

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370076

研究課題名(和文)細胞周期とクロマチンによる染色体複製開始制御の統合的理解

研究課題名(英文) Integrated understanding of regulations of DNA replication by cell cycle and chromatin

研究代表者

升方 久夫 (Masukata, Hisao)

大阪大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00199689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,400,000円、(間接経費) 4,620,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム全域を1細胞周期当たり1度だけ完全に複製するために、DNA複製の開始反応は巧妙に制御されている。分裂酵母を用いて複製開始反応段階が細胞周期とクロマチン構造によって制御されるしくみを分子レベルで解析した。その結果、細胞周期制御キナーゼCDKが複製因子の集合過程に果たす役割を解明し、オーキシテグロン法による特異的蛋白質分解系を用いて複製開始の最終段階でのMcm10の働きを明らかにした。いっぽう、染色体上に多数存在する複製開始点の活性化時期を決定するしくみに、テロメア類似配列とテロメア結合蛋白質が重要な役割を果たすことを発見し、これらの結果を評価の高い国際誌に発表した。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular mechanisms how initiation of DNA replication is regulated by cell cycle and chromatin structures using model organism fission yeast. We found that phosphorylations of multiple replication factors, Sld3 and Drc1, by cell cycle master kinase CDK are crucial to trigger assembly of replication factors at replication origins. We further discovered the role of Mcm10 after assembly of replication factors to initiate actual DNA synthesis. In approach to elucidate the replication timing program, we discovered that telomere-repeat sequence is located near the late-replicating origins and the telomere-binding proteins are involved in replication timing program. These findings are published on high-quality international journals.

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 細胞周期 クロマチン テロメア 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

生命が遺伝情報を安定に継承するためには DNA を正確に複製することが必須である。真核生物では染色体上に多数ある複製開始点で複製開始因子の分子集合が多様かつ包括的に制御されていることが特徴である。このために細胞周期とクロマチンにより複製開始時期が制御されているが、具体的制御メカニズムは明らかでない。G1 期で複製ライセンス化 (pre-replicative complex; pre-RC) された複製開始点が S 期で活性化される反応は未解明の部分が多い。とりわけ Dbf4 依存キナーゼ (DDK) 依存的に複製開始点に Sld3 が結合する (Yabuuchi et al, EMBO J, 2006) が、そのしくみは不明である。いっぽうクロマチンによる複製制御については、一般的に複製因子の DNA へのアクセス能がクロマチン構造によって制御されると考えられているが、具体的事実が欠如しており本質的理解は十分ではない。

2. 研究の目的

生命が遺伝情報を安定に継承するためには DNA を正確に複製することが必須である。真核生物では染色体上に多数ある複製開始点で複製開始因子の分子集合が多様かつ包括的に制御されていることが特徴である。このために細胞周期とクロマチンにより複製開始時期が制御されているが、具体的制御メカニズムは明らかでない。本研究では、高等動物に類似したクロマチン構造を持ち、全複製開始点が同定されているために網羅的解析が可能な分裂酵母を用いて、局所的・包括的制御を可能にする複製ファクトリーを同定し、クロマチン・細胞周期により制御される複製開始ステップを解明することにより、染色体複製の時間的・空間的制御メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) CMG ヘリカーゼ活性化機構の解析: Mcm10 が CMG ヘリカーゼ活性化に必須の機能を果たすという結果に基づき、保存されている zinc-finger モチーフや OB-fold へのアミノ酸置換 Mcm10 をデグロン株で発現させ、こ

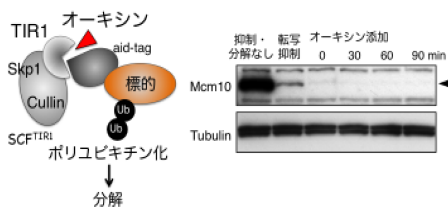


図 1. AID法によるタンパク質分解誘導

れらのモチーフが CMG ヘリカーゼ活性化に必要であるか解析する。変異 Mcm10 を大腸菌で発現精製し、複合体形成や DNA 結合活性を解

析し、CMG ヘリカーゼ活性化反応機構を解明する。

(2) DNA ポリメラーゼ の非触媒必須機能の解明: 複製フォークでリーディング鎖合成を担う DNA ポリメラーゼ の触媒サブユニット Cdc20 は生存に必須である。しかし N 末端ポリメラーゼドメインは生存に必須ではないため、CTD が非触媒的必須機能を果たすと考えられる。温度感受性変異やオーキシングロン法を用いて、CTD の必須機能を解明する。

(3) 複製タイミング制御におけるテロメア結合因子の役割の解明: テロメア結合タンパク質 Taz1 は、染色体腕部の後期複製開始点近傍に結合し複製タイミングを制御する。Taz1 以外にも Rif1, Rap1, Ccq1, Poz1 などのテロメア因子が複製タイミングに影響を及ぼすが、その役割は不明である。これらの因子の強制発現やオーキシングロンによる一過的消失株、染色体末端テロメア喪失株を用いて、テロメア結合因子とテロメア DNA の相互の関係を解析する。

(4) サブテロメア複製開始制御の機構と意義の解明: 100 kb 以上に広がるサブテロメア領域の複製は非常に遅い時期まで抑制されている。この制御のしくみを明らかにするために、Taz1 ならびに他のテロメア結合因子の局在、サブテロメア領域の核内局在部位、テロメア末端 DNA の必要性を解析する。また DDK を強制的にサブテロメア領域に tether することや、Taz1 の特異的変異によりサブテロメア複製タイミングを早めたときにテロメア長制御が維持されるかを解析し、複製タイミング制御の意義を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 細胞周期による複製開始制御を理解するため、Sld3 と Drc1/Sld2 が細胞周期の S 期でリン酸化されることから、これらの CDK リン酸化部位を質量分析法により同定した。リン酸化受容アミノ酸の置換変異の解析から、これらのリン酸化が複製開始に必須であることを示した。酵母 Two-hybrid 法を用いた解析から、Sld3, Drc1 のリン酸化が Sld3-Cut5-Drc1 複合体形成に必要であり、分裂酵母内では、これらの因子の複製開始点結合に必要であることを示した (Fukuura et al, 2011)。

(2) 複製開始における Mcm10 の必須機能については諸説まちまちであり不明であった。新規開発のオーキシングロン法を用いて Mcm10 の機能を解析した結果、Mcm10 は CMG 複合体に依存して複製開始点に結合し、複製開始点の unwinding に機能することを示した (Kanke et al, 2012)。

(3) 興味深いことに、複製フォークでリーディング鎖合成を担う DNA ポリメラーゼ (イプシロン) の触媒サブユニット Cdc20 の N 末端ポリメラーゼドメインは生存に必須ではないが、C 末端領域 CTD は必須である。そ

ここで CTD の必須機能を解析した結果、CTD は複製開始段階での CMG 複合体ヘリカーゼの形成に必須であり、さらに複製開始後には CMG 複合体の進行に必要であることを示した (Handa et al, 2012)。

(4) 分裂酵母染色体には 460 個所の効率よい複製開始点が存在する (Hayashi et al, 2007) が、すべてが同時に活性化するわけではなく、約 150 個所は S 期後期まで活性化されない。複製開始タイミングを決定するしく

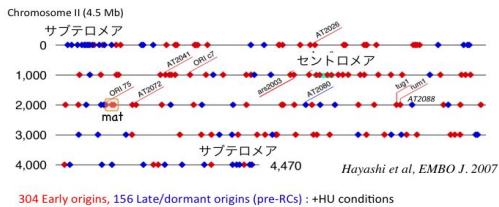


図2. 分裂酵母第2染色体の初期(赤)・後期(青)複製開始点の分布

みを明らかにするため、染色体内部の後期複製開始点断片を初期開始点近傍に挿入して複製開始タイミングへの寄与を解析した結果、後期複製開始点近傍にあるテロメア配列 2 コピーが複製タイミングを決定する配列エレメントであることを発見した。さらにこの配列にテロメア結合タンパク質 Taz1/TRF1/TRF2 が結合することがタイミング制御に必要であることを示した。このようなしくみは、染色体上の約半数の後期複製開始点を制御していることを発見した (Tazumi et al, 2012)。さらに、Taz1 相互作用因子である Rif1 が、染色体全域におけるタイミング制御に関与することを示した。これらの結果は、複製プログラムを決定するしくみに、生物種を通して保存されたテロメア配列をテロメア結合因子が機能することを示唆する。

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

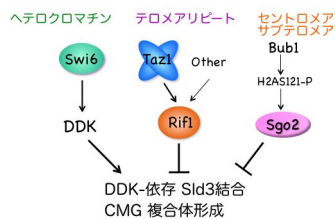


図3. 複製ドメイン特異的タイミング制御機構

は下線)

[雑誌論文](計10件)

Nanbu, T., Takahashi, K., Murray, I.M., Hirata, N., Ukimori, S., Kanke, M., Masukata, H., Yukawa, M., Tsuchiya, E., Ueno, M., Fission yeast RecQ helicase Rqh1

is required for the maintenance of circular chromosomes. *Mol. Cell. Biol.* 査読有、33(6), 2013, pp1175-1187, DOI: 10.1128/MCB.01713-12.

Tazumi, A., Masukata, H., Telomere-binding proteins play roles in control of replication timing. *Cell Cycle*, 査読有、11(24), 2012, pp4492-4493. DOI: 10.1101/gad.194282.112.

Tazumi, A., Fukuura, M., Nakato, R., Kishimoto, A., Takenaka, T., Ogawa, S., Song, J., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., Masukata, H., Telomere-binding protein Taz1 controls global replication timing through its localization near late replication origins in fission yeast. *Genes Dev.* 査読有、26(18), 2012, pp2050-2062. DOI:10.1101/gad.194282.112.

Handa, T., Kanke, M., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., Masukata, H. DNA polymerization-independent functions of DNA polymerase epsilon in assembly and progression of the replisome in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* 査読有、23(16), 2012, pp3240-3253. DOI:10.1091/mbc.E12-05-033.

Higashi, T.L., Ikeda, M., Tanaka, H., Nakagawa, T., Bando, M., Shirahige, K., Kubota, Y., Takisawa, Masukata, H., Takahashi, T.S. The prereplication complex recruits XEco2 to chromatin to promote cohesin acetylation in *Xenopus* egg extracts. *Curr Biol.* 査読有、22(11), 2012, pp977-988. DOI:org/10.1016/j.cub.2012.04.013.

Kanke, M., Kodama, Y., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., Masukata, H. Mcm10 plays an essential role in origin unwinding after loading of the CMG components. *EMBO J.* 査読有、31, 2012, p2182-2194. DOI:10.1038/emboj.2012.68.

Maki, K., Inoue, T., Onaka, A., Hashizume, H., Some, N., Kobayashi, Y., Murakami, S., Shigaki, C., Takahashi, T.S., Masukata, H., Nakagawa, T. An abundance of pre-replicative complexes (pre-RCs) facilitates recombinational repair under replication stress in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 査読有、286(48), 2011, pp41701-41710, DOI:10.1074/jbc.M111.285619.

Fukuura, M., Nagao, K., Obuse, C., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., Masukata, H. CDK promotes interactions of Sld3 and Drc1 for initiation of DNA replication in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* 査読有、22, 2011, pp2620-2633.

Kanke, M., Nishimura, K., Kanemaki, M., Kakimoto, T., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., Masukata, H. Auxin-inducible protein depletion system in fission yeast. *BMC Cell*

Biol. 査読有、2011, 12:8,
DOI:10.1186/1471-2121-12-8.

Hayashi, MT., Masukata, H. Regulation of DNA replication by chromatin structures: accessibility and recruitment. *Chromosoma* 査読有、120, 2011, pp39-46.

〔学会発表〕(計 1 2 件)

升方 久夫、Regulation of replication of fission yeast genome. The Sixth International Fission Yeast Meeting, 2011 年 6 月 27 日, Boston, USA.

升方 久夫、Replication timing control by Taz1 that binds to telomeric repeats proximal to internal late replication origins. Eukaryotic DNA Replication and Genome Maintenance, 2011 年 9 月 7 日, Cold Spring Harbor, NY, USA.

升方 久夫、Telomere-binding protein Taz1 controls replication timing of the internal late origins in fission yeast. 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 15 日, パシフィコ横浜 (神奈川県)

升方 久夫、Activation of replication origins and involvement of telomere proteins in timing control. DNA replication of eukaryotic genomes at the Foundation des Treilles. 2012 年 07 月 02 日-07 日, Les Treilles, Les Arcs, France.

升方 久夫、Control of global replication timing by telomere-binding proteins in fission yeast, 第 8 回 3R シンポジウム, 2012 年 11 月 25-28 日 淡路夢舞台.

升方 久夫、Replication Timing Program in Fission Yeast, 第 3 5 回日本分子生物学会年会, 2012 年 12 月 11-14 日, 福岡

升方 久夫、Replication timing control by telomere proteins, 第 21 回国際遺伝学会・Human Genome Meeting 2013 2013 年 4 月 12-15 日, Singapore.

升方 久夫、Replication timing program in fission yeast, 第 7 回分裂酵母国際学会, 2013 年 6 月 24-29 日, London UK.

升方 久夫、Replication timing control by centromere and telomere binding proteins, 酵母エピジェネティックミーティング, 2013 年 9 月 2-4 日, 福井県あわら市.

升方 久夫、Replication timing control by chromatin proteins, Eukaryotic DNA replication and genome maintenance, 2013 年 9 月 9-13 日, Cold Spring Harbor, NY, USA.

升方 久夫、Regulation of replication program in fission yeast: replicator, initiator and regulators, 第 36 回日本分子生物学会年会, 2013 年 12 月 3-6 日, 神戸.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/dbs01/re-paper-temp.php?id=14>

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/masukata/thesis/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

升方 久夫 (MASUKATA, Hisao)
大阪大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号 : 00199689

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :