

## 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25年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570178

研究課題名（和文） 哺乳類細胞の複製工場を構成する因子の基盤の同定と、制御機構の解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism of assembly and control of mammalian replication factories.

研究代表者

水野 武 (MIZUNO TAKESHI)

独立行政法人理化学研究所・今本細胞核機能研究室・専任研究員

研究者番号：30281629

研究成果の概要（和文）：

哺乳類細胞核内の染色体複製の分子機構の解明を目指し、マウス DNA ポリメラーゼ $\alpha$ の細胞内動態を解析した。マウス DNA ポリメラーゼ $\alpha$ をモデルとした解析等を通じて、1)哺乳類細胞の DNA ポリメラーゼ $\alpha$ に特異的阻害剤を開発し、デヒドロアルテヌシンの誘導体の中の一つ C12 が最も強力に特異的にポリメラーゼ $\alpha$ を阻害することを見出した。そのことから leading 鎖と lagging 鎖の合成が不一致したときに異所的な RPA の foci が形成される可能性を考察した。2) ポリメラーゼ $\alpha$ の温度感受性変異体の解析を通じて、核内の異常タンパク質を排除するタンパク質品質管理機構の存在する可能性を示唆し、解析を続けた。3) DNA ポリメラーゼ $\alpha$ と相互作用するテロメア結合因子の解析を通じて DNA ポリメラーゼ $\alpha$ のクロマチンへの loading メカニズムに共通した分子メカニズムの提唱にいたった。

研究成果の概要（英文）：

To understand molecular mechanism of mammalian DNA replication, I have focused on mouse DNA polymerase alpha. According to extensive analysis of DNA polymerase alpha,

1) we developed a novel potent inhibitor for mammalian DNA polymerase alpha, from derivatives of dehydroaltenusin. Using this novel inhibitor, we discussed that uncoupling of leading strand synthesis and lagging strand synthesis caused aberrant RPA foci in mammalian nucleus in NIH3T3 cells. 2) Characterization of temperature-sensitive mutant cell line which has mutation in DNA polymerase alpha, suggested novel nuclear protein quality control mechanism to eliminate aberrant proteins from nucleus. In this quality control mechanism involves HSP90 and PA28gamma. 3) Interaction between DNA polymerase alpha and pot1 revealed intrinsically disordered region of DNA polymerase alpha serves as molecular binding site for chromatin binding protein which contains typical OB-fold containing proteins such as RPA, Mcm10, pot1, CST complex.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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 ポリメラーゼ $\alpha$ 、染色体複製、ポリメラーゼ $\alpha$ 特異的阻害剤、デヒドロアルテヌシン、複製工場、

### 1. 研究開始当初の背景

哺乳類細胞の核内の染色体複製機構の実態は今でもよくわかっていなかった。一方、複製因子が核内で foci を形成し、複製工場において染色体が複製されると提唱されてきたが、その複製工場にはどのような因子が含まれ、どのように制御されているのか、研究は進んでいなかった。しかも複製工場には複製ヘリカーゼの最有力候補 MCM2-7 複合体は共局在せず Mcm パラドックスと呼ばれ、未だ解明されていない。そこで複製装置の中核に位置する3種類の $\alpha$ 型 DNA ポリメラーゼ ( $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) と複製ヘリカーゼ Mcm2-7 の核内動態に着目し、染色体複製の分子機構の解明を目指した。

### 2. 研究の目的

1) ポリメラーゼ $\alpha$ 特異的阻害剤や Mcm ヘリカーゼ特異的阻害剤を核内に導入し、DNA ポリメラーゼ $\alpha$ /Mcm10/PCNA/Mcm3 等の核内局在部位を観察し、複製工場のスナップショットに着目することで、動態を明らかにする。さらに leading 鎖、lagging 鎖の合成の uncoupling やポリメラーゼヘリカーゼの

uncoupling を誘起させた際の複製工場の形成の崩壊と再形成を RPA の異所的 foci を指標に調べ可塑性について検証する。2) DNA ポリメラーゼ $\alpha$ の温度感受性変異体細胞の観察を通じて、細胞核内のポリメラーゼ $\alpha$ の動態を解明する。3) テロメア結合蛋白質とポリメラーゼ $\alpha$ の相互作用をモデルとして、ポリメラーゼ $\alpha$ のクロマチンへの loading メカニズムを明らかにする。

### 3. 研究の方法

DNA ポリメラーゼ $\alpha$ に特異的阻害剤はかつて開発されていなかったため、ポリメラーゼ $\alpha$ を特異的に阻害するデヒドロアルテヌシンと脂肪酸を融合させた誘導体を合成し、阻害効果を比較した結果炭素鎖数12の脂肪酸を付加した誘導体が最も強固にポリメラーゼ $\alpha$ を阻害した。この誘導体を細胞核に Hypotonic shift 法により導入し、細胞の応答を観察した所、異所的な RPA の foci が観察した。

温度感受性変異体 tsFT20 の制限温度下でのポリメラーゼ $\alpha$ を詳細に観察した。制限温度下で構造異常を来したポリメラーゼ $\alpha$ が

核の中で速やかに分解されることが判明した。この分解を阻害する低分子化合物を探索した結果分子シャペロンの阻害剤が分解を抑制することを見出した。さらに、分解系に働く因子を絞り込む為に免疫沈降法により HSP90 に阻害剤存在下で相互作用する核内因子を検索した。

ポリメラーゼ  $\alpha$  がどのようにクロマチンに結合するかを明らかにする為にポリメラーゼ  $\alpha$  に結合するタンパク質間相互作用を解析した。

#### 4. 研究成果

哺乳類細胞の複製工場の形成とその制御機構を理解する為にまず DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の動態の解析を進め、1) 複製フォークの進行阻害に伴う細胞核の応答や、2) 異常なポリメラーゼ  $\alpha$  を排除する品質管理機構の存在の分子メカニズムの一端を明らかにした。さらに3) ポリメラーゼ  $\alpha$  のクロマチンへの loading 機構を一般化して理解し得る為のモデル系としてテロメアへの loading において重要となる pot1 との相互作用の詳細を明らかにした。

1) DNA ポリメラーゼ活性阻害剤の大部分は細胞膜を透過できず、細胞への影響を測定することは従来困難であった。細胞膜を透過しにくい低分子化合物を細胞に取り込ませ細胞への影響を検出するために、低調液に細胞をさらすことにより、低分子化合物を強制的に培養細胞内に取り込ませるといふ、hypotonic shift 法に着目した。Hypotonic shift 法によりマウス NIH3T3 細胞へ DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の阻害剤や、蛍光標識したヌクレオチドアナログを取り込ませる実験系を確立した。DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  に特異的な阻害剤を開発する為に以前から見いだしていた哺乳類細胞由来の DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  を特異的に阻害する微生物由来の代謝物

dehydroaltenusin に着目し、炭素鎖 12 の lauric acid と融合させた誘導体をデザインし、合成した。この誘導体 C12 が最も強力に DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  を阻害することを見いだした。この誘導体 C12 を hypotonic shift 法によりマウス由来の NIH3T3 細胞に取り込ませた。C12 により DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  を阻害すると一本鎖 DNA 結合蛋白質(RPA)の大きな foci が核内で生じることが観察された。lagging 鎖の合成が阻害されたため leading 鎖単独による合成により一本鎖 DNA が暴露したと考えられた。leading 鎖と lagging 鎖の uncoupling を核内で直接検出できたと考えられた。即ち、複製工場と異常な RPA foci の可視化により、核内の複製反応へ影響を及ぼす阻害剤の解析系を確立した。

2) マウス温度感受性変異体細胞(tsFT20)由来の DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の制限温度下で生じる核内動態を徹底的に解析し、その結果、「核内の複製関連因子の品質は厳格に管理されており、核内への移行阻害と既に核内に存在しているタンパク質の核内での分解という二つの異なるメカニズムにより異常タンパク質を核内から排除する機構が存在する」という核内因子の品質管理機構という概念を提唱した(J. Biol. Chem. 2009)。この核内タンパク質品質管理機構の分子メカニズムのさらなる解明を目指した。即ち、どのように異常タンパク質が核内では認識されて、どのように分解されるのかを検討した。マウス NIH3T3 細胞へ tsFT20 由来の変異を持つポリメラーゼ  $\alpha$  触媒サブユニット p180 を一過性過剰発現させた後に制限温度にシフトアップする際に種々の阻害剤を加え、分解を阻害する物質を探索した。その結果、HSP90 の C 末領域の ATPase の阻害剤である novobiocin が p180 の核内分解を抑制することを見出した。さらに novobiocin 存在下で、核内の内在

性 HSP90 とプロテアソーム活性化因子 PA28 gamma が核小体に共局在することを見出した。従って、核内では構造異常を来たしたタンパク質は HSP90 によって認識され、refold された後、核内プロテアソームへ引き渡され、分解されるのではないかと考えられた。以上から、哺乳類細胞の核内には小胞体、細胞質、ミトコンドリア等とは異なるタンパク質の認識・分解系が存在すると示唆された。

3) 真核生物の染色体末端のテロメア DNA は G 塩基に富む反復配列からなり、3' 末端は突出した 1 本鎖 DNA 構造である。テロメア長は細胞の老化・癌化と密接に関連し、テロメア長の調節にはテロメア結合蛋白質とテロメラーゼが関与するが、詳細な分子機構は不明な点が多い。マウステロメア 1 本鎖 DNA 領域に結合する Pot1 蛋白質(mPot1)は、テロメア末端保護とテロメア長の調節に関与する。また、テロメラーゼと DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  は各々テロメア DNA のリーディング鎖とラギング鎖の伸長に関与する。出芽酵母では、テロメア 1 本鎖 DNA 領域に結合する Cdc13 蛋白質が DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  と相互作用することが知られており、マウスでも同様の相互作用が存在するかを検証するために、mPot1 と DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  間の相互作用の可能性を解析した。

まず、大腸菌内で GST-mPot1(314-640) と His-mPol  $\alpha$  (1-330)を組換え蛋白質として発現させ、精製した。精製蛋白質を用いた GST-pull down によって mPot1(314-640) と mPol  $\alpha$  (1-330)が直接的に相互作用することを示した。加えて、円偏光二色スペクトルにより精製した mPol  $\alpha$  (1-330)が天然変性蛋白質であることを示した。

次に、これらの蛋白質の in vivo における相互作用を調べるために、NIH3T3 細胞でテロメア上の mPot1 と DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の共局

在を検討した。mPot1 に対する抗体を精製し、固定前に Triton X-100 を含む溶液で抽出し、細胞核内で mPot1 を観察する最適な条件を求めた。また内在性の mPot1 と DNA ポリメラーゼ  $\alpha$  の相互作用を Proximity ligation assay により観察した。

## 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 1 件)

1. Oshige M, Kawasaki S, Takano H, Yamaguchi K, Kurita H, Mizuno T, Matsuura S, Mizuno A, Katsura S. (2011) Direct observation method of individual single-stranded DNA molecules using fluorescent replication protein A. *Journal Fluorescence*. 21 (3) :1189-1194 査読有り DOI, 10.1007/s10895-010-0797-8

[学会発表] (計 7 件)

1) 第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 11 日-14 日、福岡県、福岡市、哺乳類細胞核内タンパク質品質管理機構は HSP90 と核内のプロテアソームによるタンパク質分解により維持される。Mammalian nuclear protein quality control is mediated by HSP90 and PA28gamma.

水野 武、渋谷麻実、花岡文雄、今本尚子

2) The 8<sup>th</sup> 3R Symposium, Awaji, Hyogo, 25-28<sup>th</sup> Nov. 2012

Intrinsically disordered amino-terminal region of DNA polymerase alpha catalytic subunit is interactive region for other replicative factors.

Takeshi Mizuno, Sae Miyazawa, Masako Izumi,

Fumio Hanaoka, Naoko Imamoto, Hidetaka

Torigoe

3) 第 64 回日本細胞生物学会平成 24 年 5 月

28-31日、神戸市、兵庫県

Nuclear protein quality control mechanism involves HSP90 to eliminate aberrant proteins from nucleus

Takeshi Mizuno, Miwa Higaki, Asami Shibuya, Fumio Hanaoka, Naoko Imamoto

4) 第34回日本分子生物学会年会平成23年12月13-16日、横浜市、神奈川県、Nuclear protein quality control mechanism involves HSP90 to eliminate aberrant proteins from nucleus

Takeshi Mizuno, Miwa Higaki, Asami Shibuya, Motoyuki Shimonaka, Fumio Hanaoka, Naoko Imamoto

5) Cold Spring Harbor laboratory Meeting, Eukaryotic DNA replication and genome Maintenance, 2011 Sept. 6-10, Cold Spring Harbor, New York, USA

Takeshi Mizuno, Ken-ichiro Yanagi, JunGoo Jee, Masahiro Shirakawa, Fumio Hanaoka, and Naoko Imamoto

6) 第9回核ダイナミクス研究会, 伊豆市, 静岡県、2010年5月:細胞核内にて働く品質管理機構の提唱: 水野 武、今本尚子、花岡文雄

7) 3R new frontier in the 3R, 2010, Oct, 26-30, Toyama, Toyama: Structure and Mutagenesis Studies of the C-terminal Region of Licensing Factor Cdt1 Enable the Identification of Key Residues for Binding to Replicative Helicase Mcm Proteins

Takeshi Mizuno, JunGoo Jee, Masahiro Shirakawa and Fumio Hanaoka

[図書] (計2件)

1. Mizuno, T., Kuriyama, I., Takemura, M., Sakaguchi, K., Sugawara, F., Yoshida, H., Mizushina, Y. (2011) Effect of a specific mammalian DNA polymerase  $\alpha$  inhibitor, dehydroaltenusin, on DNA replication in cultured cells. pp67-111, *DNA Replication and Mutation*, Raymond P. Leitner (Ed.) ISBN 978-1-61324-490-6, Nova publisher. 査読無

2. Mizuno T., Izumi M., and Eichinger, C. S. (2011) Quality Control of DNA Polymerase  $\alpha$ , pp205-218, *Fundamental Aspects of DNA Replication*, Jelena Kušić-Tišma (Ed.), ISBN: 978-953-307-259-3, InTech 査読有 DOI: 10.5772/19125

6. 研究組織

(1)研究代表者

水野 武 (MIZUNO TAKESHI)

独立行政法人理化学研究所・今本細胞核機能研究室・専任研究員

研究者番号: 30281629