

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 4 月 14 日現在

機関番号：32670

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2009～2011

課題番号：21657045

研究課題名（和文）動物ゲノム複製開始点における RNA の新規機能の探求

研究課題名（英文）A novel role of RNA in the function at the replication origins in animal cells

研究代表者

和賀 祥 (WAGA SHOU)

日本女子大学・理学部・教授

研究者番号：60222402

研究成果の概要（和文）：

遺伝子の本体である DNA を複製するという生体反応は細胞増殖に必要な過程の中でも特に重要なものの 1 つである。本研究では、動物細胞における DNA 複製の開始で働く ORC というタンパク質複合体の機能解析を進めた。特に新規機能である RNA 結合活性に着目した解析を進めた結果、RNA 結合活性が GU-rich RNA に特異的であること、その結合活性が ORC 複合体を構成する ORC1 サブユニットに存在することを明らかにした。さらに、ORC1 の中の RNA 結合ドメインの存在を初めて明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

DNA replication is one of the fundamental processes that are required for cell proliferation. We studied the details of activities of ORC, which is one of the proteins that function during the initiation of DNA replication in eukaryotes. We especially focused on the RNA binding activity of human ORC and found that the activity is specific for GU-rich RNA and that at least the ORC1 subunit has the RNA binding activity. Moreover we succeeded in identifying a specific domain for RNA binding activity in the ORC1 protein.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	0	1,300,000
2010年度	900,000	0	900,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	270,000	3,370,000

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、ORC、非コード RNA

1. 研究開始当初の背景

DNA の複製は、染色体 DNA 上に散在する複製開始点から始まる。大腸菌や酵母では、複製開始点が特定の塩基配列によって規定されるのに対し、多細胞生物の複製開始点を決めるような共通配列は存在せず、ゲノム上で複製開始点が特定の領域に規定される仕

組みは明らかではない。一方、複製開始点で働くタンパク質については研究が進んでいて、特に複製開始で重要なタンパクとして ORC が知られていた。しかし、ORC は複製開始点で機能するものの、DNA 結合に関して塩基配列特異性はなく、どういう仕組みで複製開始点に ORC がリクルートされるのか、

その仕組みは明らかではない。

私はこの点を解明することを目標に、我々が見出した ORC の RNA 結合という新規活性に着目した研究に着手することとした。この活性の詳細を明らかにし、さらにその生物学的な意義を明らかにすることによって、ヒト ORC の複製開始点へのリクルート機構、そしてゲノムでの複製開始点の形成機構の解明に結びつききっかけが得られることが期待された。

2. 研究の目的

以下の点を期間内に明らかにすることを目的に研究を進めた。

- (1) ORC の RNA 結合が ORC の機能に及ぼす影響を詳細に明らかにする。
- (2) 細胞内の ORC が結合している RNA を単離し、その cDNA をクローニングして、その詳細を明らかにする。
- (3) ORC 結合性 RNA と複製開始点との間に何らかの関係がないかを探る。
- (4) アフリカツメガエル初期胚の発生段階における複製開始点の形成密度の現象と特定化に、ORC 結合 RNA が関与していないかを探る。

3. 研究の方法

細胞内の ORC 結合性 RNA を探索する上で、ORC の RNA 結合の性質の詳細に明らかにすることは重要である。そこで私は組換え体ヒト ORC 調製し、主に *in vitro* での以下のような解析を進めた。

- (1) 蛍光標識 RNA をプローブとしたゲルシフト法によるヒト ORC と RNA との結合の解析。EBNA1 の RNA 結合の特異性を参考にして、40 mer の GU-rich RNA をプローブとしたゲルシフト法による解析を進めた。さらに、様々な配列をもつ RNA や DNA をコンペティターとした競合実験を行い、RNA 結合の特異性を調べた。
- (2) 環状プラスミドを固定化したマグネティックビーズを用いて、DNA への ORC 結合に対する RNA の有無の影響を調べた。
- (3) ORC を構成する 6 種のサブユニットのうち、ORC1 に着目し、その RNA 結合活性の有無を調べた。
- (4) ORC1 サブユニットの様々な変異タンパクを調製し、その RNA 結合活性を調べることによって、ORC1 中の RNA 結合ドメインの同定を目指した。

4. 研究成果

上記の方法によって ORC の RNA 結合に関する解析を進めた結果、以下のことを明らかにすることができた。

(1) ヒト ORC が GU-rich な配列の RNA に優先的に結合することが分かった。ORC と RNA との複合体に含まれる ORC サブユニットを解析した結果、少なくとも ORC1~ORC5 が含まれることが示唆された。この結果は、初めてヒト ORC が RNA 結合活性を有することを証明するものである。

(2) ORC の RNA 結合に関する競合実験によって、40-mer の長さの RNA や DNA の間で結合親和性を比較した結果、これまでに高い結合親和性を示すことが知られていた AT-rich の DNA よりも、GU-rich RNA の方により高い親和性を示すことが分かった。

(3) プラスミド固定化ビーズへの ORC の結合の解析において、あらかじめプラスミドビーズと合成 RNA ポリマーである poly G とをプレインキュベートすると、プレインキュベートしない場合と比較して、顕著にビーズへの ORC 結合量が増加した。この結果は、DNA と RNA との直接の相互作用によって、例えば DNA-RNA 三重鎖構造のような特殊な構造が形成され、それが ORC の格好の結合の標的構造になっている可能性を示す。

(4) ORC1 サブユニットに GU-rich RNA に優先的に結合する活性があることが明らかとなった。

(5) ORC1 サブユニットの中に、RNA 結合に直接関わる特定の領域があることが分かった。その領域は、既知のドメインである AAA+ ドメインや BAH ドメインとは異なる領域であった。

前述のとおり、ORC の複製開始点へのリクルート機構は未だ明らかではない。本研究で明らかになった ORC の RNA 結合という新規活性は、この機構に関与している可能性がある。この点で、本研究の成果は今後当該分野での研究のブレークスルーを引き起こす可能性をもつと考えている。

この ORC の RNA 結合が複製開始点へのリクルート機構と密接な関わりをもつと考える根拠として以下の3つがある。1つ目は、ヒト細胞内で DNA の複製が行われる EB ウイルスの複製開始点に関する研究から明らかになったことである。このウイルス性複製開始点へ ORC がリクルートする際には、その複製開始点に特異的に結合するウイルス性複製因子である EBNA1 が必要であるが、その EBNA1 が RNA 結合活性を持ち、さらにその活性が ORC リクルートに重要であると考えられている。

2つ目は、テトラヒメナの ORC の一部は短鎖 RNA を結合させており、その RNA は相補的な配列をもつ DNA 領域に ORC をリクルートする仕組みに関わると考えられていることである。そして3つ目は、近年、DNA-RNA ハイブリッドが特定のタンパク

質の結合の標的になっている例が報告されていることである。この最後の点は、本研究で明らかになった ORC の DNA 結合への RNA プレインキュベーションの効果と密接な関係があると考えている。

これまでのところ、ORC の RNA 結合に着目した研究は、世界でもほとんど行われていない。この点で、本研究は独創的である。2011 年の秋に本研究の成果を、米国のコールドスプリングハーバー研究所の DNA 複製に関するミーティングで発表した際も、本研究以外に複製開始点への ORC のリクルート機構に関する新しいモデルを提示した発表は無かった。この点からも、本研究は当該分野でリードする研究であると考えている。

しかし一方で、これまでの本研究では行った解析のほとんどが *in vitro* での解析である。本研究を開始してすぐに細胞内での ORC 結合性 RNA の同定を目指した解析を進めたが、有効な結果を得ることはできなかった。しかし、現在は ORC の RNA 結合に関するさらに詳細な知見が得られたため、その知見を利用して、再度、細胞内に存在する ORC 結合性 RNA の同定を目指した研究を進める必要があると考えている。

この ORC 結合性 RNA に関しては、英国ケンブリッジ大の Krude 博士が、Y-RNA という非コード RNA が複製開始に関わるという可能性を示している。この Y-RNA の生理的な機能についてはまだ不明な点が多いが、ORC が Y-RNA に結合するかどうかは大変興味を持たれる点である。今後、Krude 博士との共同研究を通じて、この点を明らかにしていきたい。

今後は、ORC の RNA 結合の生理的な役割を明らかにすることを目標に、ORC の RNA 結合ドメインの構造生物学的な解析、細胞を使った細胞生物学的なアプローチなどを利用した多角的な解析を進め、目標の達成を目指していく。

今後の研究の進展によっては、この研究成果は当該分野のみならず、発生や細胞分化・脱分化の理解そして細胞増殖の調節と関わる創薬にも貢献することが期待される。

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 5 件)

1. Lena R. Kundu et al. (11 名、6 番目) (査読あり) Biphasic chromatin binding of histone chaperone FACT during eukaryotic chromatin DNA replication. *BBA-*

Molecular Cell Research, 1813, 1129-1136 (2011).

2. Lena R. Kundu et al. (10 名、6 番目) (査読あり) Deregulated Cdc6 inhibits DNA replication and suppresses Cdc7-mediated phosphorylation of Mcm2-7 complex. *Nucleic Acids Res.*, 38, 5409-5418 (2010).

3. Christopher Van, Shan Yan, W. Matthew Michael, Shou Waga and Karlene A. Cimprich. (査読あり) Continued primer synthesis at stalled replication forks contributes to checkpoint activation. *J. Cell Biol.*, 189, 233-246 (2010).

4. Daichi Ogawara et al. (9 名、7 番目) (査読あり) Near-full-length REV3L appears to be a scarce material factor in *Xenopus laevis* eggs that changes qualitatively in early embryonic development. *DNA Repair*, 9, 90-95 (2010).

5. Nozomi Sugimoto, Kazumasa Yoshida, Yasutoshi Tatsumi, Takashi Yugawa, Mako Narisawa-Saito, Shou Waga, Tohru Kiyono and Masatoshi Fujita. Redundant and differential regulation of multiple licensing factors ensures prevention of replication in normal human cells. *Journal of Cell Science*, 122, 1184-1191 (2009).

[学会発表] (計 10 件)

1. 保科祥子. ヒト ORC1 の RNA 結合における塩基配列特異性および RNA 結合領域の解析. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 13 日-16 日、パシフィコ横浜)

2. 星野宏味. 複製開始因子・転写抑制因子 AIF-C2 の RNA 結合ドメインの解析. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 13 日-16 日、パシフィコ横浜)

3. 保科祥子. ヒト ORC1 の RNA 結合における塩基配列特異性および RNA 結合領域の解

析. 第 21 回 DNA 複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ (2011 年 10 月 25 日-27 日、サンピア福岡)

4. 星野宏味. 複製開始因子・転写抑制因子 AIF-C2 の RNA 結合ドメインの解析. 第 21 回 DNA 複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ (2011 年 10 月 25 日-27 日、サンピア福岡)

5. Shou Waga. Possible roles of RNA in origin selection through two distinct mechanisms involving direct interactions of RNA with DNA, a transcription factor and human origin recognition complex.

Cold Spring Harbor Laboratory Meeting for eukaryotic DNA replication and genomic maintenance. (Sept. 6-10, 2011, Cold Spring Harbor, NY, USA)

6. Noriko Kiyasu. Possible involvement of RNA in recruiting the origin recognition complex to the viral and cellular replication origins. 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 7 日-10 日 (神戸ポートアイランド)

7. 保科祥子. ヒト ORC の RNA 結合における塩基配列特異性および ATP 依存性の解析. 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 7 日-10 日 (神戸ポートアイランド)

8. Noriko Kiyasu. Possible direct involvement of RNA in recruiting the origin recognition complex to the viral and cellular replication origins. 第 32 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 9 日 - 12 日 (パシフィコ横浜)

9. 和賀 祥. EB ウイルス複製開始点 oriP における複製開始複合体形成への RNA の関与.

第 82 回日本生化学会大会 2009 年 10 月 21 日-24 日 (神戸ポートアイランド)

10. Shou Waga. Possible direct involvement of RNA regulating the function and establishment of metazoan replication origins. Switzerland-Japan joint meeting on the molecular mechanisms regulating "Chromosome dynamics and genomic stability". (May 14-16, 2009, Villars-sur-Ollons, Switzerland)

6. 研究組織

(1) 研究代表者
和賀 祥 (WAGA SHOU)
研究者番号 : 60222402

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
日本女子大学大学院理学研究科
博士課程前期の大学院生 5 名