

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770157

研究課題名(和文) DNA複製に関与する超分子複合体の形態解析

研究課題名(英文) Structural analysis of the supramolecular complexes involved in DNA replication

研究代表者

日詰 光治 (Hizume, Kohji)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教

研究者番号：10378846

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：DNA複製の開始制御において、多数のタンパク質複合体が集合して超分子複合体を形成し、高度な制御を行っている。

本研究では、これら複合体を試験管内でDNA上に集合させ、AFMによる構造解析と生化学的解析を行った。その結果、複製開始点に特異的に結合するタンパク質複合体 ORC は、複製開始点付近のヌクレオソーム配位の再編成を誘導し、塩基配列特異的な結合を確立することを見出した。また、DNA-MCM複合体の観察から、MCM上にDNAのループ状構造が形成されている様子を検出した。このような高次構造形成は、本研究のような試験管内実験系をAFM可視化を組み合わせたことにより初めて検出可能となった。

研究成果の概要(英文)：To complete correctly the replication of the genomic DNA, the initiation of DNA replication is highly regulated by the sequential association of protein complexes on replication origin. In this study, we assembled these protein complexes on the DNA in vitro and formed relatively huge supramolecular complexes. Both molecular imaging using atomic force microscopy (AFM) and biochemical assays show that nucleosome formation on the DNA containing specific sequence of origin induces stable association of ORC on origin. We also found that nucleosome positioning around origin is rearranged by the addition of ORC.

we also performed observation of MCM-DNA complex by AFM and detected that MCM complex bound to more than two DNA strands was detected, which formed DNA-loop. This result suggests existence of the mechanism of that MCM interacts with higher-order structure of DNA such as DNA-loop rather than that MCM is simply loaded on DNA besides ORC.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA replication nucleosome atomic force microscopy

1. 研究開始当初の背景

真核生物の DNA 複製は、複数のタンパク質からなる複合体が互いに相互作用をし、更に巨大な超複合体となって、その働きを制御する。大まかには、複製のライセンシングのために、ORC 複合体と Cdc6、Cdt1、MCM 複合体が集合して pre-RC (pre-replicative complex) を形成し、更に細胞周期 S 期には CDK 活性に依存してローディングされた Cdc45 と GINS 複合体が結合し、活性を持つヘリカーゼ複合体である CMG 複合体 (Cdc45, Mcm, GINS) を形成する。実際に複製開始点から複製が進行し始めた複製フォーク上の複合体は、レプリソームと呼ばれ、CMG ヘリカーゼ複合体のほかに、DNA ポリメラーゼや、クランプ複合体である PCNA、更にはヒストンシヤペロンである FACT が含まれることが報告されてきた。このような超複合体の構成因子の同定や、各因子の担う機能の解明は、遺伝学および生化学的手法により、国内外の数多くのグループによって緻密に推進されてきた。

また、近年では、DNA アレイや次世代シーケンシング技術を応用し、ゲノム DNA 上でのこれら因子の局在が詳細にマッピングされてきた。とりわけ、細胞周期を制御して ChIP-seq を行なうことにより、フォークの進行や停止といったゲノム上での因子の動きも追跡されている。更には、結晶解析や電子顕微鏡解析から、各複合体の微細構造解析も進められており、ORC、MCM、GINS といった複合体の Å~nm スケールでの形状が明らかにされてきた。

2. 研究の目的

上記のように、DNA 複製に関する因子の同定、機能解析、ゲノム上での局在マッピング、各因子の微細構造解析等々の研究が国内外で活発に行なわれる一方で、各複合体が集合し、超複合体となった時の空間配置や形態の解析は進んでいない。DNA 複製を正確に完了するためには、これら複合体を正確に“組み立て”、あるいは必要に応じて“切り離し”、更には DNA 上を“スライド”して進んでいかなければならない。この、多数の因子が有機的に機能し合い、動的に活動する様子を理解して、初めて DNA 複製反応の分子メカニズムや全体像を理解することが出来る。

そこで、本研究では、DNA 複製に機能する超タンパク質/DNA 複合体の形状解析を行なおうとするものである。申請者は、過去に、多数の構成因子からなるクロマチン高次構造を試験管内再構築し、さまざまな超タンパク質/DNA 複合体構造を原子間力顕微鏡 (AFM) により可視化解析してきた (100 kb に及ぶ長鎖ヌクレオソームファイバー、リンカーヒストンにより導入される 30-nm fiber、転写調節因子や II 型トポイソメラーゼにより導入される凝集クロマチン構造など)。この技術を応用し、AFM が生物試料に対して最も安定

に解像度を発揮する数ナノメートルから数十ナノメートルのスケールにおける、DNA 複製超複合体の動態解析を推進する。

3. 研究の方法

出芽酵母から精製した複製反応に必須な各因子を材料とし、DNA 上に ORC や pre-RC、あるいは CMG といった超複合体を試験管内再構築した。その構造を、AFM 観察に供し、複合体同士がアセンブリする際の空間配置や、アセンブリ前後の構造変化を明らかにすることを旨とした。

更に、クロマチン上にも各超複合体を形成させ、クロマチン構造が及ぼす影響を調査した。ここから、ヌクレオソーム構造が超複合体形成に及ぼす促進的あるいは阻害的な影響を探索した。また、CMG を進行させたクロマチンファイバーを可視化解析することにより、ヘリカーゼ進行に際するクロマチンの構造変化を解析した。

4. 研究成果

(1) ORC とヌクレオソームとから形成される複合体の解析

複製の開始する領域である複製開始点には、ORC (origin recognition complex) が特異的に結合し、そこに更に複製のヘリカーゼのコアコンプレックスである MCM 複合体や DNA ポリメラーゼが集合して複製フォークを形成する。しかし、ORC が何を認識して複製開始点に特異的に結合するのかは、明らかではなかった。出芽酵母以外の真核生物には複製開始点特異的な塩基配列は見出されておらず、出芽酵母において見出されている複製開始点特異的配列に対しても ORC の結合特異性は多量の競合剤を加えることでしか検出できない弱いものであった。

本研究では、①複製開始点を含む DNA に対する ORC の結合の安定性および特異性は、その DNA にヌクレオソームを形成させることでより高くなることを見出した。また、②複製開始点付近のヌクレオソームは ORC の添加により DNA 上での配位を変化させることや、③ AFM 観察ではヌクレオソームと ORC とが結合した高次複合体が検出されることなどを発見した。以上の結果から、複製開始点の決定、すなわち複製開始点への ORC の特異的結合にはヌクレオソーム形成が重要であり、ORC とヌクレオソームの結合はヌクレオソームの再配置を経て確立されるといった、分子メカニズムを解明するに至った。以上の結果は、後述の発表論文 (1) として発表した。

(2) MCM-DNA 複合体の解析

ORC が結合している領域には、細胞周期 M 期から G1 期にかけて、Cdc6、Cdt1、および MCM 複合体が集合し、これら因子からなる pre-RC (pre-replicative complex) が形成される。pre-RC の形成が形成された領域は、

S 期に複製が開始し得る“複製のライセンスング”が行われたことになる。

本研究において、精製した出芽酵母 ORC、Cdc6、MCM-Cdt1 複合体を用いて、試験管内で DNA 上に pre-RC を形成させ、その構造を AFM により可視化解析した。とりわけ、強固に DNA 上に結合した MCM の可視化をめざし、高塩濃度で他のタンパク質を洗浄・除去した試料の観察を行った。その結果、DNA 上に結合した楕円状の構造が検出され、サイズ計測により、2つの MCM が結合したものと考えられた。楕円状の MCM に対して、DNA がループを形成している様子が多く観察された。出芽酵母から精製したミニクロモソーム上に形成された pre-RC の観察からも、楕円状構造から DNA がループアウトしている様子が検出された。以上の結果から、pre-RC 形成に際して、pre-RC を起点に DNA がループアウトする構造が存在することが示唆された。

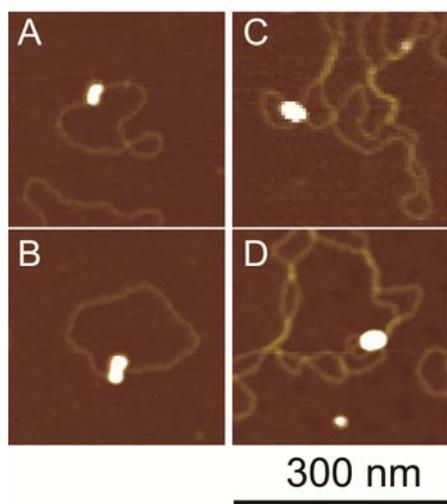


図 1. AFM により観察された DNA 上の MCM 複合体。出芽酵母から精製した MCM-Cdt1 複合体を、1.4 kb (A および B) もしくは 7.6 kb (C および D) の環状 DNA と、ORC、Cdc6 とともに混合して pre-RC を形成させた後、高塩濃度洗浄により MCM 以外のタンパク質を DNA から除去した。

(3) CMG ヘリカーゼの可視化解析

複製のライセンスングが行われた領域には、G1 期後期から S 期にかけて、Cdc45 や GINS 複合体が結合し、MCM が活性化型ヘリカーゼである CMG (Cdc45、MCM、GINS) 複合体となる。

出芽酵母から CMG 複合体を精製し、一端に single strand DNA を有するフォーク型の DNA に結合させ、その様子を AFM により可視化解析した。裸の DNA に対しては、十分なヘリカーゼ活性を発揮し、反応後には single strand DNA が検出されるのに対し、ヌクレオソームを形成させたフォーク DNA 基質に CMG ヘリカーゼを作用させても、ヌクレオソームにより CMG の進行が阻害されている様子が検

出された。現在、基質 DNA に用いる塩基配列を変更する、あるいはクロマチンリモデリング因子を加えるなどの条件検討を行い、ヌクレオソームを乗り越えて進行するヘリカーゼ反応を試験管内再構築するべく研究を継続中である。

これまで、DNA 上で作用する CMG ヘリカーゼの分子可視化の報告は無い。本研究において既に確立した“CMG による DNA の開裂反応の分子可視化”は、前述のクロマチンを乗り越えるメカニズムの解明だけでなく、Cdc45 や GINS による MCM の活性化機構など、種々のヘリカーゼ反応のメカニズムが解明される基盤技術となると期待される。

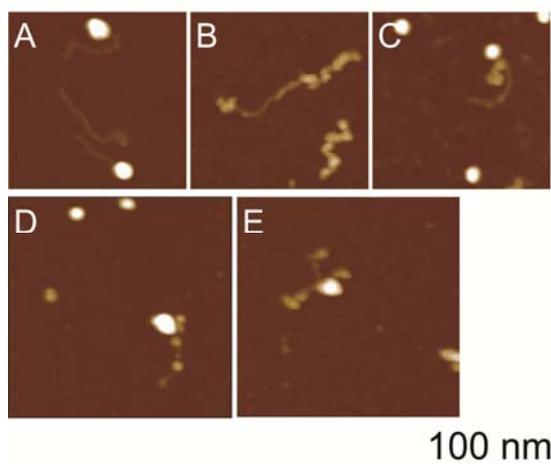


図 2. CMG ヘリカーゼ反応の AFM による可視化解析。(A) ATP 非存在下で、一端に single strand DNA をもつ基質 DNA と、CMG とを混合した試料の AFM 像。CMG が DNA の一端に結合している。(B) (A) の試料に ATP を添加して 30 °C で 1 時間反応させた試料。開裂して single strand DNA となった基質に RPA が結合している。(C) (A) の試料に ATP を添加して、4 °C で 1 時間反応させた試料。反応中間体である、一部が single strand DNA となった DNA に CMG が結合した複合体が検出された。(D、E) ヌクレオソームを形成させた基質 DNA に、CMG ヘリカーゼを ATP 存在下で混合した試料。反応が完了した single strand DNA は観察されず、ヌクレオソームにより進行が阻害されていると考えられる CMG が DNA 上に検出された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- (1) Hizume, K, Yagura, M, and Araki, H. (2013). Concerted interaction between origin recognition complex (ORC), nucleosomes and replication origin DNA ensures stable ORC-origin binding. *Genes Cells* 18, 764-779. doi: 10.1111/gtc.12073. (査読有)

- (2) Hirano, Y, Hizume, K, Kimura, H, Takeyasu, K, Haraguchi, T, and Hiraoka, Y. (2012). Lamin B receptor recognizes specific modifications of histone H4 in heterochromatin formation. J Biol Chem 287, 42654-42663. doi: 10.1074/jbc.M112.397950. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

- (1) 日詰光治, 荒木弘之 MCM-DNA 複合体の原子間力顕微鏡による可視化解析
第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 パシフィコ横浜 (横浜市)
- (2) Hizume K, Yagura M, Endo S, Araki H, “Nucleosome on helicase activity of CMG complex”,
the 9th 3R Symposium 2014 年 11 月 18 日 御殿場高原ホテル (御殿場市)
- (3) Hizume K, Yagura M, Araki H, “Reconstitution of DNA replication licensing on the chromatin fiber”
The 52nd annual meeting of the American Society for Cell Biology 2013 年 12 月 17 日 サンフランシスコ (アメリカ合衆国)
- (4) 日詰光治, 矢倉勝, 荒木弘之 クロマチンファイバー上での DNA 複製のライセンシング: 原子間力顕微鏡による可視化解析。
第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月 4 日 神戸ポートアイランド (神戸市)
- (5) 日詰光治, 矢倉勝, 荒木弘之 真核生物 DNA 複製の開始制御における、クロマチン上への複製開始因子集合の観察。
日本顕微鏡学会 走査型プローブ顕微鏡分科会 平成 25 年度研究会 (バイオ系 SPM 研究会) 2013 年 12 月 9 日 湯沢ニューオータニホテル (新潟県南魚沼郡湯沢町)
- (6) 日詰光治, 矢倉勝, 荒木弘之 ORC の複製開始点特異的な結合に寄与する、ORC/nucleosome/複製開始点 DNA 間の協調的相互作用。
第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2013 年 11 月 20 日 ホテルニュー水戸屋 (仙台市)
- (7) Hizume K, Yagura M, Araki H, “DNA REPLICATION LICENSING ON THE CHROMATIN FIBER: VISUALIZATION BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY”,
“Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance” at Cold Spring Harbor Laboratory at New York 2013 年 9 月 10 日 ニューヨーク (アメリカ合衆国)
- (8) 日詰光治, 矢倉勝, 荒木弘之 ORC の複製開始点特異的な結合に寄与する、ORC/nucleosome/複製開始点 DNA 間の協調的相互作用。
第 35 回日本分子生物学会年会 2012 年 12 月 14 日 福岡国際会議場 (福岡市)
- (9) Hizume K, Yagura M, Araki H, “Concerted interaction between ORC, nucleosomes, and origin DNA ensures origin-specific ORC binding”
The 8th 3R Symposium at Awaji 2012 年 11 月 27 日 淡路夢舞台国際会議場 (淡路市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日詰 光治 (HIZUME KOHJI)
国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教
研究者番号: 10378846

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし