

## 自己評価報告書

平成 23 年 5 月 9 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究 (S)

研究期間：2008～2012

課題番号：20227004

研究課題名 (和文) タンパク質の集合・リモデリングの分子機構とその制御

研究課題名 (英文) Molecular mechanism and regulation of assembly and remodeling of proteins

研究代表者 荒木 弘之 (ARAKI HIROYUKI)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授

研究者番号：20151160

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：リモデリング、DNA 複製、複製開始、DNA 合成

## 1. 研究計画の概要

細胞内で起こる生命現象の多くは、複数の因子が特定の時期に特定の場所に集合し、機能を発揮する反応である。遺伝情報を担う染色体 DNA の複製においても、まず DNA を合成する酵素を含む多数のタンパク質が複製を開始する DNA 領域に集合し、次にこれらタンパク質群が何らかの変換 (リモデリング) をし、DNA 合成を始める。本研究では、出芽酵母の染色体 DNA 複製開始過程をリモデリングのモデルとし、タンパク質の複製開始領域への集合とその後に起こるタンパク質複合体の変換 (リモデリング) の分子機構、そして細胞周期によるこれらの調節機構の解明を目指す。そのため、複製開始領域へ集合するタンパク質群の挙動を細胞内で調べるとともに、これらタンパク質を精製し、タンパク質間の相互作用・複合体形成や、開始領域への集合を試験管内で詳細に調べる。これまでに、pre-LC 複合体、Sld3-Sld7 複合体を新たに同定し、これら複合体が複製開始領域への集合反応とその後のリモデリング反応に働くことを示すことができた。

## 2. 研究の進捗状況

## (1) pre-LC 複合体の発見とその機能

サイクリン依存性キナーゼによりリン酸化された Sld2、Sld3 タンパク質は Dpb11 タンパク質に結合する。Sld2 と Dpb11 の結合が Dpb11, Sld2, DNA ポリメラーゼ  $\epsilon$  (Pol  $\epsilon$ ), GINS を含む pre-Loading Complex (pre-LC) 形成を促進することを見いだした。pre-LC は、複製開始領域の Sld3 と複合体中の Dpb11 の結合を介して、GINS を複製開始領域へリクルートすると考えている。

(2) 複製開始における Pol  $\epsilon$  の役割

複製酵素 Pol  $\epsilon$  の触媒サブユニット Pol2 の N 末側に位置する DNA 合成活性領域を除いても細胞は増殖するが、C 末を欠くと細胞は増殖できない。我々は、Pol2 の C 末が Sld2 と、Pol  $\epsilon$  の Dpb2 サブユニットが GINS と結合することにより、GINS と Dpb11-Sld2 複合体が結合し、pre-LC 形成が促進されることを示した。これは、Pol  $\epsilon$  の複製開始での機能を明らかにするとともに、DNA 合成酵素が新たな機能を持ちうるという驚くべき可能性を提示するものである。

## (3) Sld7 のリモデリングに於ける機能

新規タンパク質 Sld7 は、Sld3 と複合体を作る。Sld3 は Cdc45 タンパク質とも複合体を作り、複製開始領域へ結合する。複製開始とともに、Cdc45 は Sld3 と解離し、ヘリカーゼ複合体の一部として複製開始領域から離脱する。Sld7 を欠く細胞は S 期進行が遅れ、ヘリカーゼ複合体の開始領域からの解離が遅れる。これは、Sld3 が Sld3-Sld7 複合体より Cdc45 と解離しにくいためであることが分かった。この結果は、複製開始領域への複製因子の結合・解離の調整に Sld7 が関与することを示唆し、結合したタンパク質の性状を換えること (リモデリング) が DNA 複製開始において重要であることを意味する。

## (4) 試験管内 DNA 複製系の確立へ

タンパク質複合体のリモデリングの詳細を理解するために、試験管内で精製タンパク質や細胞粗抽出液を用いて細胞内の反応、即ち活性型複製ヘリカーゼの形成や複製反応の再構築を試みている。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

2つの複合体 pre-LC, Sld3-Sld7 を同定し、それらの形成と解離 (リモデリング) に関する結果を得た。また、複製開始に必要なタンパク質もほぼ全て精製標品を得ているので、進捗状況の項目(4) も今後は順調に進展するものと考えている。これらは当初の予定通りである。さらに、Pol  $\epsilon$  の複製開始での機能の解明 (論文準備中) は予想外の大きな前進であったし、試験管内 DNA 複製系の確立が出来そうである (予備的実験段階)。ただ現時点では、試験管内系の不確定要素もあるので、順調に進展と判断した。

### 4. 今後の研究の推進方策

複製開始領域へのタンパク質の集合とリモデリングのキイとなる以下の項目について研究を進める。

(1) 活性な複製ヘリカーゼである Cdc45-Mcm-GINS 複合体形成への pre-LC の寄与について、精製タンパク質と可能であれば試験管内 DNA 複製系を用いて解析を進める。

(2) pre-LC 形成とリモデリングにおける Pol  $\epsilon$  の役割を、精製したタンパク質を用いてより詳細に解析する。

(3) Sld3-Sld7 複合体の複製開始でのリモデリングにおける役割について、この複合体の構造と機能の面から解析を進める。

(4) 試験管内複製系を確立し、この系を用いた開始反応、リモデリングの解析を行う。

以上の解析結果から、DNA 複製開始反応でのリモデリングの機構を明らかにするとともに、生物反応一般でのリモデリングの役割についても考察する。

### 5. 代表的な研究成果

(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 Tanaka, T., Umemori, T., Endo, S., Muramatsu, S., Kanemaki, M., Kamimura, Y., Obuse, C. and Araki, H. (2011) Sld7, an Sld3-associated protein required for efficient chromosomal DNA replication in budding yeast. *EMBO J.* doi:10.1038/emboj.2011.115 査読有り
- ② Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y-S., Kamimura, Y. and Araki, H. (2010) CDK-dependent complex formation between replication proteins, Dpb11, Sld2, Pol  $\epsilon$  and GINS in budding yeast. *Genes & Dev.* 24, 602-612. 査読有り

- ③ Araki, H. (2010) Cyclin-dependent kinase-dependent initiation of chromosomal DNA replication. *Curr. Opin. Cell Biol.* 22, 766-771. 査読有り

- ④ Tanaka, S. and Araki, H. (2010) Regulation of the initiation step of DNA replication by cyclin-dependent kinases. *Chromosoma* 119, 565-574. 査読有り

- ⑤ Araki, H. (2009) Regulatory mechanism of the initiation step of DNA replication by CDK in budding yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* 1804, 520-523. 査読有り

[学会発表] (計 49 件)

- ① Araki, H., Tanaka, Y., Yanagisawa, Y., Endo, S., Hirai, K. and Tanaka, S. (2011) Essential function of Pol epsilon at the initiation step of chromosomal DNA replication in budding yeast, Keystone Symposia "DNA Replication and Recombination", Keystone, CO, USA.

- ② Araki, H., Tanaka, T., Tanaka, Y., Yanagisawa, Y., Endo, S., Hirai, K. and Tanaka, S. (2010) How replication proteins associate with origins to initiate chromosomal DNA replication, The 7th 3R Symposium, Toyama, Japan.

- ③ Araki, H., Tanaka, T., Tanaka, Y., Yanagisawa, Y., Endo, S., and Tanaka, S. (2010) How replication proteins associate with and dissociate from origins to initiate chromosomal DNA replication, FASEB Summer Research Conferences "Yeast Chromosome Structure, Replication & Segregation", Carefree, AZ, USA.

- ④ Araki, H., Hirai, K., Li, Y., Tanaka, T., Muramatsu, S., Tanaka, S. (2009) CDK-dependent assembly of replication proteins at the initiation step of chromosomal DNA replication, *Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance*, Cold Spring Harbor, NY, USA.

- ⑤ Araki, H., Tanaka, T., Hirai, K., Tanaka, Y., Umemori, T., Yanagisawa, Y., Muramatsu, S. and Tanaka, S. (2008) Molecular mechanism of the initiation step of chromosomal DNA replication in budding yeast, XX International Congress of Genetics, Berlin, Germany.

[その他]

ホームページ

<http://www.nig.ac.jp/section/araki/arak-i-j.html>