

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370075

研究課題名(和文)染色体DNA複製開始の制御機構とその高次制御

研究課題名(英文)Regulation of the initiation of DNA replication and its higher order regulation

研究代表者

田中 誠司(Tanaka, Seiji)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教

研究者番号：50263314

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞における染色体DNA複製開始の詳細な分子メカニズムを理解するべく、出芽酵母を用いて新しい変異体取得方法を開発し、全ての複製開始因子について変異を単離した。それらの各変異体内で、各々の複製開始因子が染色体上の複製開始点に結合してくるモードを解析した結果、これまでにDNA複製開始直前に形成されると仮想されていた「複製開始前複合体」の実体とその形成様式を明らかにすることができた。複製開始前複合体の形成は複合体に含まれるそれぞれの因子に対し相互依存的であった。このような制御は複製開始反応の生物学的ロバストネスを高め、厳密な細胞増殖制御を可能にする仕組みの一端を担っていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the detailed mechanism of the initiation of DNA replication in eukaryotic cells, we have developed a novel strategy to isolate mutants in budding yeast and have isolated tight mutants of replication factors. By using these mutants, we have analysed the mode of association of replication factors to the origin of DNA replication on chromosomal DNA and have revealed that the molecular identity and the mode of assembly of 'pre-initiation complex (pre-IC)', which was proposed to exist temporally just before the initiation of DNA replication and was never proved that there. The assembly of pre-IC was mutually dependent on factors that constitute the pre-IC. Such mode of regulation might contribute to the biological robustness of the initiation reaction, and finally contribute to the precise regulation of cellular proliferation.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製 DNA複製開始

1. 研究開始当初の背景

細胞の増殖の制御は生命の最も基本的かつ重要な局面である。細胞が増殖するとき、各細胞周期において染色体DNAは細胞周期S期に正確に複製される。申請者のものも含めたこれまでの多くの研究から、染色体DNA複製の開始機構を理解するための大枠が得られた(図1)。DNA複製は、染色体上の特定の領域(複製開始点)から起き、その活性化は2段階に制御されている。すなわち、1. 複製準備(細胞にDNA複製能を付与する複製前複合体(pre-RC)の形成(G1期))、2. 実際のDNA複製開始(S期)。これら両過程は、各細胞周期につき必ず一度だけ、この順序でオーバーラップすることなく起きるように制御されており、このことが、DNA複製を細胞周期につき一度に限定し、過不足なくゲノムを複製できるようにするために必須である。

申請者はこれまでに、真核生物で保存されている新規複製因子を発見し、染色体DNAの再複製を防止しゲノムの安定維持に関わる制御機構を解析し、さらには複製開始時に、細胞周期のマスター制御因子であるCDKにより活性化される因子の同定を行ってきた。それらの成果も含め、図1のようなモデル図を描くことが可能になったが、この複製開始反応においてはその過程で起きる反応等、未

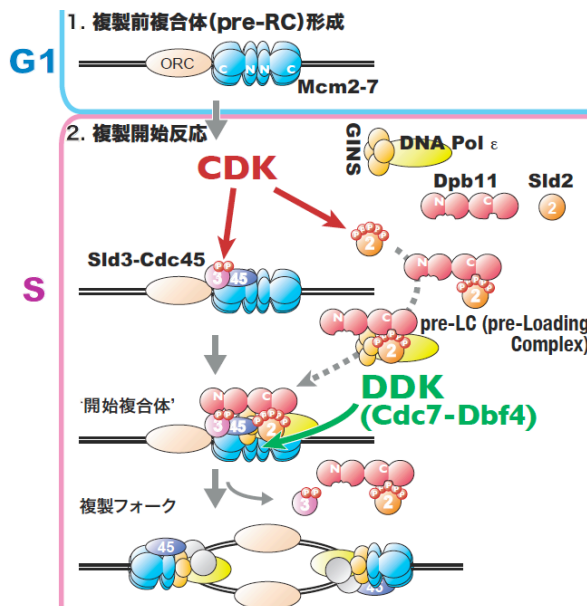


図1 真核細胞 DNA 複製開始のモデル。DNA複製は2段階の反応で起きる(pre-RC形成と複製開始反応)。複製開始反応においては2つのキナーゼ、CDKとCdc7が必要であり、CDKは、Sld2とSld3をリン酸化し、新たなタンパク複合体形成を促進する。複製フォークには多数のタンパクが含まれるが、多くのものはここでは割愛した。

だ不明な点が多い。そこで、本申請研究では、複製開始反応のより詳細な理解を目指し、解析を行うこととした。

また、真核細胞においては、DNA複製は多数の複製開始点から始まる。染色体上に散らばって多数存在する複製開始点の選択、その活性化のタイミングや核内配置は、発生や分化の過程で著しく変化することが知られており、このことは、DNA複製の制御機構は階層性を持ち、複雑かつ柔軟性を持ったシステムであることを示している。しかし、開始点が多数あることに由来する「高次制御」とも言うべきシステムの背後にある分子基盤やその存在意義は不明なままである。出芽酵母は真核細胞の良いモデルであるが、この生物にも複製開始点活性化のタイミングを制御するプログラムが存在することが知られている(図2)。申請者は、最近の研究から、個々の複製開始点の活性化制御と、複数の複製開始点のタイミング制御の間を取り持つと考えられる機構を見出しつつある。そこで、本申請研究では、上記に加え、出芽酵母をモデル系として用いて、DNA複製開始点活性化の時間的制御プログラムの分子レベルでの実態の解明も目指すこととし、研究を行った。

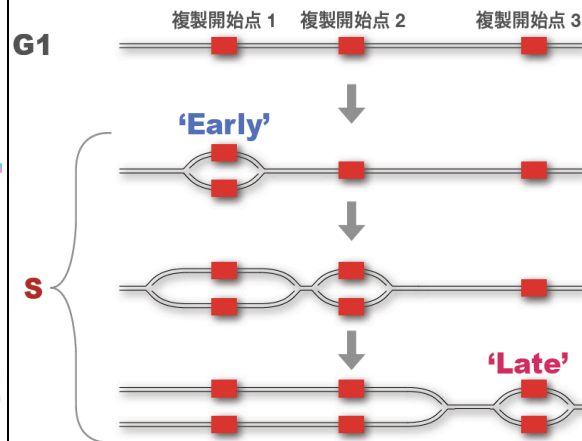


図2 出芽酵母染色体DNA複製開始の模式図。3つの複製開始点を模式的に示す。S期に入るとそれぞれの複製開始点は、個々の複製開始点固有のタイミングで活性化する。この図では、複製開始点1を初期活性化(Early)、複製開始点3を後期活性化(Late)として示す。

2. 研究の目的

真核細胞の染色体DNAは、一回の細胞分裂周期につき一度だけ過不足なく複製されなければならない。そこで、個々の複製開始点においては、その活性化を一度の細胞周期につき一度に限定すると同時に、全染色体レベ

ルにおいては、複製開始点の全体的な活性化は統合的に（高次に）制御されなければならない。本研究では、個々の複製開始点の活性化過程をより詳細に理解し、その理解の上に立ち、多数存在する複製開始点の活性をコーディネート（＝高次制御）する機構を理解することを旨とした。

3. 研究の方法

複製開始反応系に関わる因子は以下の4種類に大別できる。

- (i) pre-RC に含まれ、複製フォークには含まれないもの
- (ii) pre-RC、複製フォークの両方に含まれるもの (Mcm2-7)
- (iii) pre-RC、複製フォーク共に含まれないが複製フォーク形成には必要 (Sld2, Sld3, Dpb11)
- (iv) pre-RC に含まれないが、複製フォークには含まれる (Cdc45, GINS, Pol ϵ 他)

図1に示したように、グループ(iii)因子 (Sld2, Sld3, Dpb11) の会合により促進される開始前複合体の形成過程そのものが、複製開始・抑制のスイッチとなっており、その会合はCDKによるリン酸化で制御されている。複製開始直前に形成すると仮想されている開始前複合体にはこれらの他、グループ(iv)の因子も含まれているが、それらの実体や開始前複合体形成における役割は不明である。また、Mcm2-7は複製時にDNA2本鎖を巻き戻すヘリカーゼとされているが、G1期のpre-RC内での不活性化状態では、ヘテロ6量体の2量体、S期の活性化時には上記のCdc45, GINSと結合したヘテロ6量体単体へと変化することが示唆されている。そこで、複製開始反応のより良い理解を目指し、以下の4つの解析を行った。

(1) グループ(iv)因子 Cdc45, GINS が開始前複合体形成に果たす役割の解析

全ての複製因子について複製開始が起きないようなタイトな変異体を用いて（既存の変異体および、適切な変異体がこれまでに存在していなかった場合には、新規に変異体を取得）、各変異体内でCdc45, GINSの複製起点への結合に必要な条件をクロマチン免疫沈降（ChIP）法を用いて解析した。

また、これまでに新たに見出したGINSとDpb11の相互作用について、その相互作用部位の限定化を酵母ツーハイブリッド（Y2H）

法を中心として解析した。さらに、その相互作用の複製開始における役割を相互作用を失うような変異体を網羅的な変異導入により単離し、解析に供した。

(2) Sld2-Sld3-Dpb11 を含む開始前複合体がMcm2-7複合体の活性化に果たす役割

Sld2-Sld3-Dpb11 を含む開始前複合体は仮想の複合体であり、そのような複合体が存在するか否かを上記(1)にて単離した各種変異体を用いて、網羅的なChIPを行い、検証を試みた。この解析においては、全ての複製開始因子の挙動を同時に追跡することが必要となる。この目的のために、全ての複製因子について特異的抗体を作製し、各変異体より調製した同一の細胞抽出液を用いて並行してChIPを行い、開始前複合体形成のモード・形成条件を検討した。さらに、複製時ヘリカーゼMcm2-7の活性化（pre-RC中の2量体→活性化に伴う単量体化）が起きるタイミングについても2段階の免疫沈降法等の手法を用いて検討した。

(3) 複製開始点活性化の高次制御の分子機構と、複製開始制御機構との関係

申請者は最近の研究から、Sld3, Cdc45の細胞内における分子数が複製開始点の総数よりも少なく、これらの複製開始点への結合の偏りが、初期/後期複製起点を生み出していることを見出した。この偏りを生む過程にはCdc7キナーゼが関与していることも分かった。しかしながら、そもそも初期開始点が優先的に選択される理由は不明であり、そういった部位が選択される分子機構や、複製開始制御機構との関係を理解することが必要である。さらに、複製開始点の活性化には染色体構造が影響することが示唆されており、実際ヒストンアセチル化が関わるという報告もあるが、未だにその実態や複製開始因子との関係も不明なままである。これらの点に関し、新たな知見を得るべく複製因子と特異的な相互作用を持つようなクロマチン構造変換に関わる因子の同定を行った。高次複製制御に関わることが推測されるものについては、相互作用を失うような変異を単離し、その表現型等を遺伝学的手法・細胞生物学的手法を用いて解析した。

(4) 新規因子の他生物でのオーソログ同定

申請者が所属する研究室は、最近新たな複

製因子 Sld7 を発見した。Sld7 は Sld3 依存的に複製開始点に結合する。そのアミノ酸配列からは他生物におけるオーソログ発見は困難である。そこで、他生物種 Sld3 を免疫沈降し、その共免疫沈降物を質量分析機で解析することで新たな Sld3 相互作用因子を同定し、その機能解析も行った。

4. 研究成果

(1) グループ(iv)因子 Cdc45, GINS が開始前複合体形成に果たす役割の解析

GINS と Dpb11 が相互作用することを見出した。Dpb11 側の相互作用部位は BRCT ドメイン 2 と 3 の間の約 40aa の狭い領域であった。この GINS-Dpb11 相互作用は、リン酸化に依存する Sld2/3-Dpb11 相互作用とは独立であった。アラニンへの網羅的な置換による GINS と結合できない Dpb11 変異体は、複製開始効率が低下していたことより、この GINS-Dpb11 相互作用が効率的な複製開始に必要であると結論した。また、アミノ酸の保存性は低いものの、脊椎動物 Dpb11 オーソログである TopBP1 においても、同様の位置に GINS 相互作用部位があり、その部位の欠損は複製を著しく阻害することが分かった。このことは、GINS-Dpb11 相互作用が進化を通じて保存されていることを示している (Tanaka et al. Mol. Cell. Biol. 2013)。

(2) Sld2-Sld3-Dpb11 を含む開始前複合体が Mcm2-7 複合体の活性化に果たす役割

従来法では、多くの複製因子についてタイトな条件変異体を取得することができなかった。そこで、従来法を改良した変異体取得法を開発し (Tanaka et al. Yeast 2015)、全ての複製因子についてタイトな変異体を得ることができた。これらの変異と、新たに作製した種々の複製因子に対する特異的な抗体を組み合わせて、網羅的な ChIP を行い、複製開始因子の複製開始点への集合を解析した。DDK によりその結合が制御されている Sld3-Cdc45 は複製開始点への結合が相互依存的であった。この結果は以前、申請者が所属する研究室で、別の変異を用いて得られていた結果と同じであり、最近急速な展開を見せている *in vitro* 再構築系の結果 (=相互依存性が見られない) とは異なる。

また、グループ(iii)(iv)因子のうち、CDK 活性化後に複製起点に結合する Dpb11, Sld2, GINS, Pol ϵ および、その後の過程で働く

推察されている Mcm10 についてそれぞれの変異体を作製し、ChIP を行った。結果、CDK 依存的に結合する因子群についても、DDK の場合と同様、それぞれの因子が複製開始点に個別に結合することは無く、Dpb11, Sld2, GINS, Pol ϵ は相互依存的に複製開始点に結合することを見出した。ただし、Pol ϵ については、複製開始には第 2 サブユニットである Dpb2 のみが必須で、第 1 サブユニットでポリメラーゼ活性を持つ Pol2 は複製開始には必須ではない(ただし Pol2 無しでは反応効率が非常に悪くなる)ことが分かった。mcm10 変異では、全ての因子が複製開始点に結合してとどまっている状態が観察され、Cdc45-Mcm2-7-GINS も強く結合していることが観察された。この状態は以前より提唱されている「複製前複合体 (pre-IC)」の定義を満たすものであり、本研究で初めて pre-IC の存在と、分子レベルでの実体が明らかとなった。さらに、pre-IC 内では、pre-RC 内で二量体だった Mcm2-7 が一量体に変化していることがわかった。これらの知見はさらなる複製開始反応の理解に大きく役立つものである。また、DDK、CDK でそれぞれ制御されている複合体形成過程が、その過程で集合する因子に相互依存性を示すという事実は、複製開始反応の生物学的ロバストネスを保証しているものと推察された (論文投稿準備中)。

(3) 複製開始点活性化の高次制御の分子機構と、複製開始制御機構との関係

Sld3, Cdc45 の細胞内における分子数が複製開始点の総数よりも少なく、これらの複製開始点への結合の偏りが、初期/後期複製起点を生み出していること、この偏りを生む過程には Cdc7 キナーゼが関与していることを見出し、報告した (Tanaka et al. Curr. Biol. 2011)。この解析において Sld3-Sld7-Cdc45 (3-7-45) を同時に高発現させると、多数の複製開始点とその固有の活性化タイミングに関わらず、S 期初期に活性化を受けることを見出した。それらの複製開始点の中には、サイレンス化クロマチン領域内に存在し通常の S 期では活性化しないものがあつたことから、複製開始反応とクロマチン制御因子の関係性、ひいては複製開始の高次制御をあきらかにすべく、解析を行った。結果、予想以上に多数のヒストンアセチル化酵素 (histone acetyl transferase: HAT) やクロマチンリモデリング因子 (Chromatin remodeler: CR) が複製

開始因子と相互作用することがわかった。上述のサイレンス化クロマチン領域内にある複製開始点の活性化制御に焦点を絞って解析した結果、KAT5 ファミリーの HAT 因子が、3-7-45 による活性化に関与することを見出した (論文投稿準備中)。さらに、この制御はサイレンス化クロマチン領域内にある複製開始点以外にも後期複製開始点の制御にも関与している可能性があり、解析を継続している。これらの制御はこれまで知られていない全く新しいものであり、個々の複製開始点の制御と高次制御を連携させる仕組みの一部となっていることが期待される。

(4) 新規因子の他生物でのオーソログ同定

分裂酵母 Sld3 と共免疫沈降する因子を同定した。この因子は分裂酵母遺伝子破壊プロジェクトでは DNA 複製阻害剤であるヒドロキシ尿素 (HU) に対する感受性を示すとされており、また、出芽酵母 Sld7 と 10% 程度のアミノ酸配列同一性を示したことから、その機能解析を行った。Y2H 法では Sld3 とごく弱い相互作用しか検出できず、また、事前の報告とは異なり、その破壊株は HU 感受性を示さず、同調培養においても顕著な S 期への影響は観察されなかったため、以後の解析は打ち切った。この過程で、分裂酵母では Sld3 自身が強い自己相互作用を示すことがわかった。このことは、分裂酵母においては複製開始反応において必ずしも Sld7 オーソログのようなものが無くても効率良く複製開始が行えることを示唆している (未発表、大阪大学の研究室と共同研究として解析継続中)。

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 6 件)

すべて査読あり。*: Corresponding author

1. *Tanaka S, Miyazawa-Onami M, Iida T, Araki H. (2015). iAID: an improved auxin-inducible degron system for the construction of a 'tight' conditional mutant in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* **Yeast**. 32 (8), 567-581. DOI: 10.1002/yea.3080
2. *Tanaka S, Komeda Y, Umemori T, Kubota Y, Takisawa H, Araki H. (2013). Efficient initiation of DNA replication in eukaryotes requires

Dpb11/TopBP1—GINS interaction. **Molecular and Cellular Biology**. 33(13), 2614-2622. doi: 10.1128/MCB.00431-13

3. Tanaka S, *Araki H. (2013). Helicase Activation and Establishment of Replication Forks at Chromosomal Origins of Replication. **Cold Spring Harbor perspectives in biology** 5 (12), a010371. doi: 10.1101/cshperspect.a010371

[学会発表] (計 26 件)

1. 田中誠司、大浪 真由美、荒木 弘之. 複製開始反応における律速因子の高発現によるサイレンス化拮抗作用. BMB2015 神戸市 2015/12/1-4.
2. Tanaka S. Dissection of the initiation reaction of DNA replication in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. cold Spring Harbor Laboratory meeting: Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance 2015. Cold Spring Harbor, NY (USA) 2015/9/1-5.
3. Tanaka S. Dissection of the initiation reaction of DNA replication by systematic chromatin immunoprecipitation. EMBO Conference, DNA replication, chromosome segregation and cell division. London, UK. 2015/7/27-31.
4. 田中誠司、大浪 真由美、荒木 弘之. 網羅的な ChIP による DNA 複製開始反応の詳細な解析. 第 37 回日本分子生物学会年会 WS 横浜市 2014/11/25-27.
5. 田中誠司、大浪 真由美、荒木 弘之. Dissection of the initiation reaction of DNA replication by systematic chromatin immunoprecipitation. The 9th 3R symposium. 静岡県御殿場市 2014/11/17-21.
6. Tanaka S. Dissection of the initiation reaction of DNA replication by systematic chromatin immunoprecipitation. FASEB SRC Yeast Chromosome Structure, Replication and Segregation. Steamboat Springs, CO, USA. 2014/7/13-18.
7. Tanaka S. Connection between the initiation of DNA replication and structural change of chromatin. International conference, Kyoto, 2014: Coupling of replication, repair

and transcription, and their common mechanism of chromatin remodeling. 京都市. 2014/2/4-5.

8. Tanaka S, Komeda Y, Umemori T, Kubota Y, Takisawa H, Araki H. (2013). Dpb11/TopBP1-GINS interaction is required for efficient initiation of DNA replication. Cold Spring Harbor Laboratory meeting: Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance 2013, Cold Spring Harbor, NY (USA) 2013/9/2-6.
9. Tanaka S, Komeda Y, Umemori T, Kubota Y, Takisawa H, Araki H. (2012). Inter-BRCT region of DPB11 is a conserved GINS interaction domain, which is important for the initiation of DNA replication. 第 35 回日本分子生物学学会年会 WS 福岡市 2012/12/11-14.
10. Tanaka S, Komeda Y, Umemori T, Kubota Y, Takisawa H, Araki H. (2012). Inter-BRCT region of DPB11 is a conserved GINS interaction domain, which is important for the initiation of DNA replication. 2012 FASEB Summer Research Conferences "Yeast Chromosome Structure, Replication & Segregation" Steamboat springs, CO (USA) 2012/7/15-20.

〔図書〕 (計 2 件)

1. Tanaka S, *Araki H. (2015). Chapter 13. Role of CDK in Replication Initiation. Springer international. pp263-278. Ed. Kaplan DL. ISBN 978-3-319-24696-3.
2. Tanaka S, *Araki H. (2013). Chapter 6. Helicase Activation and Establishment of Replication Forks at Chromosomal Origins of Replication. Cold Spring Harbor perspectives in biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp81-94. Ed. Bell S, Mechali M, Dephamphilis M. ISBN 978-1-936113-48-4.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.nig.ac.jp/labs/MicGen/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 誠司 (TANAKA, Seiji)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教

研究者番号：50263314