

研究課題別研究評価

1. 研究課題: 試験管内反応系を用いた分裂酵母複製開始制御機構の解析

2. 研究者名: 升方 久夫

3. 研究のねらい

ゲノム全体を細胞周期あたり1回だけ複製するための複製開始制御は、真核生物のゲノム情報を維持するために必須である。私は複製開始とその制御の分子メカニズムを普遍的に理解するために、高等動物との類似性が多く見られる分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* をモデル系として用い、複製開始点での複製因子複合体形成過程を試験管内で再現することを目指した。

4. 研究成果

(1) 分裂酵母複製開始必須領域の同定

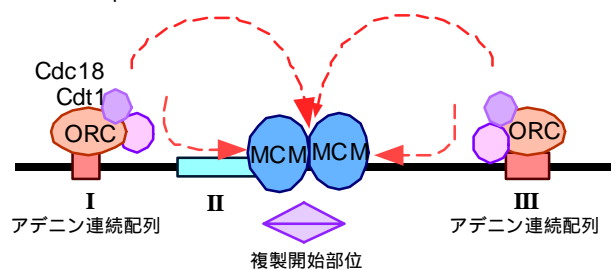
分裂酵母細胞内で、複製開始を引き起こすのに十分な染色体領域である約 1 kb の自律複製断片(ARS) *ars2004* に部分欠失と塩基置換を導入し、3つの複製開始必須領域を同定した。人為的配列を用いた置換実験から、分裂酵母複製開始に最も重要な配列は長いアデニン/チミン連続配列であると結論した。

(2) 染色体複製開始点への複製開始因子の局在

複製開始必須因子である ORC (origin recognition complex) や MCM (minichromosome maintenance) が、染色体上のどこに局在するかを明らかにするために、DNA-タンパク質を架橋後、特異的抗体を用いた免疫沈降により回収する CFhIP 法を用いて解析した。その結果、ORC は細胞周期を通じて複製開始点に結合していたのに対し、MCM は G1 期に発現する細胞分裂サイクル遺伝子の一つ Cdc18 に依存して、G1-S 期にのみ複製開始点に局在した。さらに詳細な解析から、ORC は *ars2004* 内の約 500 bp 離れた2つの必須領域に結合し、MCM はそれらの中間の実際に複製が開始する領域に局在することを見出した。

これらの結果は、高等動物と同様に複製開始に広い領域が必要である分裂酵母を用いることによって初めて明らかになった。

分裂酵母 pre-RC 構造



(3) 試験管内での ORC による複製開始点認識機構の解明

分裂酵母 ORC が複製開始点に直接結合するか否かを明らかにするために、分裂酵母細胞から免疫沈降法により回収した ORC 複合体に *ars2004* を含む標識 DNA 断片を加え、試験管内での結合反応を解析した。その結果、ORC は *ars2004* や他の複製開始点に特異的に結合し、アデニン/チミン連続配列を認識して *ars2004* 内の2ヶ所の必須領域に結合することを証明した。

(4) 試験管内複製開始系の開発

細胞内の解析だけでは複製開始に至る分子メカニズムを解明できない。そこで複製開始点上の高次タンパク質複合体形成と DNA 構造変化を解析する試験管内反応系の条件設定をおこなった。酵母細胞で GST (glutathione-S-transferase)-*lacI* リプレッサー融合タンパクを発現させ、*lacO* オペレーター配列を組み込んだ ARS プラスミドを細胞抽出液から回収し、回収 DNA に ORC が結合していることを確認した。さらに、G1 期で pre-RC 形成を制御できる細胞周期条件を作り出すことに成功した。これらを組み合わせることにより、pre-RC 形成と pre-RC から実際の複製開始に至る過程を試験管内で再現できると考えている。

(5) 複製開始に必須の新規タンパク質因子 Psl3 の機能解析

pre-RC 形成以降の複製開始に至る過程を明らかにするために、MCM や Cdc45 と相互作用する新規因子 Sld3 の分裂酵母ホモログ *psl3* (*S. pombe* of SLD3) を分離し、機能解析を行った。Psl3 は複製開始に必須であり、pre-RC 形成に依存して MCM と相互作用し複製開始点に局在することを示した。温度感受性変異株の解析から Psl3 は Cdc45 を染色体に結合させる機能を持つと同時に、複製伸長反応にも必要であることを見いだした。

5. 自己評価

高等動物の複製開始点に類似性を示す分裂酵母複製開始点の必須構造を明らかにし、さらにその認識機構を解明できたことに満足を感じている。さらに ORC と MCM が複製開始点上の異なる部位に順次結合するという結果を得たことは、分裂酵母解析系のモデルとしての有用性を示せたといえる。しかしながら、ORC 結合反応以降の試験管内反応系の開発は予想された以上に難航し、ようやく道具立てが完了した段階である。変異株を用いて複製開始前の段階で細胞周期を操作する条件を設定し、細胞内から DNA-タンパク質複合体を分離できる手法を確立したことにより、複製前複合体形成、S期シグナルによる複合体の構造と活性の制御機構を解明できる展望が開けた。

6. 領域総括の見解

染色体 DNA の複製は高度に制御されており、その全貌を明らかにすることは生命現象の根幹を理解することである。そこで、単細胞の分裂酵母をモデルに、試験管内での開始制御の再現を目指して、染色体 DNA 上の複製開始領域、また複製開始因子(ORC)とそこに働く各種タンパク質因子を検索し、DNA 複製に必要と思われる基本的諸因子の検出とそれらの作用点の理解に顕著な進歩を見せている。さらにこの間、様々な手法を案出していることから、近い将来に大きな発展が期待される。

7. 主な論文

Takahashi, T. and Masukata, H. Interaction of fission yeast ORC with essential adenine/thymine

stretches in the replication origins. (投稿中).

Ogawa, Y., Takahashi, T. and Masukata, H. (1999). Association of fission yeast Orp1 and Mcm6 proteins with chromosomal replication origins. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 7228–7236.

Okuno, Y., Satoh, H., Sekiguchi, M. and Masukata, H. (1999). Clustered adenine/thymine stretches are essential for the function of a fission yeast replication origin. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 6699–6709.

Ogawa, Y., Okazaki, T. and Masukata, H. (1998). Association of autonomous replication activity with replication origins in a human chromosome. *Exp. Cell Res.* *243*, 50–58.

Obuse, C., Okazaki, T. and Masukata, H. (1998). Interaction of transcription factor YY1 with a replication-enhancing element, REE1, in an autonomously replicating human chromosome fragment. *Nucle. Acids Res.* *26*, 2392–2397.

8. その他

招待講演 10 件、うち 国外5件、国内5件