

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19770157
 研究課題名 (和文) 停止複製フォークを感知・プロセッシングする因子の網羅的探索と構造機能解析
 研究課題名 (英文) Identification and structure-function analyses of recognition/processing factors for arrested replication forks
 研究代表者
 田中 卓 (TANAKA TAKU)
 財団法人東京都医学研究機構・東京都臨床医学総合研究所・主任研究員
 研究者番号：80425686

研究成果の概要：停止フォークセンサー、大腸菌 PriA タンパク質の DNA 結合ドメインの結晶構造を解析し、極めてユニークなフォーク特異的認識機構を有していることを明らかにした。また、真核細胞のフォーク安定化因子、Mrc1、Swi1/3 タンパク質が、直接物理的に結合しており、停止フォーク上で協調した相互作用をすることを見出した。これらの結果は、真核細胞のチェックポイント機構解明に重要な情報を提供するものである。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA 複製・複製再開始・複製フォーク・分子認識・分子間相互作用

1. 研究開始当初の背景

DNA 複製中のフォーク停止は生命維持に対する重大な危機であり、細胞はこれを回避するためにチェックポイント機構を活性化させる。この機構は、細胞周期の一時的停止、鋳型 DNA 上の障害除去ならびに、フォーク進行の再開を制御する一連の反応である。反応開始の初期の段階で重要なステップとなるのは、停止フォークの感知であるが、これを担う因子の実体とその分子機構は不明であった。これを解明することは、複製停止からの回復の分子機構の全貌を明らかにするために必須の課題である。

2. 研究の目的

本申請研究は、停止した複製フォークと特異的に相互作用するタンパク質の、構造機能ならびに分子間相互作用の解析により、複製停止の感知とその回復に関わる分子機構の全体像を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 原核細胞 PriA の停止複製フォーク感知の構造機能的基盤の確立とそのプロセッシング機構における役割の解明
- ① 3' 末端認識の構造基盤の確立：PriA の 3' 末端特異性に関わる構造基盤を確立

するため、九州大学生体防御医学研究所の神田大輔博士の研究グループと共同で、3' 末端結合ポケット-ヌクレオチド複合体の立体構造をN末端領域の断片を使用して決定する。さらに全長 PriA の結晶構造解析にも取り組む。

- ② 3' 末端結合ポケットの機能解析：3' 末端結合ポケットの機能の生理学的意義を確定するため、ポケットを構成するアミノ酸を置換した変異株の遺伝学的解析を行う。また、PriA は伸長鎖 3' 末端への結合により、損傷乗り越え型ポリメラーゼと直接相互作用する可能性も示唆されることから、PriA の DNA 損傷に対する特異性並びに、損傷乗り越え型ポリメラーゼを含む種々のポリメラーゼとの相互作用を生化学的に解析する。
 - ③ 停止フォーク特異的結合タンパク質を利用した「染色体脆弱部位」の網羅的解析：PriA あるいは RecG に対する特異抗体を用いて染色体免疫沈降法により、複製停止/Pausing を引き起こしやすい特定ゲノム領域の有無を検証する。ここで沈降してくるゲノム DNA 断片の領域は不明のため、マイクロアレイを利用してその特定を試みる。また、同時に沈降してくるタンパク質群を同定、解析し、停止フォーク上に形成される複合体の機能を確定、複製回復モデルの直接的な証拠を得る。
- (2) 真核細胞における停止フォークを感知する因子の同定とその機能解析
- ① 真核細胞の「3' 末端認識タンパク質」の同定：3' 末端結合ポケットの構造の知見に基づき、同様な構造を有する可能性のある真核細胞遺伝子を同定し、それらの複製チェックポイントにおける機能を検討する。真核細胞ソースからの 3' 末端特異的結合タンパク質の単離と、その生化学的解析を行う。真核細胞から 3' 末端特異性を指標にプロテオミクス的手法（3' 末端 DNA カラム、二次元電気泳動による分画、特異的スポットの質量分析による遺伝子同定）を用いて同定する。同定された因子を精製、DNA 結合能、ヘリカーゼ活性等生化学的機能を解析する。
 - ② 機能解析：同定された 3' 末端認識タンパク質の詳細な機能解析を行う。酵母の変異体作製および動物細胞に対する siRNA による発現抑制により、真核細胞において、これらの因子が複製進行、複製停止あるいは DNA 損傷に対する応答に果たす役割を明らかにすることで、停止

複製フォークの認識への関与を検証する。

4. 研究成果

PriA N 末端 DNA 結合ドメイン断片とヌクレオチドとの複合体の結晶構造を解析した結果、3' 末端結合ポケットと名付けた構造の内側に存在する特定の amino 酸残基が、フォーク分岐点に存在する新生リーディング鎖の末端塩基と特異的に相互作用すると同時に、4 種のどの塩基とも結合できるという特性を担っていることが明らかとなった。このことは、塩基への特異性と非選択性を同時に成し遂げる極めてユニークな認識機構を有していることを示しており、フォークがどこで停止しても認識できる、というセンサーとして必須の機能を実現していると考えられる。この構造は新規であり、これを足がかりに真核細胞で同様の機能を持つタンパク質因子を検索することが可能となる。また、PriA の停止フォークに対する結合様式を詳細に解析し、結合には 2 つのモードがあり、それぞれ異なる構造のフォークの安定化に寄与するという新規の知見を得て報告した。分岐点に 3' 末端が存在するフォークでは、直接の結合により保護・安定化に働くが、3' 末端が存在しないフォークにおいては、別のフォーク特異的認識タンパク質、RecG と協同で作用し、フォーク安定化を成し遂げるといふ、新規のモデルを構築し報告した。フォーク安定化因子が複製停止からの回復に必須であることは、真核細胞で明らかにされており、本研究結果は、これらの生物種におけるフォーク認識およびその後の複製再開反応の分子機構を確立するために極めて有用な情報を提供するものと考えている。

さらに、真核細胞のフォーク安定化因子として既に知られている Mrc1、Swi1/3 タンパク質について、生化学的に性状解析を行った。DNA への結合を測定した結果、両者は個別に DNA 結合能を有するが、共存下で互いの結合能を促進し合うという協調した作用を持つことを初めて見出した。免疫沈降法によれば、両者は DNA の介在なしに直接の物理的相互作用によって結合しており、DNA 上で 3 者複合体を形成していることが分かる。また、既に同定されている Mrc1 の DNA 結合不能変異体タンパク質では Swi1/3 との相互作用が観察されないことから、Mrc1 の DNA 結合は、Swi1/3 複合体との相互作用に必須であることが明らかとなった。これらの結果は、両者の停止フォーク上での相互作用が、フォーク安定化に何らかの機能をする可能性を示しており、停止フォーク回復機構の解明に有用な寄与をするものである。今後はその他のフォークに関わる因子との相互作用、特にフォーク進行に必須の、Mcm ヘリカーゼタンパク質との相互作用ならびに、巻き戻し機能に対する影

響を観察し、複製再開反応におけるフォーク安定化因子の機能と、複製再開始の分子機構解明を目指す予定である。

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 2 件)

- ① Sasaki, K., Ose, T., Okamoto, N., Maenaka, K., Tanaka, T., Masai, H., Saito, M., Shirai, T., and Kohda, D. (2007) Structural basis of the 3'-end recognition of a leading strand in stalled replication forks by PriA. *EMBO J.*, 26, 2584-2593、査読有
- ② Tanaka, T., Mizukoshi, T., Sasaki, K., Kohda, D., and Masai, H. (2007) *Escherichia coli* PriA protein, two modes of DNA binding and activation of ATP hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, 282, 19917-19927、査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 横山 美佳、田中 卓、覺正 直子、正井 久雄、分裂酵母 Mrc1 タンパクの精製とその性情の解析。第 25 回染色体ワークショップ、神奈川、2008 年 1 月、ポスター発表
- ② Hisao Masai, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto, Naoko Kakusho, Michie Shimamoto, Mika Yokoyama, Yutaka Kanoh, Taku Tanaka and Yukari Odagiri. Regulation of establishment and maintenance of replication fork by Cdc7 kinase. Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008、滋賀、2008 年 4 月、招待講演
- ③ Hisao Masai, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto, Naoko Kakusho, Mika Yokoyama, Yutaka Kanoh, Michie Shimamoto and Taku Tanaka. Regulation of establishment and maintenance of replication fork by Cdc7 kinase. EMBO Conference on "Replication and Segregation of Chromosomes"、ノルウェイ、2008 年 6 月、招待講演
- ④ Hisao Masai, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto, Yutaka Kanoh, Mika Yokoyama, Michie Shimamoto, Naoko Kakusho, and

Taku Tanaka. Regulation of assembly and progression of replication fork by Cdc7 kinase. The First GCEO Symposium at Tokyo Institute of Technology on Chromosome Biology 2008, 東京、2008 年 10 月、招待講演

- ⑤ Hisao Masai, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto, Yutaka Kanoh, Michie Shimamoto, Mika Yokoyama, Taku Tanaka, Naoko Kakusho, Naoko Yoshizawa-Sugata, Zhiying You, Sayuri Ito, Chika Taniyama and Ai Ishii. Regulation of replication fork in maintenance of genomic integrity. 第 6 回 3R Symposium、静岡、2008 年 10 月、招待講演
- ⑥ Hisao Masai, Motoshi Hayano, Seiji Matsumoto, Yutaka Kanoh, Mika Yokoyama, Michie Shimamoto, Naoko Kakusho, Naoko Yoshizawa-Sugata and Taku Tanaka. Regulation of replication fork integrity during S phase. 第 31 回日本分子生物学会、神戸、2008 年 12 月、招待講演
- ⑦ 田中 卓、佐々木 香織、神田 大輔、正井 久雄、PriA タンパク質による停止複製フォーク認識:DNA 結合ドメインの 2 つのモジュールの役割と DNA3' 末端結合ポケットの特異な構造。第 4 回 21 世紀大腸菌研究会、静岡、2007 年 7 月、口頭発表
- ⑧ 田中 卓、佐々木 香織、水越 利巳、神田 大輔、正井 久雄、PriA タンパク質: 停止複製フォーク特異的認識のための構造基盤。第 30 回日本分子生物学会、横浜、2007 年 12 月、口頭およびポスター発表
- ⑨ 佐々木 香織、田中 卓、正井 久雄、前仲 勝実、神田 大輔、Structural basis for the DNA recognition of PriA protein in the stalled DNA replication fork. 第 30 回日本分子生物学会、横浜、2007 年 12 月、ポスター発表
- ⑩ 横山 美佳、田中 卓、覺正 直子、正井 久雄、分裂酵母 Mrc1 タンパクの精製とその性情の解析。第 30 回日本分子生物学会、横浜、2007 年 12 月、ポスター発表

〔図書〕（計1件）

- ① 田中 卓、正井 久雄、「分子間相互作用解析ハンドブック」（礪辺俊明，中山敬一，伊藤隆司／編）第二章 タンパク質-核酸相互作用解析法 1. South-Western 法（p. 160-163）、羊土社、2007年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 卓 (TANAKA TAKU)
財団法人東京都医学研究機構・
東京都臨床医学総合研究所・主任研究員
研究者番号：80425686

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者