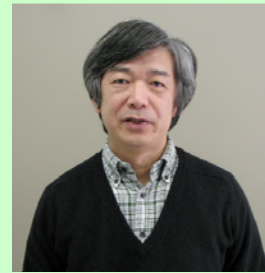


タンパク質の集合・リモデリングの分子機構とその制御 Molecular mechanism and regulation of assembly and remodeling of proteins

荒木 弘之 (ARAKI HIROYUKI)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・教授



研究の概要

出芽酵母の染色体 DNA 複製開始過程をリモデリングのモデルとし、タンパク質の複製開始領域への集合とその後に起こるタンパク質複合体の変換（リモデリング）の分子機構、そして細胞周期によるこれらの調節機構の解明を目指す。これまでに、pre-LC 複合体、Sld3-Sld7 複合体を新たに同定し、これら複合体が集合反応とリモデリング反応に働くことを示した。

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物化学・分子生物学

キーワード：リモデリング、DNA 複製、複製開始、DNA 合成

1. 研究開始当初の背景

細胞内で起こる生命現象の多くは、複数の因子が特定の時期と場所に集合し、機能を発揮する反応である。遺伝情報を担う染色体 DNA の複製に於いても、まず DNA を合成する酵素を含む多数のタンパク質が複製を開始する DNA 領域に集合し、次にこれらタンパク質群が何らかの変換（リモデリング）をし、DNA 合成を始める。しかし、この過程の分子機構や制御には分からない部分が多かった。

2. 研究の目的

染色体 DNA の複製に関わるタンパク質の複製開始領域への集合とその後に起こるリモデリングの分子機構、そして細胞周期によるこれらの調節機構の解明を目指す。また、複製を開始する DNA 領域に集合したタンパク質群がリモデリングされ移動する過程（DNA 合成の開始）が、実際にどのような変化によるのか、また何によって制御されているのかを、明らかにする。

3. 研究の方法

出芽酵母を用いて、遺伝学的解析と共に DNA 複製開始領域へ集合する種々のタンパク質の挙動を調べる。また複製開始領域へ集合するタンパク質群を精製し、タンパク質間の相互作用・複合体形成や、開始領域への集合を試験管内で調べる。これらの解析により、タンパク質集合の分子機構とその制御を明らかにする。

4. これまでの成果

i) pre-LC 複合体の発見とその機能

細胞周期の中心的な役割を担うタンパク質リン酸化酵素 CDK により、Sld2 タンパク質と Sld3 タンパク質がリン酸化されると、これらタンパク質は Dpb11 タンパク質に結合する。この結合は染色体 DNA の複製に必須であるが、なぜこの結合が DNA 複製を促進するのかは分からなかった。我々はリン酸化された Sld2 と Dpb11 の結合が Dpb11, Sld2, DNA ポリメラーゼ ϵ (Pol ϵ), GINS を含む複合体の形成を促進することを見いだした。この複合体は複製開始領域に集合しなくても形成するので、pre-Loading Complex (pre-LC) と名付けた。さらに pre-LC が、複製開始領域に結合したタンパク質が DNA 合成反応へと進むためのリモデリングに重要な働きをすることが示唆された。これは CDK による複製開始の機構の一端を明らかにした最初の報告である。

ii) 複製開始における Pol ϵ の役割

上述の pre-LC の形成には Pol ϵ が必須である。Pol ϵ は、Pol2, Dpb2, Dpb3, Dpb4 の4つのサブユニットからなる。一番大きな Pol2 が DNA 合成活性を持つ触媒サブユニットである。このサブユニットの N 末半分にある DNA 合成活性に関与する領域 (DNA ポリメラーゼドメイン) を除いても細胞は増殖できるが、C 末半部分を欠くと DNA 複製に異常が生じ細胞は増殖できない。N 末半部分を欠いた場合は、複製 DNA ポリメラーゼの1つである Pol δ によ

てDNA合成能が代替えされているものと考えられている。しかし、C末半分はPol ϵ の他のサブユニットと結合すること以外、機能は未知で、20年近く複製分野のミステリーの1つであった。我々は、タンパク質間相互作用とタンパク質融合を用いた研究から、Pol2サブユニットのC末半分がSld2と、Pol ϵ のDpb2サブユニットがGINSと、結合することにより、Pol ϵ がGINSのDpb11-Sld2複合体への結合を促進することを見いだした。これは、長年の疑問であったPol2サブユニットC末の機能を明らかにするとともに、DNA合成酵素が新たな機能を持ちうるという驚くべき結果を提示するものである。

iii) Sld7のリモデリングに於ける機能

我々が新たに同定したSld7タンパク質はSld3タンパク質と細胞周期を通じて常に複合体を作っている。複製開始領域には細胞周期のM期後期からG1期にpre-Replicative Complex (pre-RC: Orc, Mcmよりなる)が形成される。Sld3はこのpre-RC依存的にCdc45タンパク質とともに複製開始領域へ結合する。この際、Cdc45はSld3と最初は結合しているが、複製の開始に伴ってSld3と解離し、Mcm, GINSとともに2本鎖DNAを1本鎖にほどくヘリカーゼであるCMG複合体を形成し、DNA合成開始に伴って複製開始領域から解離する。精製したSld3-Sld7複合体はSld3単独と比較するとCdc45タンパク質との結合能が弱く、Cdc45からの解離が起こりやすいことを見いだした。Sld7は細胞増殖に必須ではないが、Sld7を欠く細胞はS期の進行が遅れ、CMG複合体の複製開始領域からの解離が遅れる。これは、複製開始領域への複製因子の結合と解離の調整にSld7タンパク質が関与することを示している。即ち、結合したタンパク質(または複合体)の性状を換えること(リモデリング)がDNA複製開始において重要であることを意味し、複製開始において初めて結合・解離、またリモデリングの重要性を実験的に示したものである。

iv) 試験管内DNA複製系の確立へ

タンパク質複合体のリモデリングの詳細を理解するためには、試験管内で精製タンパク質や細胞粗抽出液を用いて細胞内の反応を再構築し、個々の反応を詳細に調べる必要がある。そのため我々は、複製開始に必要なと考えられているタンパク質の全種類を精製した。精製タンパク質によるpre-RCの形成と細胞粗抽出液を組み合わせると、予備的実験ではあるが、複製反応が起こっているようである。今後、この系と我々の精製したタンパク質の組み合わせにより、複製開始時のリモデリングを介した複製開始反応の詳細が明らかになることが期待される。

5. 今後の計画

複製開始領域へのタンパク質の集合とリモデリングのキイとなる以下の項目について研究を進める。

- 活性なヘリカーゼであるCMG複合体形成について、精製タンパク質と試験管内DNA複製系を用いて解析を進める。
- pre-LC形成とリモデリングにおけるPol ϵ の役割を、精製したタンパク質を用いてより詳細に解析する。
- Sld3-Sld7複合体の複製開始でのリモデリングにおける役割について、この複合体の構造と機能の面から解析を進める。
- 試験管内複製系を確立し、この系を用いた複製開始反応、リモデリングの詳細な解析を行う。

以上の解析結果から、DNA複製開始反応でのリモデリングの機構を明らかにするとともに、生物反応一般でのリモデリングの役割について考察する。

6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)
Tanaka, T., Umemori, T., Endo, S., Muramatsu, S., Kanemaki, M., Kamimura, Y., Obuse, C. and Araki, H. (2011) Sld7, and Sld3-associated protein required for efficient chromosomal DNA replication in budding yeast. EMBO J. in press

Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y-S., Kamimura, Y. and Araki, H. (2010) CDK-dependent complex formation between replication proteins, Dpb11, Sld2, Pole and GINS in budding yeast. Genes & Dev. 24, 602-612.

Araki, H. (2010) Cyclin-dependent kinase-dependent initiation of chromosomal DNA replication. Curr. Opin. Cell Biol. 22, 766-771.

Tanaka, S. and Araki, H. (2010) Regulation of the initiation step of DNA replication by cyclin-dependent kinases. Chromosoma 119, 565-574.

Araki, H. (2009) Regulatory mechanism of the initiation step of DNA replication by CDK in budding yeast. Biochimica et Biophysica Acta 1804, 520-523.

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/section/araki/araki-j.html>