

DNA 複製の再開抑制機構の解明

- 真核生物の DNA 複製制御に関する生化学的アプローチ -

水島 徹
(岡山大学・薬学部)

1. 研究のねらい

遺伝情報の複製という、生物にとって根本的な役割を担う DNA の複製反応は、細胞増殖の調節点としても重要である。従って、DNA 複製開始の制御機構、即ち、複製開始時に複製開始因子を活性化する機構と、それ以外の時期に複製開始因子を不活性化しておく機構は重要である。私は大腸菌の複製開始因子 DnaA の ATP 結合と ATPase 活性が、DnaA の活性化と不活性化にそれぞれ関与していることを見出した。さきげん研究 21 では、このような複製制御機構が真核生物にも存在するかを検討した。

2. 研究結果及び自己評価

研究結果

(1) ORC と Cdc6p の複合体形成の試験管内再構成系の確立

大腸菌の DnaA に相当する真核生物の因子として、ORC と Cdc6p が考えられた。ORC は、酵母の複製開始点 (origin DNA) に特異的に結合する因子として発見され、ヒトに至るまで真核生物に広く存在することが分かっている。一方で Cdc6p は、細胞周期に伴いその存在量が大きく変化し、DNA 複製制御の中心因子と考えられている。この両者に注目し、これらの ATPase 活性の複製開始制御における役割を明らかにすることを目指した。

真核生物の染色体 DNA 複製開始制御機構の研究は、大腸菌の場合に比べて大変遅れている。それは、その試験管内再構成系が確立されていないため、生化学アプローチが出来ないためである。真核生物の染色体 DNA 複製開始の最初の段階であり、且つ律速段階である ORC と Cdc6p の複合体形成ですら、これまでその試験管内再構成系は確立されておらず、複製開始制御機構の解明を困難にしてきた。そこでまず ORC と Cdc6p の origin DNA 上での複合体形成を、試験管内で再構成することに取り組んだ。数々の条件検討の結果、ORC と Cdc6p の origin DNA 上での複合体形成を精製タンパク質から再構成することに成功した。この再構成系は真核生物の DNA 複製研究のブレークスルーになると考えている。今後、この系を土台にして、酵母染色体 DNA 複製の精製したタンパク質からなる試験管内再構成系を確立したい。大腸菌の場合、oriC DNA 複製再構成系の確立後、数年間でその全体像がほぼ解明された。従って真核生物の複製再構成系を確立できれば、真核生物の DNA 複製機構の解明が急速に進むことが予想される。

(2) ORC の ATPase の機能解析

上記の試験管内再構成系を使って ORC の ATPase の機能解析を行い、ORC と Cdc6p の複合体形成が ATP に依存し、ADP によって阻害されることを見出した。この結果は、ORC あるいは Cdc6p に ATP が結合することが、両者の複合体形成に必須であることを示唆している。そこで次に変異タンパク質を用いた解析を行った。Cdc6p の ATP 結合活性不能変異タンパク質が、野生型 ORC に結合できたのに対し、ORC の ATP 結合活性不能変異タンパク質は、野生型 Cdc6p に結合できなかった。この結果は、ORC と Cdc6p の origin DNA 上での複合体形成において、ATP 結合型の ORC が活性型で、ADP 結合型は不活性であることを示している。従って、ORC の ATPase 活性は、ORC を ATP 結合型から ADP 結合型へ不活性化することにより、DNA 複製開始を負に制御していることが考えられる。即ち、ORC の ATPase 活性による自身の不活性化が、DNA 複製開始を細胞周期あたり一回に制限していると考えられる。

(3) Cdc6p の ATPase の機能解析

Cdc6p の ATPase 活性に関しても、上記の再構成系を使って解析し、精製した Cdc6p が ATP 存在下で、ORC の重合を阻害することを見出した。この Cdc6p の活性は、自身の ATPase 活性に依存していた。また私は、Cdc6p が自身の ATPase 活性を使って、ORC の origin 結合性を上昇させていることを見出した。さらに、Cdc6p の ATPase 活性の細胞内における機能を明らかにする目的で、ATPase 活性を持たない変異型 Cdc6p を構築し、その遺伝学的解析を行った。変異型 Cdc6p は DNA ヘリカーゼである MCM を DNA 上に効率的にロード出来ないため、細胞周期の S 期の進行を遅らせること

が分かった。この結果から、Cdc6p の ATPase 活性は、ORC の高次構造を変化させ、MCM が ORC と結合しやすくしているというモデルを提唱した。このことは、Cdc6p の ATPase が、DNA 複製の進行を促進し、DNA 複製を正に制御することを示唆している。

自己評価

3年間の研究により、大腸菌と同様な再複製開始抑制機構が酵母にも存在することを示すことが出来、目標は達成できたと考えている。またその研究過程で、複製再構成系の確立への第一歩を踏み出すことが出来たのは、予想外の研究成果であった。今後は、これを土台に、真核生物の複製再構成系の確立という、大きな目標にチャレンジしていきたい。

3 . 領域総括の見解

真核生物では、DNA の複製開始が細胞周期毎に一回に制限されている。本研究者は、この問題に酵母を材料として迫るため、まず DNA 複製開始点に ORC(origin recognition complex) と、その結合に関係する Cdc6 タンパク質の機能を探った。まず、これらタンパク質の DNA 複製開始点への結合を、試験管内で再構成することを行い、次にこの再構成系を用いて、これらタンパク質の ATPase 活性と、ATP/ADP の関係を生化学的に明確にしている。今後、この再構成系により、続々と成果を挙げることを期待している。

4 . 主な論文

- 1 . Hase, M., Yoshimi, T., Ishikawa, Y., Ohba, A., Guo, L., Mima, S., Makise, M., Yamaguchi, Y., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (1998). Site-directed mutational analysis for the membrane binding of DnaA protein. J. Biol. Chem. 273, 28651-28656.
- 2 . Kondo, T., Mima, S., Fukuma, N., Sekimizu, K., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2000). Suppression of temperature-sensitivity of adnaA46 mutant by higher DNA supercoiling. Biochem. J. 348, 375-379.
- 3 . Makise, M., Mima, S., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2000). Identification of amino acids involved in the functional interaction between DnaA protein and acidic phospholipids. J. Biol. Chem. 275, 4513 - 4518 .
- 4 . Mizushima, T., Takahashi, N. and Stillman, B. (2000). Cdc6p modulates the structure and DNA binding activity of the Origin Recognition Complex in vitro. Genes & Dev. 14, 1631-1641.
- 5 . Makise, M., Mima, S., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. (2001). Molecular mechanism for functional interaction between DnaA protein and acidic phospholipids; identification of important amino acids. J. Biol. Chem. 276, 7450-7456.

5 . その他

招待講演数 12 (国内 9、 海外 3)