao Masai
2. 発表標題 The intramolecular interaction mechanism of human Claspin activation
3. 学会等名 DNA metabolism, Genomic Stability & Human Disease Meeting (Cold Spring Harbor, Asia) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Zhiying You
2. 発表標題 Biochemistry of Mcm, the central factor for DNA replication: a hetero-hexameric helicase core complex that does not show DNA helicase activity”
3. 学会等名 首都大学東京Bio-Conference2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------