

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24870021

研究課題名(和文) 染色体複製開始における超分子構造の分子内クロストーク

研究課題名(英文) Intra-complex crosstalk within a super nucleoprotein structure during initiation of chromosomal DNA replication

研究代表者

川上 広宣 (Kawakami, Hironori)

九州大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：50403952

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は出芽酵母の染色体複製開始点を特異的に認識するORCに着目し、ORC構成サブユニット間で特定の条件下に起こる特異な相互作用の機能構造と、その細胞内における重要性和制御系の解明を目指した。その結果、特異な相互作用に関わる領域をアミノ酸レベルで特定し、残基が細胞内機能に重要なことを見いだした。また、この残基を介した相互作用ネットワークの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：An intra-complex crosstalk within ORC, an initiator of eukaryotic DNA replication, was analyzed extensively in vitro and in vivo. Inter-complex crosstalk pathways were also identified.

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：染色体複製 ORC 相互作用様式 制御経路

1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA 複製は細胞が正常に増殖するためのまさに基盤である。研究代表者は、染色体 DNA が正確に 2 倍化する分子機構を知るため、特に複製開始反応の全貌解明を研究の全体構想としている。これまでに研究代表者らは、出芽酵母染色体 DNA 上の複製起点配列を認識する ORC 蛋白複合体が、複製開始の進行に伴い特異的に構造変化するモデルを構造生物学的に提唱し、また、ORC 構成サブユニット間で特定の条件下におこる特異な相互作用を見いだしている (Structure 2012)。この相互作用に関わる機能構造は不明であり、また、この機能構造が細胞内でどのように機能し、調節されるかも不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、まず、ORC 構成サブユニット間で特定の条件下に起こる特異な相互作用の様式を残基レベルで解明し、その細胞内における重要性を解明することを第 1 の目的とする。また、ORC あるいは染色体複製開始が制御される細胞内分子機構を克明に明らかにすることを第 2 の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 相互作用残基の解明

ORC 構成サブユニット内の 100 アミノ酸内に特異な相互作用領域があると既に判明している (Structure 2012)。そこで、この 100 アミノ酸に着目し、ORC 構成サブユニットの

種々の欠失体・アミノ酸置換体を構築する。プルダウン法を用いた 1 対 1 結合能を評価することで相互作用残基を特定する。

(2) 特定した残基の細胞内における重要性

特定した変異を持つ *orc* 遺伝子を細胞内に導入し、その表現型を調べる。

(3) ORC 簡易精製系の確立

複合体中における当該サブユニットの当該残基の機能を調べるため、ORC 複合体を簡便に精製するシステムを確立する。

(4) 細胞内制御経路の探索

細胞が致死になるような強い表現型が生じる場合は、この表現型を利用してマルチコピーサプレッサーを分離する。

4. 研究成果

出芽酵母 ORC を含む複製蛋白・DNA 超高次複合体の電顕単粒子解析を行い、高次複合体形成の過程における構造変化を明らかにした (Nat. Struct. Mol. Biol. 2013)。その後、更に、ORC サブユニット間相互作用に関わるアミノ酸を同定するためのスクリーニングシステムを構築し、情報学的アプローチを併用することで実際に複数のアミノ酸残基を同定した。同定した残基の 1 アミノ酸置換変異によって試験管内での相互作用能が欠損すること、ならびに細胞内における機能が不活性化なことが判明した (学会発表済み)。

同定した残基の ORC 複体内における機能を知るにあたり、従来のバキュロウィルスを用いた ORC 多量生産システムはウィルス

の構築とメンテナンスが律速・煩雑であるという問題があった。これに対処するため、動物細胞のトランスフェクションを用いたシステムに転換した。これにより、体系的な変異体解析を簡便に行うための基盤が整備された。

併行して、同定したアミノ酸に変異を持つ *orc* 変異株の多コピーサプレッサーを探索し、これまでに有望な遺伝子を複数同定し、ORCの調節ネットワークの一端が明らかとなった(学会発表予定)。

以上の成果を踏まえ、当初の目的を十分達成することが出来たと判断した。

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 2 件)

1. Sun, J., Evrin, C., Samel, S., Fernández-Cid, A., Riera, A., Kawakami, H., Stillman, B., Speck, C., and Li, H. (2013) Architecture of a helicase loading intermediate containing ORC-Cdc6-Cdt1-MCM2-7 on DNA reveals similarity to DNA polymerase clamp loading complexes. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 20(8), 944-951 査読有り
2. 川上広宣 (2013) 出芽酵母 pre-RC 形成の精製組み換え蛋白質を用いた試験管内再構成と pre-IC 構成因子のリクルートメント, *Genes Genet. Syst.* 87(5)(付録), 7 査読

無し 受賞記念総説

[学会発表](計 6 件)

1. 川上広宣、片山 勉、出芽酵母 Orc1 の構造変化特異的 Orc6 結合に必要な残基の同定、第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2013 年 11 月 20-22 日、仙台
2. 川上広宣、片山 勉、Bruce Stillman、真核生物染色体 DNA 複製における最初期過程の構造生物学的・生化学的基盤、第 25 回微生物シンポジウム、2013 年 9 月 6-7 日、静岡
3. 川上広宣、片山 勉、Bruce Stillman、精製組み換え蛋白質を用いて再構成した出芽酵母複製前複合体(pre-RC)の染色体複製開始における機能、平成 25 年度日本生化学会九州支部例会、2013 年 5 月 18-19 日、佐賀県本庄町
4. 川上広宣、片山 勉、Bruce Stillman、精製組み換え蛋白質を用いて再構成した出芽酵母 pre-RC が複製開始に及ぼす機能、第 85 回日本生化学会大会、2012 年 12 月 14~16 日、福岡
5. 川上広宣、Bruce Stillman、出芽酵母 pre-RC 形成の精製組み換え蛋白質を用いた試験管内再構成と pre-IC 構成因子のリクルートメント、日本遺伝学会第 84 回大会ワークショップ、2012 年 9 月 24-26 日、福岡 (Best Papers 賞)
6. Kawakami, H., Sun, J., Zech, J., Speck, C.,

Li, H., and Stillman, B., Conformational transition of a nucleoprotein complex at a yeast chromosomal replication origin revealed by cryo-electron microscopy. Kyushu University – Pusan University Joint Seminar, Sep 17, 2012, Fukuoka, Japan

〔その他〕

ホームページ等

<http://bunsei.phar.kyushu-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

川上広宣 (KAWAKAMI, Hironori)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号：50403952

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし