

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25440011

研究課題名(和文) ヒト細胞複製フォーク3 DNAポリメラーゼモデルの生化学的検証

研究課題名(英文) Biochemical studies on the replication fork model with three DNA polymerases in human cells

研究代表者

釣本 敏樹 (Tsurimoto, Toshiki)

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：30163885

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：真核生物のリーディング鎖、ラギング鎖の合成で、複数のDNAポリメラーゼが使い分けられる生化学的背景を解析した。まず、高い活性を持つ複製DNAヘリカーゼであるヒトCMG複合体を再構築し精製した。また、PCNA装着因子Ctf18-RFCが、DNAポリメラーゼと複合体を形成した時に、両者が協調的にプライマー DNA 3'末端に結合し、高い効率でPCNA装着することを明らかにした。このことから、Ctf18-RFCが、リーディング鎖DNAポリメラーゼの構成要素として機能すること、さらに機能の異なる2種類のPCNAローダーがDNAポリメラーゼの使い分けに重要な役割を持つことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：This research aimed to study the mechanism to proceed a replication fork with three functionally distinct DNA polymerases in eukaryotes. I especially focused on a biochemical background to distinguish DNA polymerases for syntheses of leading and lagging strands. Firstly, I reconstituted the replicative DNA helicase, human CMG complex and obtained the highly purified active CMG helicase. Secondly, I analyzed a functional significance of the interaction between the second PCNA loader Ctf18-RFC and DNA polymerase. I elucidated that Ctf18-RFC actively loads PCNA only when it complexes with DNA polymerase. This result indicated that Ctf18-RFC functions as a component of the leading-strand DNA polymerase complex and actively loads PCNA on the leading strands. Considering the role of RFC for loading of PCNA on the lagging strands, these two PCNA loaders will coordinate PCNA loading on both strands and play a role to distinguish DNA polymerases for syntheses of the two DNA strands.

研究分野：分子生物学、生化学

キーワード：複製フォーク DNAポリメラーゼ in vitro複製

1. 研究開始当初の背景

真核生物の複製フォークに關与する DNA ポリメラーゼ(Pol)については、Pol 単独による複製から、SV40 ウイルス DNA の試験管内複製反応による Pol α 、Pol δ の 2-Pol 系 (2ポリメラーゼモデル、Tsurimoto et al. 1990, Nature)、さらに酵母遺伝学から判明した Pol ϵ を加えた 3-Pol 系 (3ポリメラーゼモデル、Araki et al. 1992, EMBO J)と展開した。以降、20 年間で、実際に細胞内で 3-Pol を使い分けたリーディング鎖、ラギング鎖合成によって複製が進むことが示されてきた。1 番目の例として、Pol δ の忠実度変異と複製鎖の変異出現頻度の偏りとして示された(Pursell et al. 2007, Science)。また 2 番目の例として、1 つの Pol を特異的に除去したアフリカツメガエル卵抽出液の複製能の低下として示された(Waga et al. 2001, PNAS)。しかし、真核生物の 3-Pol を使い分けた複製フォークの構成が具体的に捉えられた分けではなかった。この状況に対して、複製開始過程の解明は、酵母を中心にしてめざましく進展し、多くの新しい知見が蓄積した(Bell & Dutta 2001 Annu Rev Biochem)。また複製フォークについても、ヘリカーゼと Pol のカップリングにチェックポイント因子が関与し、複製フォークを安定化する機構が明らかにされてきた(Shimmoto et al. 2009, Genes Cells)。さらに最近、出芽酵母の試験管内複製開始反応が可能になった(Heller et al. 2011, Cell)。ここでは各 Pol が段階的に複製反応に加わることが示された。しかしこの系を使っても、まだ複製フォークでの Pol の使い分けの実体は不明のままであった。

本研究では、これまでクランプとそのローダーの機能解析の過程で蓄積してきたヒト由来の精製 Pol α 、Pol δ 、Pol ϵ を活用することで、リーディング鎖、ラギング鎖間で Pol を使い分ける生化学的背景を明らかにすることをめざした。

2. 研究の目的

真核生物の複製フォークは染色体ダイナミクスの分子基盤であり、細胞の機能プログラムの決定要因となっている。この複製フォークでは Pol α 、Pol δ 、Pol ϵ の 3 種によるリーディング鎖、ラギング鎖の協同的合成モデルが提唱されている。しかし複製フォークでの Pol の使い分けの実体は不明のままである。そこで精製されたヒトの複製フォークの主要な構成因子を組み合わせて、3 種の精製 Pol で構成される真核生物型複製フォークの反応過程の再現をめざした。これによってリーディング鎖、ラギング鎖間で、機能の異なる Pol が使い分けられるしくみの生化学的背景を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ヒト複製フォーク複合体の再構築に必須な複製型ヘリカーゼ CMG 複合体を構成する 11 個のサブユニットを発現ベクターに組み込んで、ヒト 293T 細胞内で共発現を行なう。この細胞抽出液から複数のペプチドタグを使った精製を行ない、11 個のサブユニットで構成される複合体を選択的に精製する。

(2) CMG 複合体のヘリカーゼ活性を確認し、精製した Pol α 、Pol δ 、PCNA、クランプローダー複合体を組み合わせて、機能的ヒト複製フォークの DNA 合成系の再構築を試みる。

(3) ヒト Ctf18-RFC と Pol の複合体形成時の PCNA 装着活性について、オリゴ DNA を結合した beads 使った pulldown assay で、多様な条件下で解析し、複合体形成と PCNA 装着の関係を解析する。

(4) 光架橋反応を使い、PCNA 装着反応時の Ctf18-RFC、Pol の DNA 上の挙動を解析する。さらに Pol の DNA 合成状態を再現できる DNA 基質を調製し、これを使って Pol の DNA 合成と結合している Ctf18-RFC の PCNA 装着の促進の関係を解析する。

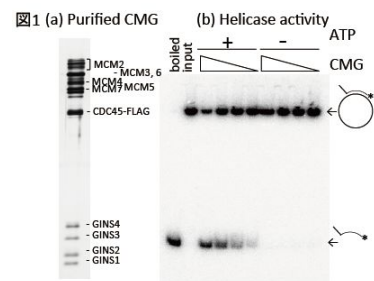
(5) Pol の Ctf18-RFC との複合体形成、PCNA 装着と連携させて Pol の DNA 合成活性を解析し、リーディング鎖に必要な特性と Ctf18-RFC による PCNA 装着とのつながりを解析する。

以上よりリーディング鎖、ラギング鎖間で、機能の異なる Pol が使い分けられるしくみの生化学的背景を、それぞれに使われる PCNA ローダーの特性と関連づけて明らかにする。

4. 研究成果

(1) ヒト 293T 細胞に 11 種類のプラスミドを導入し CMG 複合体のサブユニットを共発現した。この抽出液から、GSH カラム、PreScission による切断、抗 FLAG 抗体カラムを経て、高度に精製された複合体を得た。さらにこれに高いヘリカーゼ活性があることを確認した (図 1)。

(2) Ctf18-RFC と Pol は、複合体を形成して DNA 3'末端に協同的に安定な結合をし、その結果、Ctf18-RFC による PCNA ローディングが促進されることを示した (図 2)。このことから、Pol ϵ ・Ctf18-RFC 複合体は、リーディング



(2) Ctf18-RFC と Pol は、複合体を形成して DNA 3'末端に協同的に安定な結合をし、その結果、Ctf18-RFC による PCNA ローディングが促進されることを示した (図 2)。このことから、Pol ϵ ・Ctf18-RFC 複合体は、リーディング

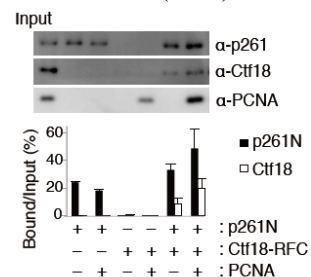


図2:ギャップ構造を持つ環状DNAに対して Pol ϵ (p261N)の有無でCtf18-RFCによる PCNA装着と各因子のDNA結合を解析した。下に示した組み合わせ時のDNA上の各因子の結合量をイムノプロットで検出定量した。

鎖 Pol の構成要素として機能することを提唱した。

(3) 光架橋反応の解析の結果、Ctf18-RFC・Pol 複合体は DNA 3'末端に通常、Pol が結合し、PCNA 装着反応時に一時的に Ctf18-RFC と入れ替ることを示した。さらに、Pol の DNA 合成状態を再現できる DNA 基質を使うことで、Pol が DNA 合成状態になった時に

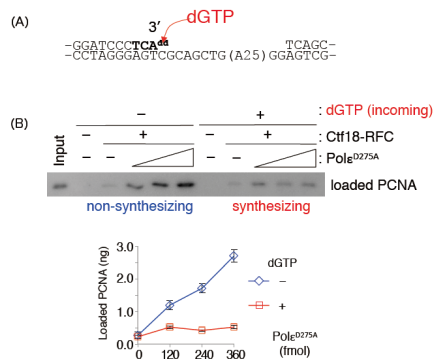


図3: (A) PolεのDNA合成状態を再現するギャップDNA基質。3'末端がdAMPで、次のヌクレオチドdGTP存在下でDNA合成状態になる。(B) PolεのDNA合成状態(+dGTP, synthesizing)では、non-synthesizing (-dGTP)と比べてPolεによるCtf18-RFCの効率よいPCNAの装着が抑制される。

Ctf18-RFCのPCNA装着とPolのDNA合成は相互排他的であることが明らかになった。

(4) PolのCtf18-RFCとの複合体形成、PCNA装着と連携させてPolのDNA合成活性を解析した結果、Pol・Ctf18-RFC・PCNA 3者複合体形成時に最も効率の良いDNA合成を行なうことを見出した。さらに、PolはRFCによってより

効率よくDNA合成を行なうのに対して、PolはCtf18-RFCによって効率よくDNA合成を行なうPCNAローダーの使い分けがあることが明らかとなった(図4)。

以上よりPol・Ctf18-RFC複合体は、リーディング鎖Polの構成要素として機能すること、さらにPol状態に運動して、リーディング鎖側DNA合成の維持のために、Ctf18-RFCによってPCNA装着がリーディング鎖側へ能動的に行なわれることを示した(図5)。

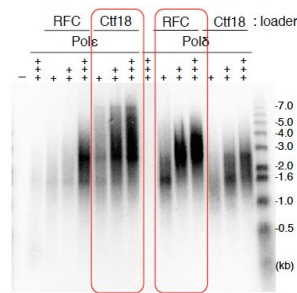


図4: PolδがRFCによってより効率よくDNA合成を行なうのに対して(右赤枠)、PolεはCtf18-RFCによって効率よくDNA合成を行なう(左赤枠)。

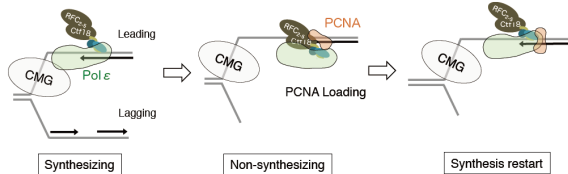


図5: PolεがDNA合成を中断した時に結合したCtf18-RFCがPCNAを装着してDNA合成を再開する。

これによりRFCによるラギング鎖側だけの装着でなく、2種類のPCNAローダーによって両鎖への協調的なPCNA装着が行なわれることになる。これは機能の異なる2種類のPCNAローダーが複製フォークにおけるPol

の使い分けにも重要な役割を持つことを示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計15件)

すべて査読あり。*コレスポンディングオーサー

1. Tsuda M, Terada K, Ooka M, Kobayashi K, Sasanuma H, Fujisawa R, Tsurimoto T, Yamamoto J, Iwai S, Kadoda K, Akagawa R, Huang SN, Pommier Y, Sale JE, Takeda S, *Hirota K. (2017) The dominant role of proofreading exonuclease activity of replicative polymerase ε in cellular tolerance to cytarabine (Ara-C). *Oncotarget*. 10.18632/oncotarget.16508.
2. Fujisawa R, Ohashi E, Hirota K, *Tsurimoto T (2017) Human CTF18-RFC clamp-loader complexed with non-synthesising DNA polymerase ε efficiently loads the PCNA sliding clamp. *Nucleic Acids Res.* 10.1093/nar/gkx096.
3. Kawasoe Y, Tsurimoto T, Nakagawa T, Masukata H, *Takahashi TS. (2016) MutSa maintains the mismatch repair capability by inhibiting PCNA unloading. *Elife*. 5, e15155. 10.7554/eLife.15155.
4. Yang CC, Suzuki M, Yamakawa S, Uno S, Ishii A, Yamazaki S, Fukatsu R, Fujisawa R, Sakimura K, Tsurimoto T, *Masai H. (2016) Claspin recruits Cdc7 kinase for initiation of DNA replication in human cells. *Nat Commun*. 7, 12135. 10.1038/ncomms12135.
5. Hirota K, Tsuda M, Mohiuddin, Tsurimoto T, Cohen IS, Livneh Z, Kobayashi K, Narita T, Nishihara K, Murai J, Iwai S, Guilbaud G, Sale JE, *Takeda S. (2016) In vivo evidence for translesion synthesis by the replicative DNA polymerase δ. *Nucleic Acids Res.* 44, 7242-7250. 10.1093/nar/gkw439.
6. Okimoto H, Tanaka S, Araki H, Ohashi E, *Tsurimoto T (2016) Conserved interaction of Ctf18-RFC with DNA polymerase ε is critical for maintenance of genome stability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells*. 21, 482-491. 10.1111/gtc.12356.
7. Kawakami H, Ohashi E, Tsurimoto T, *Katayama T. (2016) Rapid Purification and Characterization of Mutant Origin Recognition Complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Front Microbiol*. 7, 521 /fmicb.2016.00521.10.3389/fmicb. 2016. 00521
8. Kawakami H, Ohashi E, Kawamoto S, Tsurimoto T, *Katayama, T. (2015) Specific binding of eukaryotic ORC to DNA replication origins depends on highly conserved basic residues. *Scientific Reports*, 5, 14929
9. Le HP, Masuda Y, Tsurimoto T, Maki S, Katayama T, Furukohri A, *Maki H. (2015) Short CCG repeat in huntingtin gene is an obstacle for replicative DNA polymerases,

- potentially hampering progression of replication fork. *Genes Cells*. 20, 817-833.
10. Takeishi Y, Iwaya-Omi R, Ohashi E, *Tsurimoto T. (2015) Intramolecular Binding of the Rad9 C Terminus in the Checkpoint Clamp Rad9-Hus1-Rad1 Is Closely Linked with Its DNA Binding. *J Biol Chem*. 290,19923-19932.
 11. Hirota K, Yoshikiyo K, Guilbaud G, Tsurimoto T, Murai J, Tsuda M, Phillips LG, Narita T, Nishihara K, Kobayashi K, Yamada K, Nakamura J, Pommier Y, Lehmann A, Sale JE, *Takeda S.(2015) The POLD3 subunit of DNA polymerase δ can promote translesion synthesis independently of DNA polymerase ζ . *Nucleic Acids Res*. 43, 1671-1683, 10.1093/nar/gkv023.
 12. *Ohashi E, Takeishi Y, Ueda S, Tsurimoto T. (2014) Interaction between Rad9-Hus1-Rad1 and TopBP1 activates ATR-ATRIP and promotes TopBP1 recruitment to sites of UV-damage. *DNA Repair (Amst)*. 21, 1-11, 10.1016/j.dnarep.2014.05.001.
 13. Sun Q, Tsurimoto T, Juillard F, Li L, Li S, De León Vázquez E, Chen S, *Kaye K. (2014) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus LANA recruits the DNA polymerase clamp loader to mediate efficient replication and virus persistence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111, 11816-11821, 10.1073/pnas.1404219111.
 14. Nakao S, Zhang S, Vaara M, Syväoja JE, Lee MY, Tsurimoto T, Karran P, *Oda S. (2013) Efficient long DNA gap-filling in a mammalian cell-free system: a potential new in vitro DNA replication assay. *Biochimie*. 95, 320-328. 10.1016/j.biochi.2012.09.031. E.
 15. *Strzalka W, Bartnicki F, Pels K, Jakubowska A, Tsurimoto T, Tanaka K. RAD5a ubiquitin ligase is involved in ubiquitination of *Arabidopsis thaliana* proliferating cell nuclear antigen (2013) *J. Exp. Bot*, 64, 859-869 10.1093/jxb/ers368.

〔学会発表〕(計 21 件)

口頭発表の抜粋

1. 大橋 英治、岩田 直也、釣本 敏樹 Rad9 C 末端による 9-1-1 クランプへの蛋白質結合の制御 第 34 回染色体ワークショップ・第 15 回核ダイナミクス研究会合同 2017 年 1 月 11 日-13 日 木更津
2. 釣本 敏樹 藤澤 遼 大橋英治 Pol を足場にした Ctf18-RFC による動的 PCNA ローディング 第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム 2016 年 11 月 30 日 横浜
3. 大橋英治、岩田直也、釣本敏樹 PCNA 結合蛋白質の Rad9-Hus1-Rad1 リングとの結合メカニズム 第 39 回日本分子生物学会年会シンポジウム 2016 年 12 月 2 日 横浜
4. Fujisawa R, Ohashi E, Hirota K, Tsurimoto T Ctf18-RFC bound to Pol loads PCNA

- efficiently. The 10th 3R Symposium 2016 年 11 月 13-17 日、Matsue, Japan
5. Ohashi E, Iwata N, Tsurimoto T Intramolecular folding of Rad9 C-terminal tail in the Rad9-Hus1-Rad1 checkpoint clamp regulates its interaction with DNA damage response proteins. The 10th 3R Symposium 2016 年 11 月 13-17 日、Matsue, Japan
 6. Tsurimoto T, Ohashi E, Fujisawa R, Takeishi Y クランプ・ローダー系による進行障害時の複製フォークの機能制御 第 38 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2015 年 12 月 1-4 日 神戸
 7. Ohashi E, Takeishi Y, Tsurimoto T. Rad9 C 末端によるチェックポイントクランプ Rad9-Hus1-Rad1 の機能制御機構 第 38 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2015 年 12 月 3 日 神戸
 8. Ohashi E, Takeishi Y, and Tsurimoto T. Rad9 C 末端による Rad9-Hus1-Rad1(9-1-1)の DNA 損傷応答制御機構第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2015 年 10 月 19 日 焼津
 9. Ryo Fujisawa, Ohashi E, Tsurimoto T. Pol ϵ に結合した Ctf18-RFC の PCNA ローディング過程の解析. 第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2015 年 10 月 20 日 焼津
 10. Ohashi E, Takeishi Y, Ueda S, Tsurimoto T. DNA 損傷応答因子 ATR-ATRIP, Rad9-Hus1-Rad1, TopBP1 の 3 者間結合による ATR 活性化機構 第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2014 年 11 月 27 日 横浜
 11. Kawakami H, Kawanishi T, Ohashi E, Tsurimoto T, Katayama T, 出芽酵母 ORC 複合体の分子内外クロストークの同定 第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2014 年 11 月 27 日 横浜
 12. Fujisawa R, Tsurimoto T ヒト Ctf18-RFC は Pol ϵ と複合体となって機能的に PCNA をロードする 第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 27 日 横浜
 13. Takeishi Y, Ohashi E, Tsurimoto T The C-terminal of Rad9 associates to the core ring structure of the checkpoint clamp, Rad9-Hus1-Rad1, and regulates its DNA binding activity.第 37 回日本分子生物学会年会 2014 年 11 月 25 日 横浜
 14. Tsurimoto T, Fujisawa R, Ohashi E, Tanaka S, Araki H, Sun Q, Kaye K, Novel mechanisms of PCNA loader complexes to specify their functions. 2014 年 11 月 20 日 The 9th 3R Symposium Gotemba, Shizuoka Japan
 15. Ohashi E, Takeishi Y, Tsurimoto T. The ATR activation through the accumulation of the checkpoint factors and their interactions at the site of DNA damage, 2014 年 11 月 20 日 The 9th 3R Symposium Gotemba, Shizuoka Japan

16. Fujisawa R, Tsurimoto T Interaction of Ctf18-RFC with DNA polymerase ϵ specifies their functional sites for the active PCNA loading, , 2014 年 11 月 19 日 The 9th 3R Symposium Gotemba, Shizuoka Japan
17. Okimoto H, Tanaka S, Araki H, Ohashi E, Tsurimoto T. Roles of loader proteins for coupling between replication and chromosome maintenance. International Conference "Coupling of replication, repair and transcription, and their common mechanism of chromatin remodeling" 2014 年 02 月 05 日 京都
18. Tsurimoto T, Okimoto H, Ryo Fujisawa, Ran Taguri, Ohashi E, Tanaka S, Araki H DNA ポリメラーゼ と PCNA ローダー-Ctf18-RFC のホロ複合体形成とその機能 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2013 年 12 月 3 日 神戸
19. Ohashi E, Takeishi Y, Ueda S, Tsurimoto T Rad9-TopBP1 間の結合は ATR の活性化を介して TopBP1 の DNA 損傷部位への局在を促進する 第 36 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2013 年 12 月 3 日 神戸
20. 沖本寛子、藤澤遼、田栗蘭、大橋英治、田中誠司、荒木弘之、釣本敏樹 ヒトから酵母まで保存された Pol γ /Ctf18-RFC 間相互作用 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2013 11 月 13 日-15 日 仙台
21. 大橋英治、武石幸容、上田聡、釣本敏樹 ヒト TopBP1-Rad9 結合に寄る ATR 活性化を介した TopBP1 の DNA 損傷部位への局在促進 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2013 11 月 13 日-15 日 仙台

〔図書〕(計 2 件)

1. Ohashi E, Tsurimoto T. (2017) Functions of multiple clamp and clamp-loader complexes in eukaryotic DNA replication in "DNA Replication: From Old Principles to New Discovery" Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer. ed. Masai H and Foiani M. in press
2. 釣本敏樹 (2017) 第 4 章分子遺伝学 pp. 57-89 「遺伝学(遺伝子から見た生物) 鷲谷いずみ、桂勳 編」培風館

〔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

<http://seibutsu.biology.kyushu-u.ac.jp/~chromosome/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

釣本 敏樹 (TSURIMOTO Toshiki)

九州大学・理学研究院・教授