

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32659

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770170

研究課題名(和文) 真核生物における組換え依存的複製再開機構の解明

研究課題名(英文) Analyzing the mechanism of recombination-dependent replication restart in eukaryotes

研究代表者

橋本 吉民 (Hashimoto, Yoshitami)

東京薬科大学・生命科学部・助教

研究者番号：50616761

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損傷部位との衝突などによって停止した複製フォークにおいてDNA切断が起きた場合(「フォークの崩壊」と呼ぶ)、組換えにより複製フォークが再生されて再開可能となることが知られている。しかし、このときフォークにおいてDNA複製を担っているレプリソームがどのように制御されているのかほとんど分かっていない。本研究では、レプリソーム因子GINSのサブユニットであるPsf2がフォーク停止時にATR/ATMによるリン酸化を受けること、さらにこのリン酸化が複製再開に関与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：A replication fork collapsed by a break in the template DNA can be rescued by a recombination-mediated pathway, allowing the re-establishment of a functional replication fork. However, it is not well understood how the replisome components are regulated during fork collapse and restart. In this study, I found that Psf2, a subunit of GINS (a replisome factor), is phosphorylated by ATR/ATM upon fork arrest, which is involved in the replication restart.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：DNA複製フォーク レプリソーム 組換え リン酸化

1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸菌などの原核生物では、崩壊した複製フォークが組換えによって再生される仕組みが詳細に明らかにされているが、同様のシステムが真核生物においても働いているのかどうかは長らく不明であり、フォークの崩壊と再生を解析する適切な再構成系も存在しなかった。原核生物では DNA 損傷部位との衝突などにより停止したフォークは容易にレプリソームが脱落して崩壊するのに対して、真核生物では停止した個々のフォークを安定化する仕組みが存在することや、一本の染色体上に多数の複製起点があるためフォーク崩壊の現場で組換えによる再生が起きたとしても近隣で新生されたフォークとの区別がつかないことなどが解析を困難にしてきた理由であった。

(2) 私は、それまでの研究で組換え経路が DNA 複製において果たす役割を明らかにするため、アフリカツメガエル卵無細胞系を用いて組換え因子 Rad51 の役割について解析を行っていた。紫外線(UV)照射やメチルメタンサルホン酸(MMS)への暴露など DNA 鎖の切断を直接起こさないような DNA 損傷を与えた場合、Rad51 は複製進行に特に必要ではなかったが、複製中に生じる一本鎖 DNA の蓄積を防ぐ役割を持っていることが分かった。一方、停止したフォークを一本鎖特異的エンドヌクレアーゼ処理するという操作を行ったところ、複製進行・再開に Rad51 が必要となる状況を作り出すことに成功した。このとき Rad51 非存在下ではレプリソーム因子の一つ GINS のクロマチン結合は低下しているが、他のレプリソーム因子 Cdc45 や MCM の結合は維持されていたことから、この状況がフォーク崩壊と組換えによる再生を反映しているのではないかと考えた。そこで、この系を再構成系として確立すれば、真核生物における組換え依存的な複製再開機構を明らかにできるのではないかと期待した。

(3) DNA 複製進行が阻害されたとき、また、阻害が解除されて複製再開するときに複製フォークの構造がどのように変化するかということについては多くのモデルが提唱されてきた。しかしながら、フォーク上に存在するレプリソームがフォークの停止や崩壊の過程でどのように制御されているのかほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

(1) アフリカツメガエル卵無細胞系を用いた再構成系の構築を試みることにより、崩壊した複製フォークの組換え依存的な再生経

路が真核生物においても存在するかどうかを明らかにする。

(2) 上記の系を用いて、組換え制御因子の役割やレプリソーム因子(特に GINS)の制御に着目して、複製再開・フォーク再生の分子機構の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) アフリカツメガエル卵抽出液による無細胞系は、真核生物の染色体 DNA 複製、複製ストレス応答、DNA 損傷応答などを効率的に試験管内で再現できる優れた系であり、本研究の主な研究材料として用いた。特定のタンパク質の機能解析のためには、特異的抗体を作製してビーズに結合させ、卵抽出液を抗体ビーズで処理することにより免疫除去を行って影響を調べた。その際、野生型あるいは変異型の組換えタンパク質を加えることにより影響が回復するかどうかについての検討も行った。実験試料の主な解析手法は、クロマチン画分や免疫沈降産物のイムノブロットティング、染色体 DNA への蛍光ヌクレオチドの取り込みによる複製活性の測定などである。

(2) 卵無細胞系で得られた結果の種を超えた普遍性や生体内(細胞レベル)での重要性を調べるため、ニワトリ DT40 細胞を用いた DNA 損傷存在下における細胞生存率の試験を行った。

(3) オーキシンドェグロン法(AID法)は、植物におけるオーキシン依存的なタンパク質分解経路を動物細胞に移植することにより、標的因子の特異的な分解を任意のタイミングで誘導できるという手法である。この手法を利用するためには植物タンパク質 OsTIR1 を発現させること、標的因子にデグロン配列を付加すること、オーキシンを分解誘導時に添加することの3つの条件を満たす必要がある。OsTIR1 とデグロン付加 GINS の組換えタンパク質を作製して卵抽出液に加えることにより、AID法を無細胞系へ適用した。

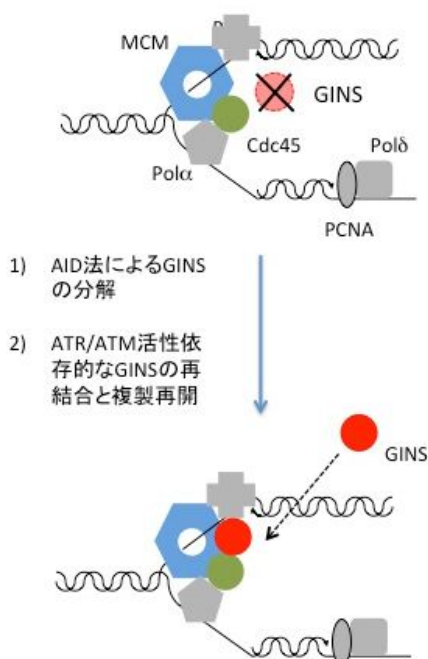
4. 研究成果

(1) Rad51 非存在下ではレプリソームから GINS が脱落しやすくなること、GINS のサブユニット Psf2 は複製ストレスや DNA 損傷に応答して ATR/ATM によるリン酸化を受けることから GINS の制御に着目して研究を行った。リン酸化部位に変異を導入した組換え GINS を作製して複製活性を調べた結果、通常の複製開始や進行、UV や MMS などの軽度な DNA 損傷の存在下における複製進行にはリン酸化

は必要ではないことが分かった。一方、エンドヌクレアーゼ処理によるフォーク崩壊が起きると思われる条件では、GINSのリン酸化変異体では野生型に比べて複製活性がより低下することから、フォークの崩壊・再生過程にリン酸化が何らかの役割を果たしていると考えられる。

(2) Psf2リン酸化の普遍的な重要性を明らかにするため、ニワトリ Psf2の予想されるリン酸化部位に変異を導入してDT40細胞において過剰発現させて、UVやMMSに対する感受性を調べた。その結果、恒常的なリン酸化を擬態したアスパラギン酸置換体を発現させたときには感受性を軽減できることが分かった。UVやMMSによるDNA損傷部位はフォークの進行を阻害することから、Psf2のリン酸化はニワトリ細胞においても重要な役割を果たしていると考えられる。この結果は、卵無細胞系でのUVやMMSの場合にはリン酸化は必要ではないという結果と一見矛盾するが、UVやMMSの条件でも恐らく低頻度ではフォークの崩壊が起きており、全体としての複製活性に大きな影響は無くても、再生できなかったフォークが染色体上にわずかな数でも存在すれば、細胞生存率レベルで見れば影響があるものと解釈できる。

(3) GINSはCdc45、MCMと共にCMG複合体を形成してヘリカーゼとして複製フォーク先端で働くと考えられている。複製中のクロマチンからGINSが脱落してCdc45とMCMが



残るということは、CMG複合体が部分的に解体されることを意味している。GINS脱落后にCMG複合体が再形成され得るのかどうかを直接検討するため、AID法により停止したフォークでのGINSの分解誘導を試みた。まず、デグロンタグを付加したGINSを作製し、内在性GINSと置換しても複製活性をサポートできること、さらにオーキシン添加により分解できることを確認した。デグロンタグGINSを持つ複製フォークをアフィディコリンで停止させて分解誘導をかけた後に、アフィディコリンを除いて複製再開が起きるかどうかを調べた結果、GINS非存在下では複製再開できないが、GINS存在下では複製再開できることが分かった。また、この再開にはCDK活性は必要ではなく、GINSのATR/ATMによるリン酸化部位の変異体では再開効率が低下することも分かった。これらの結果は、停止したフォークにおいてレプリソームからGINSが脱落してもATR/ATM活性依存的に再結合してレプリソームが再形成されて複製再開できることを示唆している(モデル図参照)。これは通常のCDK活性依存的な複製開始反応とは異なる新規の経路である。

(4) 上記(1)~(3)が本研究での期間内に得られた主な結果であるが、最後にこれらの意義や今後の展開について述べる。

哺乳類細胞を用いた網羅的なプロテオミクス解析の結果からPsf2がATR/ATMによってリン酸化されることは既に明らかになっていたが、その生理的意義については全く不明であった。本研究では、このリン酸化がアフリカツメガエルやニワトリなどでも種を超えて保存されていること、また複製フォークの停止・崩壊・再生の過程で重要な役割を持っていることなどを新たに示した。

AID法は外来的に導入した遺伝子産物を迅速に分解誘導できる優れた手法であり、開発以来培養細胞での遺伝子機能解析に用いられてきた。AID法をツメガエル卵無細胞系においても利用可能であることを示したのは本研究が世界初であり、今後はDNA複製研究だけでなく、無細胞系を用いた様々な研究に応用されていくものと期待できる。

本研究では、GINSの脱落と再結合によるCMG複合体の部分的解体・再形成は実際に起きるということを示す強い証拠を得たが、ここで様々な新たな疑問や課題が生じる。なぜGINSだけがCMG複合体から解離するのか、これには何らかの積極的なメカニズムが関わっているの

か、また、Cdc45 など他の因子が脱落した場合は再開不可能となるのかという点である。レプリソーム因子のフォーク崩壊過程における動態制御は不明な点が多いが、今後明らかにしていく必要があると思われる。

本研究の本来の目的は組換えによる複製再開機構を解明することであり、組換えが再開に必要な状況の指標として GINS の脱落を想定していたが、AID 法による GINS 分解後の再開の場合には組換えが必要かどうか不明である。積極的に DNA 切断を導入していないため、恐らく組換えは不要であると思われる。したがって、GINS の脱落と再結合はフォーク崩壊と再生と必ずしも対応する現象ではないのかもしれないが、今後の検討が必要である。

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1件)

Arbab Ray Chaudhuri, Yoshitami Hashimoto, Raquel Herrador, Kai J Neelsen, Daniele Fachinetti, Rodrigo Bermejo, Andrea Cocito, Vincenzo Costanzo, Massimo Lopes, Topoisomerase I poisoning results in PARP-mediated replication fork reversal, Nature Structural & Molecular Biology, 査読有、19、2012、417-423
DOI: 10.1038/nsmb.2258

[学会発表](計2件)

橋本吉民、佐藤史弥、田中弘文、DNA 複製ストレス応答における Psf2 リン酸化の機能解析、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月、神戸

橋本吉民、田中弘文、複製フォークの停止・再開におけるレプリソーム動態制御、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月、横浜

[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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://logos.ls.toyaku.ac.jp/~cellreg/xi_bao_zhi_yu_yi_ke_xue_yan_jiu_shi/HOME.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

橋本 吉民 (HASHIMOTO, Yoshitami)
東京薬科大学・生命科学部・助教
研究者番号：50616761

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し