

研究課題別事後評価結果

1. 研究課題名

細胞増殖における染色体複製の型の多様性と複製装置の活性化の分子機構

2. 研究代表者名及び主たる研究参加者名（研究機関名・職名は研究参加期間終了時点）

研究代表者	新井 賢一	東京大学医科学研究所 所長・教授
主たる研究参加者	正井 久雄	東京都臨床医学総合研究所 室長
	中畑 龍俊	京都大学医学部 教授
	宮武 昌一郎	東京都臨床医学総合研究所 室長
	横田 崇	東京大学医科学研究所 客員教授

3. 研究内容及び成果

個体形成の過程で、全能性の胚幹細胞は体細胞系列の各種幹細胞と生殖細胞を生じ、その数は染色体複製により制御される。複製は通常ゲノム上の定点から開始し、秩序正しい細胞周期の進行と連動しているが、受精卵の初期発生に見られる特異性の低いDNA複製のように、発生や分化段階に応じて、その複製起点の使用頻度や塩基配列特異性を柔軟に変化しうる。これまで、各種刺激に応答して誘導される染色体複製の様式とその制御機構についての知見は皆無である。そこで我々はこの知見を得るために、サイトカイン受容体を介する増殖シグナルの伝達機構について解析してきた。真核細胞においても、性質の異なる複数の複製型が存在し、細胞増殖の制御やゲノム情報の保持において、それぞれ独自の役割を果たしている可能性が考えられる。

本研究では、真核細胞の染色体複製とその制御機構をシグナル伝達の最終標的として、また各種細胞型における遺伝子発現の特異性とクロマチン構造と複製様式の関連などの視点から、理解することを目的とし、以下の目標を設定した。①血球細胞を用いて、サイトカイン刺激から染色体複製の誘導にいたるシグナル伝達経路をさらに詳細に解析する。②なかでも、染色体複製開始のマスタースイッチであるCdc7キナーゼの活性制御と、それによる複製起点活性化の制御機構を詳細に解析する。③さらに、組み換え酵素依存性の染色体複製の機構と真核細胞における類似した経路の存在について検討する。④また、種々の細胞型における染色体複製起点の分布を比較し、複製様式の多様性とその忠実度及びそれらを担う複製装置について、転写活性化とクロマチン構造の変換との相関に注目しつつ解析する。

本研究実施の結果、以下の結果が得られた。

(1) Cdc7キナーゼグループ

Cdc7-Dbf4キナーゼ複合体の複製装置活性化における機能解析を行い、以下のことを明らかにした。

Cdc7-Dbf4キナーゼ複合体は酵母からヒトまで真核細胞に広く保存されており、Cdcキナーゼ活性は細胞周期の制御下にあるが、これはDbf4/ASK活性制御分子の発現が転写レベル及びタンパク質レベルで細胞周期制御を受けるところによる。その転写は、E2FとSp1転写因子により制御される。Dbf4/ASKは種を越えて保存されるプロリンモチーフとZnフィンガーモチーフを介してCdc7に結合、活性化し、Cdc7-Dbf4キナーゼはチェックポイントシグナル伝達及びS期の染色体構造の維持に関与する。また、Cdc7の重要な基質はMCMタンパク質であり、CDKとCdc7が協調的にMCM2分子上の特定の残基をリン酸化することにより、複製開始が活性化される。

マウス胚性細胞でCdc7遺伝子を失活すると、DNA複製が直ちに停止すると同時にp53依存的に細胞死が誘導された。さらに、Cdc7欠損マウスは胎生3.5~6.5日の間に死亡するが、p27変異を共存させCdk活性を増加させると胎生8.5日まで生存できた。この事実は、初期発生の過程ではCdk活性が部分的にCdc7活性の喪失を相補できる可能性を示唆する。また、Cdc7遺伝子の改変により、生殖細胞の発生の停止及び個体成長の阻害が観察された。

(2) レセプターシグナル伝達グループ

増殖因子受容体下流の増殖シグナル伝達経路の解析（サイトカインによる血球細胞における増殖シグナルの同定）を行い、以下のことを明らかにした。

GM-CSF受容体から伝達される細胞増殖、抗アポトーシス、種々の遺伝子発現など、すべての活性にJak2チロシンキナーゼの活性が必須であること、ポリオマウイルスレプリコンの複製開始をモデルとして、増殖因子に応答した複製開始促進の機構を解析した結果、MAPキナーゼ、STAT5の活性化が複製の開始には不要であること、GM-CSF受容体β鎖の細胞膜貫通部分の直下（box1/2）とJAK2を介するシグナル経路があれば、複製の開始には充分であることが明らかになった。また、box1/2を介するシグナル伝達経路あるいはMAPキナーゼを介する経路のいずれかが活性化を受けていれば、γ線照射あるいはサイトカイン除去で誘導される細胞死が回避され、血液細胞が生存することも明らかとなった。また、α鎖の細胞内領域は細胞増殖シグナルの伝達には必須ではないが、β鎖細胞内ドメイン8個のチロシン残基は、おのおの異なるあるいは重複するシグナル伝達分子を活性化することが示された。これらのチロシン残基は細胞レベルでは染色体複製の誘導には必須ではないが、個体内では赤芽球の形成と胸腺分化における増殖抑制に関与する。

GM-CSF受容体野生型及び各種変異体のトランジェニックマウスを作製したところ、GM-CSFの刺激により、すべての系列の血球細胞の増殖が促進された。

シグナル伝達分子の人為的二量体化システムを構築し、モデル系としてJAK2について細胞膜直下あるいは細胞質で人為的に活性化させる系を構築したところ、細胞膜直下でのJAK2の二量体化が細胞増殖、生存を維持することが明らかとなった。さらに、二量体化システムを使ったライブラリーを構築し、増殖あるいは生存に関する新規遺伝子のクローニングを行った。その結果、HAT1（ヒストンアセチル転移酵素）のマウスホモログなどが単離された。

JAK2を過剰発現した結果、JAK2以外の因子が細胞の増殖の制御にかかわっていることが示唆された。そこで、GM-CSF受容体β鎖のbox1/2領域の組み換え蛋白質を作成して会合分子を探索したところ、G2/M制御因子であるMAD2が結合することを見いだした。

加えて、STAT5分子はサイトカイン刺激を受けなくても、単量体で細胞質・核の間を輸送されることも見出した。

(3) 組み換えDNA複製グループ

組み換えと共役したDNA複製機構の解析（大腸菌を用いた反応機序の酵素学的解析、酵母、動物細胞からの新規遺伝子の単離）を行い、以下のことを明らかにした。

組み換え依存性DNA複製を開始するPriAタンパク質は、N端のDNA結合ドメインとC端のヘリカーゼドメインから構成され、組み換え中間体への特異的な結合には両者の存在が必要とされること、PriAのATP結合/ヘリカーゼモチーフは組み換え依存性DNA複製に必須であること、が示された。また、PriAの真核細胞における増産は強い増産阻害を誘導することから、PriAの標的サイトが真核細胞内ゲノムにも存在することが示唆された。

(4) 転写と複製グループ

複製と転写の共役機構の解析（マウス染色体11q領域及びヒト染色体5q領域をモデルとした、クロマチン構造改変と遺伝子発現調節及び複製起点活性化パターンの解析）を行い、以下のことを明らかにした。

Th2サイトカインがクラスターをなして存在する染色体領域（マウス11q）において、Th2細胞特異的な染色体構造改変を見いだした。この領域はIL-4/IL-13遺伝子間領域に存在し、IL-4、IL-13、IL-5などの協調的な発現誘導に要求される。マウスサイトカインクラスター領域11qに存在するIL-4/IL-13遺伝子近傍に複製起点を同定した。

抗原による活性化刺激と、IL-4及びIL-13受容体の重要なシグナル伝達分子であるSTAT6の活性化により、染色体構造改変の指標のひとつであるTh2特異的なDNaseI高感受性領域（HSS）が誘導され、同時にTh2細胞に分化する。STAT6活性化により誘導される転写因子GATA3の強制発現により、Th2特異的HSSが誘導された。

GATA3の結合配列をIL-4/IL-13遺伝子間領域に同定した。GATA3のふたつのZnフィンガーのうちN末端に位置するものを欠失した変異GATA3は、ゲルシフト法によりDNA結合活性を検出できなかったが、Th2特異的HSSの誘導活性は野生型と同程度検出された。そして、この変異GATA3により、Th2サイトカインであるIL-4は活性化にともない誘導されたが、IL-5は誘導されなかった。

加えて、ヒトサイトカインクラスター5q領域内に存在する、IL-3/GM-CSF遺伝子近傍に複製起点を同定した。この複製起点にORC、Cdc6、MCMなどが結合する。

4. 事後評価結果

4-1. 外部発表（論文、口頭発表等）、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

前述の研究成果は、論文として英文68件、和文39件発表された。うち1999年 Impact Factor Ranking の Original Journal 35位、Review Journal 30位までの雑誌に掲載された論文は以下の通り。

Cell	1報
Mol. Cell	1報
J. Exp. Med.	2報
Trends Cell. Biol.	1報
J. Clin. Invest.	1報
Mol. Cell. Biol.	4報

特に、Fプラスミドゲノム上の一本鎖DNAとしてのみ機能するユニークなプロモーターの発見に関するCellの論文をはじめ、出芽酵母Cdc7キナーゼ類似のヒトのキナーゼ（huCdc7）の発見や、GM-CSF受容体β鎖細胞内ドメインのチロシン残基のシグナル伝達分子の活性化における役割の解明などが高く評価された。学会発表も国内学会41件、国際学会22件行われた。また、特許出願は2件であった。

上記データの如く、研究発表の数も質も十分と云える。特に代表者は、日本国内及び国外（アジア地域を含む）での研究交流の発展に努め大きな成果を挙げたことはよく知られている。

4-2. 得られた研究成果の科学技術への貢献

Cdc7-Dbf4キナーゼ複合体の複製装置の活性化メカニズムの解明は、真核生物におけるDNA複製開始の制御機構の理解に新しい一歩を踏出したと云える。一方、増殖因子受容体（特にGM-CSF）やサイトカインによるシグナル伝達系のネットワークについて新しい知見を発表し、この分野の進歩に貢献している。その他組換えDNA複製、転写と複製との関連についても、新しい発見をし、特に後者は転写因子がクロマチンの構造を変えることによって作用することを見出したのは新しい。応用的には「がん」などの増殖制御に繋がる可能性がある。

4-3. その他の特記事項

多くの新しい方向を開拓して若い研究者を育てた事も高く評価されよう。

[戻る](#)