

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440002

研究課題名(和文) MCMを中心としたDNA複製因子の集合と機能抑制機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of assembly and inhibition of DNA replication factors including MCM proteins

研究代表者

石見 幸男 (Ishimi, Yukio)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：80159772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：強調すべき新たな成果は以下の3点である。MCM2-7複合体形成に及ぼすMCM4変異の影響については、がん細胞由来の変異が他MCMとの相互作用の変化を通じて複合体形成に影響を与えること、さらに細胞レベルの実験から、変異MCM4の存在がDNA複製に影響を与えることが示された。複製タンパク質の集合については、MCM相互作用因子の多くが、保存性の高いMCM box内に結合することが分かった。その活性によりMCM機能を制御すると考えられる。MCM4のアミノ末端領域は、ヘリカーゼ機能に必要であること、さらに、その領域におけるCDKによるリン酸化がMCM複合体の不安定化を招く可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Following three points should be stressed as novel findings. As to the effects of MCM4 mutations on MCM2-7 complex formation, mutations from cancer cells affect MCM complex formation through changes in interaction with other MCM members. Furthermore, it is suggested that the presence of the mutant MCM4 affects DNA replication in HeLa cells. It has been shown that a number of MCM-interacting proteins bind to conserved MCM-box, suggesting that these proteins regulate MCM function through the activity. The amino-terminal region of MCM4 is shown to be required for DNA helicase activity of MCM4/6/7 complex. It is suggested that the phosphorylation of the region with CDK can destabilize MCM complex.

研究分野：分子生物学

キーワード：MCMヘリカーゼ活性 DNA複製フォーク タンパク質相互作用

## 1. 研究開始当初の背景

膨大な数の複製起点が存在する真核細胞ゲノムにおいて、ゲノム全体に渡って DNA 複製を一度のみに限定させるために、幾つかのレベルで制御がなされている。それは、(1) G1 期で適度な MCM2-7 複合体をゲノム上に形成させること、(2) ゲノム上の MCM2-7 複合体の活性化を制御すること、そして、(3) DNA 複製終結点で MCM2-7 ヘリカーゼの機能を終了させること、であるが、それらの分子機構は解明されていない。それらの点に関連して以下の3点に注目して解析する。

### (1) MCM3 の核局在化と MCM2-7 複合体形成

細胞周期の G1 期においてゲノム DNA に十分な MCM2-7 複合体が形成されないと、DNA 複製が S 期で完了せず、M 期で、細胞がん化の原因となる DNA 構造不安定化が生じる。G1 期において、細胞分裂を経て再利用される MCM タンパク質と新たに合成される MCM タンパク質は、細胞質で MCM3/5 などのサブ複合体を形成してから核に移行する。核で形成された MCM2-7 複合体が複製起点近傍に集合し、複製前複合体を形成する。高等真核細胞において、MCM タンパク質の核移行には、MCM2 と MCM3 のもつ核局在化シグナル(NLS)が機能すると考えられる。一方で、MCM3 には明確な核外移行シグナル(NES)が存在する。MCM3 内の相反する両活性をうまく制御することが、MCM2-7 複合体形成に必要と考えられるが、その実体は不明である。一方で、MCM2-7 複合体形成における MCM 間相互作用を、MCM4 と MCM6 の結合に焦点をあてて解明する。これまでに我々は、マウスでがんを引き起こす MCM4 変異(F346I)は、MCM6 との相互作用が弱まり、核局在の効率が下がることを報告している(Watanabe et al., 2012)。

### (2) CDK 依存性の DNA 複製開始タンパク質の集合

DNA 複製開始の際に、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)のタンパク質リン酸化反応により、巨大な複製タンパク質複合体が複製起点近傍で形成されることが、先行する出芽酵母での研究から示されている(Araki, 2011)。これらの複製タンパク質については、かなりの割合で、その相同タンパク質が哺乳類細胞で同定されているが、未確定なものがある。さらに、相同性の程度から、相同体と思われる因子が、出芽酵母と同じ機能を発揮するかどうか不明である。具体的には、出芽酵母 Sld2 の相同体の可能性のある RECQL4、および Sld3 の相同体と考えられる TOP-BP1(Kumagai et al., 2010)について、そのことが当てはまる。

### (3) MCM4 リン酸化による MCM2-7 複合体の DNA からの解離

DNA 複製の開始時に、MCM2-7 複合体は活性化され、鋳型 DNA を巻き戻す複製ヘリカーゼとして機能する。MCM ヘリカーゼがゲノム上の DNA 複製終結点などに到達した時に、そのヘリカーゼ機能は抑制されなければならない。さもないと、複製が終了した2本鎖 DNA が再び巻き戻され、DNA 構造不安定化に直結する重複した DNA 複製が起こる。この重複複製の阻止には、様々な因子が機能するが、その中で CDK が最も重要な働きをもつ。CDK は S 期において、ゲノム DNA に MCM 複合体を結合させる MCM ローダー因子などを不活性化することで DNA 複製開始の抑制に働くことが分かっている。一方で、我々は、CDK が MCM4 をリン酸化することで MCM4/6/7 ヘリカーゼ活性を阻害することを見出している(Ishimi et al., 2003)。

## 2. 研究の目的

1. で述べたように、(1)ヒト MCM3 の核局

在化と MCM2-7 複合体形成、(2) CDK 依存性の DNA 複製開始タンパク質の集合、そして(3) MCM4 リン酸化による MCM2-7 複合体の DNA からの解離、という3点に焦点をあてて解析することで、DNA 構造安定化に必要な新たな DNA 複製制御機構を明らかにする。(2)においては、CDK 依存的なヒト複製因子の集合について精製タンパク質を用いて明らかにする。また(3)では、MCM2-7 複合体の DNA 結合性に対する MCM4 リン酸化の負の効果(Moritani & Ishimi, 2013)を、リン酸化部位レベルで明らかにする。同時に、リン酸化部位変異 MCM4 発現細胞において DNA 重複複製が惹起されることを確認する。これらの実験から、DNA 複製フォーク終結点での MCM ヘリカーゼの解離、および G2 期での MCM 複合体の DNA 再結合阻止における、CDK による MCM4 リン酸化の機能が、リン酸化部位レベルで理解できる。

### 3. 研究の方法

#### **(1) MCM3 の核局在化と MCM2-7 複合体形成**

ヒト細胞に内在する MCM タンパク質の核局在性と細胞周期の関係を、特異抗体を用いた免疫細胞染色法により調べることで、MCM 複合体の核外移行を検討する。MCM の核外移行について、同調した細胞を分画し、タンパク質の分布を調べることで検討する。並行して、MCM3 内に存在する2か所の核局在シグナルと核外移行シグナルの意味を調べる。外来性ヒト MCM3-GFP 融合タンパク質が主に核に局在する結果を得ているので、シグナルに変異を導入した MCM3 の局在の調査から始める。

MCM2-7 複合体形成については、MCM4 と MCM6 の結合に焦点を当てて解析する。点変異 MCM4 の発現系を昆虫細胞とヒト細胞において構築し、変異 MCM4 の MCM6 結合性と核局在性を調べる。変異を導入する箇所については、これまでにヒトがん組織で同定されている変異箇所の中から、様々な生物間で保存され、構造上の重要性が示唆されているものを選

ぶ。変異 MCM4 の MCM4/6/7 ヘリカーゼ活性に及ぼす影響を調べるとともに、変異 MCM4 をヒト HeLa 細胞で発現させ、細胞 DNA 複製に対する影響も調べる。

#### **(2) CDK 依存性の DNA 複製タンパク質の集合**

ヒト TOP-BP1 タンパク質を、付加したタグを利用して、過剰発現させた昆虫細胞の抽出液より精製し、それをビーズに固定化する。ヒト TRESLIN と RECQL4 タンパク質を同様の方法で精製する。精製 TRESLIN あるいは RECQL4 と、ビーズ固定化 TOP-BP1 との結合をプルダウン実験により調べる。この時に、予め TRESLIN および RECQL4 を CDK でリン酸化したものをを用いる。試験管内でリン酸化させる実験(Moritani & Ishimi, 2013)とともに、TRESLIN あるいは RECQL4 を、昆虫細胞で CDK とサイクリンとともに発現させてリン酸化させる。逆に、試験管内で脱リン酸処理した TRESLIN と RECQL4 も使用する。

MCM2-7 ヘリカーゼの機能は、様々な環境において様々な因子により制御される。それら MCM 相互作用因子と MCM2-7 との結合を、昆虫細胞内での共発現と免疫沈降実験により明らかにする。さらに、各 MCM 内での結合領域を調べるために、断片化 MCM6 などの発現系を構築し、それら断片化 MCM と相互作用因子との結合を同様の方法で調べる。

#### **(3) MCM4 リン酸化による MCM2-7 複合体の DNA からの解離**

ヒト MCM4 のアミノ末端領域には、12か所の CDK リン酸化受容部位が存在する。その中の6か所(3, 7, 19, 32, 54 と 110 位)のアラニン変異(6A)により CDK によるリン酸化が大幅に低下し、MCM2-7 の DNA 結合が CDK 添加に抵抗性を示す (Moritani & Ishimi, 2013)。これら6か所の中で、DNA からの解離に特に重要なリン酸化部位を特定するために、変異数の少ない変異 MCM4 を作成し、それを含む変異 MCM2-7 複合体を調製する。それら複合

体の DNA 結合性を CDK 存在下に、ゲルシフト実験により調べる。変異 MCM4 を含む MCM2-7 複合体は、バキュロウイルスを使って過剰発現させた昆虫細胞の抽出液より、付加したタグを利用して精製した。また、MCM4 内の残りのリン酸化受容部位(全部で6部位)の2部位にアラニン変異を導入した変異 MCM4(8A)を含む変異 MCM2-7 を調製した。この方法で、CDK による MCM2-7 の DNA 結合阻害に関わる、MCM4 内のリン酸化部位を同定することを試みた。

アラニン置換変異とともに、MCM4 アミノ末端領域欠損体や、上記6リン酸受容部位を、リン酸を模擬するグルタミン酸置換変異体(6E)を作成し、MCM4/6/7 複合体形成と DNA ヘリカーゼ機能に対する影響を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) MCM3 の核局在化と MCM2-7 複合体形成

MCM2 と 3 の局在を非同調細胞で調べると、両者とも間期では核への局在化が観察された。MCM3 の核局在化配列と想定される部位の2アミノ酸を置換した変異体でも核局在性は変わらなかった。MCM2 についても同様の解析を行い、想定される核局在化配列の2アミノ酸置換 MCM2 は野生型と同様に核局在化を示した。一方で、MCM2 のアミノ末端の欠損体(delta 1-120)の GFP 融合タンパク質の核移行は認められなかったことから、欠損した領域に存在する核局在化配列が MCM2 の核局在化に必要であることが分かった。

ヒトがん組織細胞で検出された点変異 MCM4(G364R)を含む MCM4/6/7 複合体を調製し、ヘリカーゼ活性を測定したところ、野生型の1/2程度の活性を示した。この活性低下の原因は、DNA 結合性や ATP 分解活性以外の機能不全に起因すると考えられる。つまり、DNA 上を移動する段階で不都合がある可能性が考えられる。次に、がん細胞由来の MCM4 変異で、MCM box 内で起こった G486D 変異の

MCM2-7 複合体形成に対する影響を調べた。隣接するサブユニットである MCM6 と MCM7 とからできる MCM4/6/7 の6量体形成の効率が、野生型 MCM4 の場合に比べ、本変異 MCM4 では大変に低下することが分かった。そのために MCM4/6/7 の DNA ヘリカーゼ活性の測定には至らなかった(図1)。その原因の一つは、MCM7 との結合の低下であった。ヒト HeLa 細胞で本変異 MCM4 を発現させると、異常な核形態を示す細胞が検出された。変異 MCM4 の存在が MCM2-7 複合体形成に負に働き、DNA 複製が正常に進まなかった可能性が考えられる。

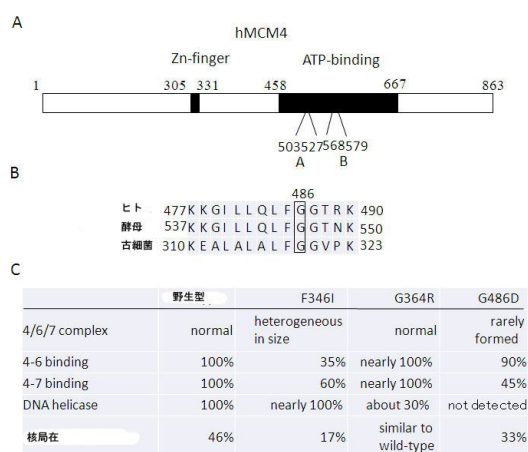


図1 .G486Dを含むがん細胞由来 MCM4 点変異の影響：A.ヒト MCM4 の一次構造の特徴を示す。B.ヒト MCM4 の G486 が、出芽酵母や古細菌でも保存されていることを示す。C. G486Dを含む点変異 MCM4 の性質を野生型と比較して示す。

##### (2) CDK 依存性の DNA 複製タンパク質の集合

ヒト TOP-BP1, RECQL4 そして TRESLIN を精製した。TOP-BP1 タンパク質固定化ビーズを作成し、RECQL4 と TRESLIN との結合を調べたところ、ビーズと RECQL4 との結合が認められたが、RECQL4 に CDK によるリン酸化を誘導した場合でも、その結合に変化は見られなかった。一方で、TRESLIN のビーズへの結合は、CDK 存在下と非存在下において、いずれの場合も認められなかった。

MCM2-7 ヘリカーゼ機能は様々な因子によ

り調節される。MCM2-7 相互作用因子は、MCM2-7 タンパク質に対し結合性を示すが、中でも、MCM6 は多くの相互作用因子と結合する。そこで、MCM6 の細分化した断片を作成し、相互作用因子の結合する MCM6 内領域を決定した。調べた 6 種の因子はすべて、MCM6 のカルボキシ末端領域(アミノ酸番号 326-821)に結合した(図 2)。CDC45 と RPA2 は、Walker motif A を含む領域(326-413)にも結合した。さらに、近年 MCM 相互作用因子として同定された、低酸素誘導因子(HIF-1A)と MCM2-7 との結合について調べた。HIF-1A はすべての MCM サブユニットに結合できるが、その中で特に MCM3 と MCM5 との結合性が強いことが分かった。また、断片化した MCM3 と MCM6 との結合を調べる実験から、HIF-1A は MCM ドメインを含む C 末領域に親和性があることが分かった。

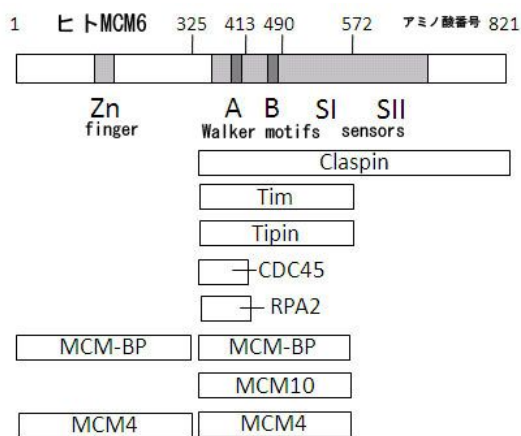


図 2 . MCM 相互作用因子の MCM6 内結合部位  
各 MCM 相互作用因子と断片化 MCM6 との結合を、昆虫細胞共発現と引き続く免疫沈降実験より調べた。各因子との結合性の見られた最小 MCM6 断片を示す。

### (3) MCM4 リン酸化による MCM2-7 複合体の DNA からの解離

これまでの 6 変異 MCM4 に加え、それらの部位の中の 1, 2, 3 と 5 変異体を作成した。また 6 変異に、88 と 94 位 A 変異を加えた 8 変異 MCM4 を作成し、それらの MCM4/6/7 複合体の DNA 結合性を CDK 共存下で調べた。その結果、

変異数を増やすに従い徐々に、CDK による DNA からの解離に複合体は抵抗性を示した。

MCM4 のアミノ末端領域には多数の CDK リン酸化受容部位が存在する。次に、この領域を欠損させた MCM4 を作成し、MCM4/6/7 ヘリカーゼ活性に対する影響を調べた。アミノ酸番号 1-35 および 1-122 の領域を欠損させた MCM4 を含む MCM4/6/7 複合体を調製した。これらの複合体は、野生型に比べ低いレベルの DNA ヘリカーゼ活性を示した。よって、アミノ末端領域が活性に必要であることが分かった。リン酸化受容部位を欠いた MCM4 を含む MCM4 $\Delta$ 122/6/7 複合体については、DNA ヘリカーゼ活性とともに一本鎖 DNA 結合能に低下が見られた。この MCM4 領域に存在する CDK リン酸化受容部位 6 か所を、リン酸化を模擬するグルタミン酸に置換した変異 MCM4 の性質を調べた。本変異 MCM4 は、MCM4/6/7 の複合体形成が不調で、変異 MCM4 の分解も起きていることが分かった。つまり、CDK による MCM4 リン酸化は MCM 複合体を不安定化させる可能性が考えられる。

### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Tatsumi, R. and Ishimi, Y. (2017) An MCM4 mutation detected in cancer cells affects MCM4/6/7 complex formation. **J. Biochem.** 161: 259-268.(査読有)

Hosoi, A., Sakairi, T. and Ishimi, Y. (2016) Binding of MCM-interacting proteins to ATP-binding site in MCM6. **Res. Rep. Biol.** 7: 31-40. (査読有)

Ishimi, Y. and Irie (2015) G364R mutation of MCM4 detected in human skin cancer cells affects DNA helicase activity of MCM4/6/7 complex. **J. Biochem.** 157: 561-569. (査読有)

Kusunoki, S. and Ishimi, Y. (2014) Interaction of human minichromosome maintenance protein-binding protein with minichromosome maintenance 2-7. **FEBS J.** 281: 1057-1067. (査読有)

[学会発表](計 3 件)

細井淳駿、酒入拓、石見幸男、MCM 相互作用因子は MCM6 の ATP 結合部位に結合する、日本分子生物学会、2016/11/30 ~ 12/02、横浜市

石見幸男、MCM ヘリカーゼの保存性と多様性、日本進化学会第18回東京大会、2016/8/25～8/28、東京都目黒区

石見幸男、入江大輝、ヒトがん組織細胞由来 MCM4 点変異の性質、日本分子生物学会、2014/11/25～27、横浜市

〔図書〕(計 0 件)

〔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://idna.sci.ibaraki.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石見 幸男 (Ishimi, Yukio)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：80159772

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし