

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 4 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2011

課題番号：20370005

研究課題名（和文） 真核細胞染色体 DNA 複製開始の分子機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the molecular mechanism of the initiation of chromosomal DNA replication in eukaryotes

研究代表者

田中 誠司 (TANAKA SEIJI)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教

研究者番号：50263314

研究成果の概要（和文）：

真核生物の染色体 DNA 複製は、染色体上に散らばって多数存在する特定の領域（=複製起点）から開始する。染色体 DNA は一度の細胞分裂周期の間に、一度だけ過不足なく正確に倍加されなくてはならないため、細胞は複製起点の活性化を一度の細胞周期につき一回だけに限定するような制御機構を備える。本研究では、細胞周期の S 期（=DNA 合成期）になるまで複製開始しないようにファイニングを防止している制御機構や複数の複製起点の活性化のタイミングの違いを生み出しているメカニズムを解明した。

研究成果の概要（英文）：

Chromosomal DNA replication in eukaryotes initiates from multiple origins of replication. Because chromosomal DNA must be precisely duplicated per every cell cycle, cells have regulatory mechanisms that limit the origin activation to once per cell cycle. In this study, we found how cells inhibit the premature untimely initiation of DNA replication and how to coordinate the activation of multiple replication origins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2009 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2010 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
2011 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：DNA 複製、CDK、細胞周期、複製開始

1. 研究開始当初の背景

真核細胞において染色体 DNA 複製は、染色体上の特定の領域 (DNA 複製起点) から開始する。細胞周期の G1 期には、複製起点上に複製前複合体 (pre-replicative complex: pre-RC) と呼ばれるタンパク-DNA 複合体が形成される。この時、DNA 複製時に DNA 2 本鎖を巻き戻すヘリカーゼ本体と考えられている Mcm2-7 複合体が染色体に結合するため、pre-RC 形成は DNA 複製の第一段階である。S 期に入ると、2つのキナーゼ、CDK (サイクリン依存性キナーゼ) と Cdc7 が pre-RC を活性化し、DNA 複製が開始する。CDK は細胞周期の進行を制御するタンパク質キナーゼであり、Cdc7 もキナーゼであることから、これらはこの過程において特異的な基質をリン酸化し、その結果、pre-RC という静的な複合体が複製フォークという動的な複合体に変化すると考えられる。したがって、CDK ならびに Cdc7 の生理的な基質を同定し解析することは、複製開始過程を理解する上で必須である。

本研究開始以前に、Mcm2-7 複合体が Cdc7 の生理的なターゲットであると考えられる証拠は複数得られていた。一方、CDK の生理的ターゲットは、長い間謎であったが、申請者らの研究より、Sld2 と Sld3 という2つのタンパク質が CDK によってリン酸化され、リン酸化依存的に第三のタンパク質、Dpb11 の C 末端部、N 末端部とそれぞれ結合することや、これら2つのタンパク質が S 期 CDK の最少の必須基質セットを形成することがわかった。その結果、Sld2 と Sld3 のリ

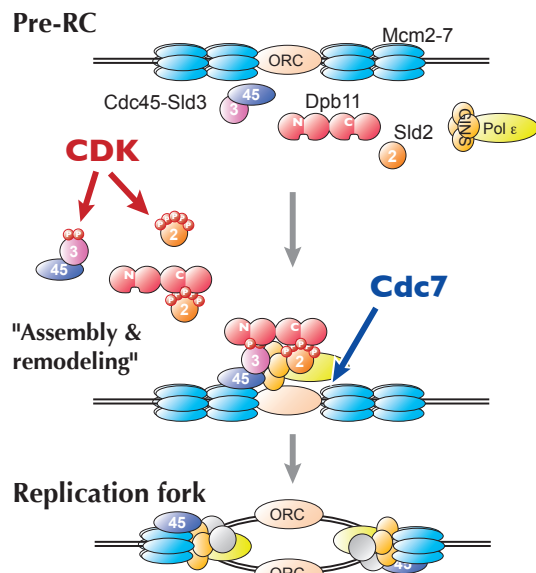


図1 真核細胞DNA複製開始のモデル。
G1期に形成されるpre-RCが2つのキナーゼ、CDKとCdc7により活性化され、複製フォークが形成される。この時、CDKによるSld2とSld3のリン酸化がきっかけとなり、新たなタンパク質群の集合とリモデリングが起きると考えられる。複製フォークには多数のタンパク質が含まれるが、多くのものはここでは割愛した。

ン酸化が、複製起点上での新たなタンパク質群の集合とリモデリングを誘導し、DNA複製が開始すると考えられる大枠でのモデルを得るに至った (図1)。

このような背景のもと、以下に述べるように染色体 DNA 複製の開始反応についてのさらなる理解を目指して研究を開始した。

2. 研究の目的

真核細胞の染色体 DNA 複製は、一回の細胞分裂周期につき一度だけ過不足なく起きるように厳密な制御を受けている。細胞は、① S 期に染色体 DNA 複製を開始させる活性、② 染色体 DNA の再複製を阻止する活性をその細胞周期内で巧妙に組み合わせることで、「一回の細胞分裂周期につき一度だけ」という制御を成立させている。これらのうち、本研究では「染色体 DNA 複製の開始反応」を分子レベルでより詳細に理解することを目指した。

3. 研究の方法

真核生物細胞の良いモデルである出芽酵母を材料として用い、適宜遺伝学的・細胞生物学的・生化学的手法を用いて、あるいは組み合わせで解析を行った。

4. 研究成果

主要な研究成果3点について以下に記す。

(1) DNA 複製開始制御とゲノム安定性維持

真核細胞の染色体 DNA 複製は細胞周期の中で時間的に分けられた2段階の反応で起こる：i) 細胞周期の G1 期に複製前複合体 (pre-RC) が形成されて準備を整え、ii) S 期に入ると pre-RC が活性化され (複製開始)、複製フォークが形成される。これらの反応が同時に起きると、染色体 DNA の再複製が起きるため、これらの反応は細胞周期中で完全に分離しておかなくてはならない。すなわち、pre-RC は S 期で活性化されるが、G1 期に時期尚早に活性化されることはない。図1に示したように申請者らの以前の研究から複製開始機構が大枠で理解できたため、このような G1 期に時期尚早に pre-RC の活性化が起きることを防いでいる機構を解析した。複製開始因子の変異を組み合わせることで人為的に G1 期で複製を誘導すると、ごく初期から細胞は致死となる。生き残る細胞もごく少数存在するが、そのゲノムが著しく不安定化することがわかった (図2)。この系では CDK のターゲットを含む複数の因子が重複して制御されており、そのうちどれかでも破綻すると染色体の不安定化が起きることから、複数の制御系を持つことで非特異的複製開始を抑え、ゲノムを安定に維持していることがわかった。

これまでに、いったん複製開始した複製起点からの再複製を防止する仕組みについては、申請者らのものも含め世界中の多くの研究室から多数の報告がなされてきた。しかしながら、G1 期に細胞が時期早尚に複製を開始しないようにしている仕組み・ならびにその制御が破綻したときにどのような結果が生じるのかについての解析は本研究以前にはなく、本研究は最初の報告である。
(論文として発表：PLoS Genet. (2011) 6, e1002136.)

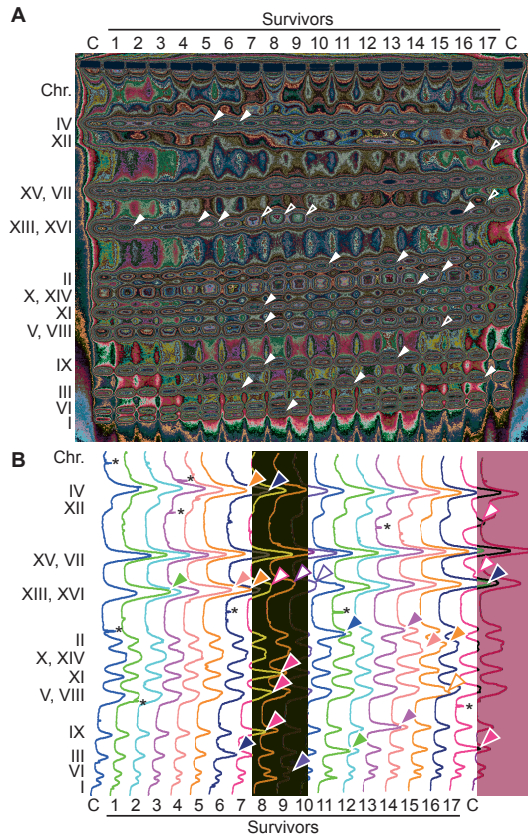


図2. G1期の時期早尚な複製は染色体を不安定化する。G1期にDNA複製を次期少々に人工的に誘導すると、染色体再複製が起きるため多くの細胞は致死となる。少数の生き残った細胞では、ほとんどの細胞は異常な染色体構成になっていた。A: 染色体のパルスフィールドゲル電気泳動像。白く見えているバンド一本が一本の染色体に相当。コピー数が変わって色が濃くなったものや、長さが変わったものを矢印で示す。B: Aの各バンドを定量化した。

(2) DNA 複製開始の時間的制御機構

真核細胞において、染色体 DNA 複製は多数の複製起点から起きる。ゲノムに散らばって多数存在する複製起点は S 期の間に活性化されるが、各々の S 期内の活性化のタイミングは一定、すなわち、個々の複製起点は固有の活性化タイミングを持つことが知られている (=複製起点活性化のタイミング制御プログラム)。この制御システムはどのように生後され、また背後にどのような分子基盤があり、またそういった現象が生物にとってどのような意味を持つのかといった点について

は不明なままであった。そこで本研究において出芽酵母をモデル系として用いて、DNA 複製起点活性化の時間的制御プログラムの分子レベルでの実態の解明を目指した。本研究では、DNA 複製開始過程に関わるいくつかの因子の細胞内でのタンパク質分子数が、複製起点となる DNA 領域の数よりもかなり少ないことを見出し、これらの因子の特異的な分配・結合がタイミング制御の実体と深い関連があることを示した。これらの因子の分子数を増大させることで、個別に解析した複数の複製起点においてタイミング制御プログラムに異常が見られた。また、このような変化は特定の複製起点でのみ起きるわけではなく、ゲノムワイドに起きていることも次世代シーケンサーを用いた解析から示した。さらに、これらの因子の特異的な分配に、染色体 DNA 複製開始を司るタンパクキナーゼである DDK (Dbf4-dependent kinase) が関与していることを見いだした。これらの結果は、S 期では DDK のターゲットとなる特異性の高い複製起点から順番に活性化していくことがタイミング制御プログラムの実体であることを示唆している (図3)。現在、高等動物細胞でも、特定の複製開始因子のコピー数が少ないこと等が報告され始めており、本研究成果は、多細胞真核生物の発生・分化の過程で見られるような複雑な DNA 複製起点の制御プログラムを理解していくための第一歩となるものである。

(論文として発表：Curr. Biol. (2011) 21, 2055-2063.)

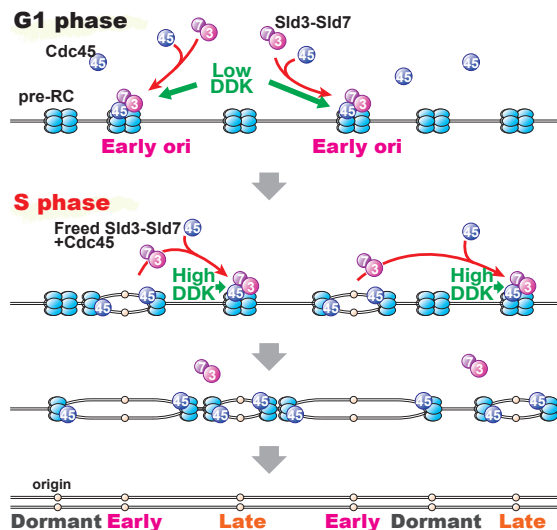


図3. 出芽酵母の複製起点活性化タイミング制御プログラム。複製開始に必要な因子である Sld3-Sld7-Cdc45 の細胞当たりのコピー数は複製起点の数よりも少なく、これらの複製起点への結合が、複製起点活性化のタイミングを決定する。この結合は複製開始に必須なキナーゼ、DDK により制御されている。最初に Sld3-Sld7-Cdc45 が結合していた複製起点が活性化されると、これらの因子は新たなまだ活性化していない複製起点に結合し、順次複製起点を活性化してゆく。

本研究成果は当該学問分野や関連学問分野において大きな注目を集めている。論文が

掲載された Current Biology 誌において注目研究を取り上げる Dispatch のコーナーで取り上げられた他、研究者による論文評価システムである F1000 Biology においても取り上げられ、‘must read’ という高い評価を受けていることから本研究成果への注目度の高さが窺える。今後は本研究成果を念頭に置いたような多細胞真核生物での研究が展開されることが予想される。

(3) Dpb11 と GINS の相互作用は複製開始に重要である

複製開始反応系に関わる因子は以下の4種類に大別できる。

① pre-RC に含まれ、複製フォークには含まれないもの

② pre-RC、複製フォークの両方に含まれるもの (Mcm2-7)

③ pre-RC、複製フォーク共に含まれないが複製フォーク形成には必要 (Sld2, Sld3, Dpb11)

④ pre-RC に含まれないが、複製フォークには含まれる (Cdc45, GINS, Pol ϵ 他) (図1参照)

グループ③因子 (Sld2, Sld3, Dpb11) の会合により促進される開始複合体の形成過程そのものが、複製開始・抑制のスイッチとなっており、それらの会合は CDK によるリン酸化で制御されている (図1参照)。開始複合体にはこれらの他、グループ④の因子も含まれているが、それらの開始複合体形成における役割は不明であった。そこで、これらの因子の複製開始反応における役割を理解するため、解析を行った。

その結果、GINS と Dpb11 は直接相互作用できることを見出した。Dpb11 の GINS 相互作用には、Dpb11 中央部の 40~50 アミノ酸の短い領域が必要であり、Dpb11 のこの領域が複製開始に重要な役割を果たしていることが分かった。また、本研究で新規に取得した、この領域と結合できなくなるような GINS の変異体は、一定の条件下で致死となることがわかった。これらのことは、本研究で見出した Dpb11-GINS の相互作用が DNA 複製開始に重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、Dpb11 の GINS 相互作用領域が脊椎動物まで保存されていること、脊椎動物においても GINS と相互作用し、複製開始に重要な役割を果たしていることを見出した (論文投稿準備中)。

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 5 件)

① Tanaka, S., Katou, Y., Nakato, R., Shirahige, K., and Araki, H. (2011). Origin-association of Sld3, Sld7 and Cdc45 proteins, specifies the timing of origin-firing. *Curr. Biol.* 21, 2055–2063. (査読あり)
DOI 10.1016/j.cub.2011.11.038

② Tanaka, S., and Araki, H. (2011). Multiple Regulatory Mechanisms to Inhibit Untimely Initiation of DNA Replication Are Important for Stable Genome Maintenance. *PLoS Genet.* 6, e1002136. (査読あり)
DOI 10.1371/journal.pgen.1002136

③ Tanaka, S., and Araki, H. (2010). Regulation of the initiation step of DNA replication by cyclin-dependent kinases. *Chromosoma.* 119, 565-574. (査読あり)
DOI 10.1007/s00412-010-0291-8

〔学会発表〕 (計 34 件)

① Tanaka, S. DDK-dependent recruitment of Sld3, Sld7 and Cdc45 specifies the timing of origin-firing in budding yeast. 2011 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on EUKARYOTIC DNA REPLICATION & GENOME MAINTENANCE. Cold Spring Harbor, NY, USA. 2011.9.9

② Tanaka, S. Yeast initiation proteins, Sld3, Sld7 and Cdc45, specifies the timing of origin-firing. 6th UK-Japan Cell Cycle Workshop. Lake Windermere, United Kingdom. 2011.4.2

③ Tanaka, S. How early-firing origins are determined in budding yeast. FASEB Summer Research Conference ‘Yeast Chromosome Structure, Replication & Segregation’. Carefree, AZ, USA. 2010.8.11

④ Tanaka, S. Multiple regulatory mechanisms of the initiation of DNA replication are important for stable genome maintenance. Cold Spring Harbor Meeting “Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance” Cold Spring Harbor, NY, USA. 2009.9.2

⑤ Tanaka, S. Multiple regulatory mechanisms for the initiation of DNA replication are important for stable genome maintenance. Swiss-Japan Cell

Cycle Meeting-Chromosome Dynamics
and Genome Stability. Villars-sur-Ollons,
Switzerland. 2009.5.15

⑥ Tanaka, S. Periodic expression of Sld2
is important for DNA replication and
genome integrity. FASEB Summer
Research Conference 'Yeast Chromosome
Structure, Replication & Segregation'.
Carefree, AZ, USA. 2008.6.25

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 誠司 (TANAKA SEIJI)
国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・
助教
研究者番号：50263314

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし