

平成23年5月30日現在

機関番号： 82401  
研究種目： 基盤研究(C)  
研究期間： 2008～2010  
課題番号： 20570170  
研究課題名(和文)  
真核生物のDNA複製前複合体の活性化機構  
研究課題名(英文) **Activation mechanism of pre-replication complex in eukaryote**  
研究代表者  
泉 雅子 (IZUMI MASAKO)  
独立行政法人理化学研究所・生物照射チーム・専任研究員  
研究者番号： 00280719

研究成果の概要(和文)： ヒト細胞における siRNA による解析から、Mcm10 は DNA 複製の伸長反応よりはむしろ開始反応に関与していることが示唆された。また、欠失変異体を用いた解析から、Mcm10 と Mcm2-7 の相互作用ドメインが天然不規則構造領域に存在することを明らかにした。さらに、遺伝学的解析法を用いて、Mcm10 の本質的な機能に重要なのは、種を超えて保存されている領域であること、Mcm2-7 複合体との相互作用ドメインは、Mcm10 を複製の場へリクルートする際に補助的な役割を果たしている可能性を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)： Depletion of Mcm10 by siRNA inhibited origin firing, not fork progression. Using truncated mutants, I found Mcm10 interacted with Mcm2-7 through the intrinsically disorder domain. In addition, the genetical analyses showed that the conserved domain was essential for DNA replication. On the contrary, the Mcm2-7-interacting domain contributed to the retention of Mcm10 onto chromatin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	1,300,000	390,000	1,690,000
21年度	1,200,000	360,000	1,560,000
22年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

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：染色体複製、Mcm10、Mcm2-7

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞の DNA 複製反応は、複製開始部位に結合した Orc(origin recognition complex) に、Cdc6 や Cdt1 の働きにより Mcm2-7 複合体がロードされて複製前複合体を形成するステップ、複製前複合体が Cdc7 キナーゼや S 期特異的サイクリン依存性キナーゼ (Cdk2) 等の作用により活性化され DNA が解裂するステップ、DNA ポリメラーゼなどがロードされ複製の伸長反応が進行するステップ、の 3 段階に分けられる。各ステップでは、DNA 上で数十種類のタンパク質が協調的に機能することが必要である。さらに、最近では、チェックポイント因子や姉妹染色体の cohesion に関わる因子と複製因子との相互作用も報告されている。しかしながら、これらのタンパク質が複製開始点や複製フォーク上でどのように相互作用し機能しているのか、またその相互作用が細胞周期の中でどのように制御されているのかは必ずしも明らかではない。

Mcm10 は、最初に出芽酵母で DNA 複製開始に必須の因子として報告されたが、そのホモログは分裂酵母やショウジョウバエなどでも見つかり、真核細胞に普遍的な複製因子であると考えられている。申請者は、世界に先駆けてヒト Mcm10 を見出し、ヒト Mcm10 が Orc、Mcm2-7 複合体に結合すること、ヒト Mcm10 が S 期にのみクロマチンに結合していること、細胞周期の進行に伴いリン酸化されることやタンパク質の安定性が変動することを見いだしていた (Nucleic Acids Res., 2000, J. Biol. Chem., 2001)。さらに申請者は、Mcm10 が、DNA 複製に 30-60 分先立って複製部位にリクルートされ、複製開始後に複製部位から遊離することを見出した (J. Biol. Chem., 2004)、この結果はヒト Mcm10 が複製前複合体の活性化に関与していることを示唆している。

一方、酵母の Mcm10 に関しては、Cdc7 キナーゼによる Mcm2-7 複合体のリン酸化の促進 (Lee, J., et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 2002)、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の安定化、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  活性の促進など多くの反応への関与が指摘されていた。ヒトホモログについては、染色体の cohesion に関与する And1/Ctf4 に結合し、And1 のクロマチンへのローディングとそれに伴う DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  のリクルートを促進する活性 (Zhu, W., et al., Genes Dev., 2007)、DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  を安定化する活性が報告された (Chattopadhyay, S. and Bielsky, A., Mol. Biol. Cell, 2007)。また、電子顕微鏡を用いた観察から、ヒト Mcm10 は六量体を形成して DNA に結合することを示唆する結果が報告された (Okorokov, A. L., EMBO Rep., 2007)。しかし、ヒト Mcm10 による DNA ポリメラーゼ

$\alpha$  の安定化については、申請者も含めた複数のグループで追試できていない (Dutta, A., 私信)。また、六量体については、アフリカツメガエル卵抽出液中ではこのような複合体は確認されていないなど (Walter, J., 私信) 疑問視する声もあり、現時点では Mcm10 の生理機能とその存在様式について整合性のある理解には至っていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、ヒト Mcm10 が DNA 複製反応において具体的にどのような役割を担っているのかを解析することを目的とした。具体的には、まず Mcm10 を siRNA によりノックダウンしたときに、複製反応や他の DNA 複製因子の挙動にどのような影響を与えるかを生化学的・分子生物学的手法を用いて解析する。

申請者はすでに、ヒト Mcm10 の複数の機能ドメインを同定している。また、Mcm10 の様々な変異体にタグをつけ、哺乳類細胞内で安定に発現させる系を既に確立している。したがって、これらの欠失変異体を細胞内で安定に発現させ、複製の開始頻度や伸長反応速度、また他の複製因子の局在を調べ、これまでの生化学的解析から明らかになった Mcm10 の機能ドメインの生理的意義を細胞内で検証する。

また、申請者の最近の解析から、Mcm2-7 複合体と Mcm10 が細胞内で相互作用すること、Mcm10 が Mcm2-7 複合体を介してクロマチンに結合していることを示唆する結果が得られている。Mcm2-7 との相互作用領域をさらに絞り込み、両者の相互作用様式を明らかにする。

一方、アフリカツメガエルの卵抽出液や分裂酵母を用いた解析では、Mcm10 のクロマチンへのローディングは、Cdc7 や Cdk2 キナーゼ活性に非依存的で、それ以降の複製因子のローディングに必要であり (Walter, J., Mol. Cell, 2001, Gregan, J., et al., Mol. Biol. Cell, 2003)、Mcm10 の複製部位へのリクルートは複製開始反応の最も初期に起こるステップであると考えられる。本研究では、Cdc7 による Mcm7 のリン酸化が、Mcm10 のローディングに引き続いて起こる Cdc45 の複製因子のローディングに重要であることから (Masai, H., et al., J. Biol. Chem., 2006, Sheu, et al., Mol. Cell, 2006)、Mcm10 と Mcm2-7 複合体の結合により、Mcm2-7 複合体のリン酸化が促進されるかどうか検証する。

## 3. 研究の方法

(1) Mcm2-7 複合体と Mcm10 との相互作用に関する解析

申請者のこれまでの解析から、Mcm10 は Mcm2-7 複合体を介してクロマチンに結合していることが示唆されている。Mcm10 の様々な欠失変異体と免疫沈降法などを用いて、Mcm2-7 との相互作用に必

要なアミノ酸を同定する。

Mcm10と結合することによりMcm2-7複合体のリン酸化が促進されるかどうかを検証するため、Mcm10をsiRNAによりノックダウンしたときにG1/S境界点で引き起こされるMcm2-7のリン酸化が影響を受けるか、ウェスタンブロットや放射性リンを用いたin vivoラベルの実験により検討する。また、Mcm10と結合しているMcm2-7複合体、結合していないMcm2-7複合体を免疫沈降法によりそれぞれ精製し、各サブユニットの電気泳動上の移動度の違いをウェスタンブロットにより検出し、修飾の有無を検討する。

#### (2) siRNAを用いたMcm10の複製における機能解析

ヒト細胞でMcm10をsiRNAによりノックダウンする系を確立する。Mcm10をノックダウンしたときに、S期が正常に進行するかをフローサイトメーターを用いて調べたり、BrdUを取り込ませたDNAファイバーを展開して蛍光抗体法で検出し、DNA複製の開始頻度・伸長速度に与える影響を調べる。また、蛍光抗体法やクロマチン結合分画法により他の複製タンパク質の局在に与える影響を調べることにより、Mcm10のDNA複製における役割について知見を得る。

#### (3) 変異体を用いたMcm10の機能解析

申請者はこれまで、IRES (internal ribosomal entry site) を利用することにより、ヒトMcm10をGFP融合タンパク質としてHeLa細胞内で安定に発現させる系を確立している。そこで、Mcm10のMcm2-7複合体との相互作用ドメインや機能的に重要と考えられる配列に変異を導入し、同様のストラテジーでGFP融合タンパク質として安定に発現する細胞株を作成する。このときに、これらの変異体にはsiRNAに耐性となるサイレント変異を組み込み、siRNAにより内在性のMcm10をノックダウンして、細胞内の内在性Mcm10を変異タンパク質で置換する。この系を用いて、変異Mcm10を発現させたときのDNA複製に与える影響を上記(2)と同様に解析する。

### 4. 研究成果

#### (1) Mcm2-7とMcm10との相互作用の解析

申請者はこれまでに、ヒトMcm10の様々な欠失変異体を安定に発現する細胞株を作成し、S期におけるクロマチンへの安定な結合とfoci形成には、C末端側の領域(483-693)が必要であること、この領域を介してMcm2-7と結合することを明らかにしてきた。Mcm10の様々な欠失変異体と免疫沈降法を用いて、Mcm2-7とMcm10の相互作用領域をさらに絞り込んだ。その領域は、高次構造予測で特定の

構造をとらないいわゆる天然不規則構造領域であることを明らかにした。さらにこの領域は、Orcなどとも相互作用することが酵母のtwo-hybrid解析から示された。したがって、Mcm10は結合する相手の分子にあわせて構造を変化させ、相互作用していることが示唆された。

一方、siRNAでMcm10をノックダウンが、Mcm2-7のG1/S境界点におけるリン酸化に影響を与えるか検討したが、影響は見られなかった。

#### (2) siRNAを用いたMcm10の機能解析

効率よくMcm10をノックダウンできるsiRNAの配列を複数同定し、siRNAにより細胞内のMcm10をノックダウンしたところ、DNAポリメラーゼ $\epsilon$ 、Cdc45のクロマチン結合量は変化しなかったが、DNAポリメラーゼ $\alpha$ 、RPA、PCNAのクロマチン結合量が顕著に低下した。また、S期が2倍程度遅延した。このとき複製フォークの伸長速度には変化はなかったが、開始点間の距離が長くなったことから、Mcm10は複製の伸長反応よりはむしろ開始反応に関与していることが示唆された。

#### (3) 遺伝学的手法を用いたMcm10の機能解析

siRNA耐性のMcm10の様々な欠失変異体を安定に発現する細胞株に、siRNAを導入して内在性Mcm10のみをノックダウンし、欠失変異体が、内在性Mcm10のノックダウンに伴うS期の遅延を相補するか検討した。Mcm2-7相互作用ドメインを欠く変異体は、内在性Mcm10と同程度の発現量では相補できなかったが、数十倍過剰発現させることにより、内在性Mcm10の機能を相補できた。また、種を超えて保存されている領域(200-487)のみでも、内在性Mcm10の十倍程度過剰発現させることにより、機能を相補できた。一方、種を超えて保存されている領域を欠く変異体は、数十倍過剰発現させても機能を相補できなかった。以上の結果から、Mcm10の本質的な機能に重要なのは、種を超えて保存されている領域であり、Mcm2-7複合体との相互作用ドメインは、Mcm10を複製の場へリクルートする際に補助的な役割を果たしている可能性が示唆された。

### 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10件)

① Izumi, M. and Tsukada, T. Enhancement of radiosensitivity by trichostatin A (TSA) after heavy-ion irradiation in human cancer cells. RIKEN Accel. Prog. Rep., in press.

② Izumi, M. (2010) The effects of trichostatin A on DNA damage response after X-ray irradiation in human cells. RIKEN Accel. Prog. Rep., 43, 275.

③ Shibukawa, T., Hayashi, Y., Hirano, T., Kazama, M., Izumi, M., and Abe, T. (2010) Effect of X-ray irradiation on the expression of DNA-repair-related genes in rice. RIKEN Accel. Prog. Rep., 43, 276.

④ Tomita, M., Tsukada, T., and Izumi, M. (2010) Cell-killing effect of low dose of high-LET heavy ions (II). RIKEN Accel. Prog. Rep., 43, 280.

⑤ Izumi, M. (2009) Trichostatin A facilitates the phosphorylation of histone H2AX after X-ray irradiation in normal human fibroblast. RIKEN Accel. Prog. Rep., 42, 275

⑥ Tomita, M., Tsukada, T., and Izumi, M. (2009) Cell-killing effect of low dose of high-LET heavy ions (II). RIKEN Accel. Prog. Rep., 42, 276

⑦ Takagi, K., Tsukada, T., Izumi, M., Kazama, Y., Hayashi, Y., and Abe, T. (2009) Gamma-H2AX foci formation after argon beam irradiation to the cultured animal cell. RIKEN Accel. Prog. Rep., 42, 274.

⑧ Izumi, M. and Tsukada, T. (2008) DNA damage response after heavy-ion irradiation in mammalian quiescent cells. RIKEN Accel. Prog. Rep., 41, 219.

⑨ Tomita, M., Tsukada, T., and Izumi, M. (2008) Cell-killing effect of low dose of high-LET heavy ions. RIKEN Accel. Prog. Rep., 41, 220.

⑩ Yoshioka, K., Amino, M., Furusawa, Y., Izumi, M., Tsukada, T., (2008) Antiarrhythmic effect of single heavy-ion irradiation on diseased canine heart. RIKEN Accel. Prog. Rep., 41, 222

[学会発表] (計3件)

① 泉雅子、柳憲一郎、水野武、杉村和人、今本尚子、奥村克純、花岡文雄「ヒトMcm10の機能ドメインの解析」第33回分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 (2010年12月、神戸)

② 泉雅子、柳憲一郎、水野武、杉村和人、今本尚子、奥村克純、花岡文雄「Analysis on the functional domains of Mcm10 in mammalian cells」第32回日本分子生物学会

年会 (2009年12月11日、横浜)

③ 泉雅子、柳憲一郎、水野武、今本尚子、花岡文雄「複製開始反応におけるヒトMcm10の機能解析」第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 (2008年12月9~12日、神戸)

[その他]

ホームページ:

[http://www.nishina.riken.go.jp/newcontents/contents/about/research\\_group.html](http://www.nishina.riken.go.jp/newcontents/contents/about/research_group.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

泉 雅子 (IZUMI MASAKO)

独立行政法人理化学研究所・生物照射チーム・専任研究員  
00280719

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し

以上