

令和 6 年 6 月 23 日現在

機関番号：25503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06560

研究課題名(和文) 高リスク型ゲノム構造によるゲノム蛋白群の動的集合と機能制御

研究課題名(英文) Structure-function relationship of nucleo-protein machinery on specific genome

研究代表者

川上 広宣 (Kawakami, Hironori)

山陽小野田市立山口東京理科大学・薬学部・准教授

研究者番号：50403952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：複製開始タンパクORCの非典型DNA構造による制御を詳細に解析し、非典型DNA構造とORCとの結合特異性や、制御に関する特異的核酸構造に関する新たな知見を見出した。並行して、ORCの一本鎖結合能を試験管内で詳細に解明する生化学的手法を開発し、一本鎖結合能に関する知見を得た。ORCの遺伝学的に相互作用する遺伝子の探索を行い、その過程でゲノムクローン内の複数の遺伝子がORCの最大サブユニットOrc1と直接的または間接的に協調して出芽酵母細胞の増殖阻害に関わることを示唆する知見を得た。ORCのゲノミクスのな共同在部位(Genes Cells 2019)を精査し、新たなin silicoの知見も得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

代表者独自のORC解析基盤を発展させることで、ORCのDNA結合能に関する特性や機能構造に加え、細胞内における結合能に関する新概念や発展性を示唆する可能性が提起された。これらの成果は、蛋白質とDNAとの結合メカニズムや制御という根本的問題の理解において重要な内容を含むことに加え、当該メカニズムの普遍性と多様性の理解をもたらすものと思われる。以上を踏まえ、当初の目的を十分達成することができたと判断した。

研究成果の概要(英文)：The regulation of the replication initiator protein ORC by atypical DNA structures was analyzed in detail and new insights into the specificity of the binding ability of atypical DNA structures to ORC were found. In parallel, a biochemical method to elucidate the single-strand binding ability of ORC in detail in vitro was established. We also searched for genes that interact genetically with ORC, and during the course of this study, we obtained findings suggesting that multiple genes within a genomic clone cooperate directly or indirectly with the largest subunit Orc1 to inhibit the growth of budding yeast cells. Genomically co-localization sites with ORC (Genes Cells 2019) were further analyzed in detail and novel in silico findings were obtained.

研究分野：生物学

キーワード：染色体複製 ORC 機能構造解析 DNA結合 高次複合体形成 Cdc6

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA の二重鎖が一本鎖化したり、R ループとなることは、複製や転写などの細胞イベントと共役した普遍的プロセスである。真核細胞の一本鎖 DNA は RPA 蛋白により保護され、R ループは複数の経路により解消される。これらの機構が破綻すると、がん化や染色体異常の原因となる。ゲノムの安定性という観点からは一本鎖 DNA や R ループをそもそも作らない仕組みである方が有益であるが、細胞があえて生じた一本鎖 DNA を保護し、R ループを作った後に解消するという複雑な機構を選択した理由は未解明である。

代表者は、複製起点二重鎖 DNA と結合して複製を開始する ORC 複合体の機能構造解析を加速するフレームワークを確立している (Structure 2012; Nat. Struct. Mol. Biol. 2013; Sci. Rep. 2015; Front. Microbiol. 2016)。すでに、この解析システムを用い、出芽酵母 ORC が二重鎖でなく一本鎖 DNA 上で特異的に重合し、ATPase 機能を促進することを見いだしている (Genes Cells 2019)。ADP 存在下では ORC が複製起点と結合しないため、染色体上の一本鎖 DNA が ORC 機能を負に制御する足場となる可能性がある。一方、ORC の一本鎖結合能の特性や細胞内における意義についての実験的証拠が不明瞭である。また、ORC の一本鎖結合が他のタンパク質に及ぼす影響についても未解明である。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず ORC の一本鎖結合能の特性を知り、ORC の一本鎖結合に必要な機能構造を同定することで ORC の一本鎖結合が機能する染色体領域を推定することを第 1 の目的とした。次に ORC の一本鎖結合にかかる制御因子を探索することを第 2 の目的とした。次に、更に、ORC 以外の蛋白質における一本鎖結合の新たな意義について知ることを第 3 の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1)野生型 ORC 6 量体の精製と DNA 結合能の解析

代表者の確立した ORC の高速精製法 (Front. Microbiol. 2016) を用いて出芽酵母 ORC 6 量体を 293T 細胞中から高速精製した。精製した ORC と Cy5 標識した DNA を混ぜてインキュベートし、EMSA を行うことで DNA 結合能を評価した。

### (2)ORC の個々のサブユニット一本鎖結合能測定法の確立

ORC サブユニットを個々に多量生産し、アフィニティ精製を行った。

### (3)ORC の制御因子の遺伝学的探索

ORC の一本鎖 DNA 上での機能制御に関わるモチーフ(Genes Cells 2019)の変異株を用いて表現型を抑圧するマルチコピーサプレッサーを探索した。併行してこの変異株の抑圧変異株も探索した。このうち、(2)の安定的な変異株においては、ゲノムライブラリーを導入することで再び致死となることを指標として、抑圧変異の同定を試みた。なお、eos 変異株は致死となるため、安定培養のため条件致死化した株を用いてある。

### (3)ゲノミクス解析

出芽酵母のリファレンスゲノムならびに、ORC と種々の DNA 結合蛋白質の ChIP-seq データを用いて共局在解析を行い、ORC ならびにそれらの DNA 結合タンパク質がゲノムの特異的領域で一本鎖結合能を持ちうるか検証した。

### (4)研究体制

代表者は以下の所属先で研究を遂行した。

- ・令和 2～5 年度

山陽小野田市立山口東京理科大学薬学部

准教授

## 4. 研究成果

まず代表者は、非典型 DNA 構造の ORC 制御における役割を解析するため、非典型 DNA と ORC との結合能を、精製蛋白質を用いた試験管内再構成系(Kawakami et al., 2015 他)で詳細に解析した。その結果、従来非特異的とされていた一本鎖 DNA と ORC との結合能がより特異性を持つことを示唆する知見を得た。我々の情報解析では一本鎖 DNA と ORC とが特異的なゲノム部位で結合することを示唆しており(Genes Cells 2019)、今回の生化学的知見は上述の我々の報告とよく整合している。

次に、解析対象となる一本鎖 DNA の種類を拡張した解析を進めた。その結果、ORC の一本鎖 DNA との結合能を制御する特異的核酸構造を見いだした。この核酸構造は細胞内において存在しうる構造であるため、細胞内において同様の制御機構が存在することを示唆するのかもしれない。

並行して、ORC の一本鎖結合能を試験管内で詳細に解明するため、ORC サブユニットのサブ

ユニットごとの活性を試験管内で簡便に解析する方法を開発し、個別解析のための基盤を概ね整備した。その結果、ORC の特定のサブユニットが、ORC の一本鎖結合能と独立していることを明らかにした。

次に、一本鎖結合に関して遺伝学的に相互作用する遺伝子の探索を行った。まず一本鎖結合に依存して ORC の機能制御をするモチーフ EOS (Genes Cells 2019) を遺伝学的に亢進する遺伝子を探索するため、eos 変異株のマルチコピーサプレッサーを探索すると、有望な遺伝子クローンを同定する頻度よりも、マルチコピープラスミドのベクター領域が eos 変異株内で欠失したり、eos 変異株ゲノム内の自然突然変異によって抑圧するケースの方が顕著に見られた。ゲノムライブラリーの特性をふまえると、単独の遺伝子の多コピーではなく、複数の遺伝子の多コピー化が必要なかもしれない。

そこで、EOS を遺伝学的に抑制する遺伝子を探索するため、eos 変異株ゲノム内の自然突然変異による抑圧変異を探索したところ、出芽酵母細胞の増殖制御に関わるゲノムクローンを見出すことに成功した。うち一例は、ゲノムクローン内に複数の独立した染色体由来断片を含むことが判明した。また、遺伝学的解析の結果、ゲノムクローン内の複数の遺伝子が ORC の最大サブユニット Orc1 と直接的または間接的に協調して出芽酵母細胞の増殖阻害に関わることが示唆された。ORC の一本鎖結合能が今回見出した増殖阻害にどのように関わるかが今後の重要なカギと期待される。

なお、ORC と一本鎖結合蛋白とのゲノミクス的な共局在部位(Genes Cells 2019)は、従来二重鎖 DNA 結合能が報告されているタンパク質 X がゲノミクス的に共局在するホットスポットとなっていることが判明した。タンパク質 X の機能にこれらのホットスポット部位が何らかの役割を果たすと想像すると興味深い。

以上をまとめると、代表者独自の ORC 解析基盤を発展させることで、ORC の一本鎖結合能に関する特性や機能構造に加え、細胞内における一本鎖結合能の制御の可能性という新概念やその他のタンパク質の関わりも示唆する可能性が提起された。これらの成果は、蛋白質と DNA との結合メカニズムや制御という根本的問題の理解において重要な内容を含むことに加え、当該メカニズムの普遍性と多様性の理解をもたらすものと思われる。以上を踏まえ、当初の目的を十分達成することができたと判断した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小畑 綾夏、岡崎 夢歩、島田 瞭大、篠原 久明、川上 広宣
2. 発表標題 出芽酵母ORC を制御する因子の探索システムの確立
3. 学会等名 九州大学西風塾研究発表会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 出芽酵母ORCの機能分化スイッチを標的としたマルチコピーサプレッサーの探索
2. 発表標題 小畑綾夏、岡崎夢歩、篠原久明、川上広宣
3. 学会等名 令和3年度九州大学西風塾研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上 広宣、栗原 拓也、川畑 健太、千々布 壮陽、村岡 龍哉、大橋 英治、荒木 弘之、釣本 敏樹、片山 勉
2. 発表標題 一本鎖DNAと出芽酵母における複製開始蛋白との連係機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会シンポジウム2S07e「ゲノム反応中間体としての非B型核酸：その構造と生物学的意義」（オーガナイザー：川上広宣、正井久雄）（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡崎夢歩、小畑綾夏、島田瞭大、片山勉、堀江一郎、篠原久明、川上広宣（発表者）
2. 発表標題 出芽酵母ORCの一本鎖結合・制御動態の解明に向けて
3. 学会等名 第27回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡村康平、井山浩気、上松大佑、服部祐里香、堀江一郎、篠原久明、川上広宣
2. 発表標題 ORC結合性ssDNAの出芽酵母細胞内からの精製
3. 学会等名 九州大学西風塾研究合宿2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡崎夢歩、小畑綾夏、島田瞭大、堀江一郎、篠原久明、川上広宣
2. 発表標題 出芽酵母の増殖を相加的に制御するゲノム断片
3. 学会等名 九州大学西風塾研究合宿2023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小畑綾夏、岡崎夢歩、島田瞭大、堀江一郎、篠原久明、川上広宣
2. 発表標題 出芽酵母ORCを正負に制御する遺伝子の遺伝学的探索
3. 学会等名 九州大学西風塾研究合宿2023
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

川上 広宣   山陽小野田市立山口東京理科大学 <a href="http://www.socu.ac.jp/departments/faculty/hironori-kawakami.html">http://www.socu.ac.jp/departments/faculty/hironori-kawakami.html</a> 川上 広宣 (Hironori Kawakami) - マイポータル - researchmap <a href="https://researchmap.jp/read0091781/">https://researchmap.jp/read0091781/</a> Hironori Kawakami - Google Scholar Citations <a href="https://scholar.google.co.jp/citations?user=Cij641QAAAAJ">https://scholar.google.co.jp/citations?user=Cij641QAAAAJ</a>
--

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