

染色体ダイナミクスの可塑性を制御する分子メカニズムの解明

東京都医学総合研究所 ゲノム動態プロジェクト

正井 久雄

1 はじめに

染色体の安定な維持、機能発現はゲノミックおよびエピゲノミックなレベルで制御される。これらの過程はきわめて厳密に制御され、その破綻は、癌などの疾患や老化の原因となる。一方、染色体は、細胞内外の環境変化、その部分的損傷、発生や分化のシグナルなどに応答し、可塑的かつ柔軟に応答しその機能を維持する能力を有していることも明らかになりつつある。例えば、染色体の分配到に必須な centomere が破壊されると染色体は正しく分配されず細胞は生存できない。しかし、このような細胞の一部は、neocentromere という新たな centromere を全く別の箇所に構築し生存できるようになる。これは染色体のきわめて高い適応能力を示すものである。分化細胞のリプログラミングも、染色体機能の高い可塑性を示すものであるといえる。同時に、この過程は stochastic (偶然性の高い) な側面も有する。iPS の産生過程で一部未分化性の高い発癌性を有する細胞が生じ、これが iPS を実際に治療に使用する際に問題となることはよく知られている。この過程を正確に制御できるようになれば、iPS の医療応用にとって大きく貢献する。染色体のこのような高い可塑性、適応性は、染色体に内在する重要な性質であると考えられるが、その分子基盤についてはまだ不明である。

染色体 DNA 複製は染色体の安定な維持、継承において中心的な過程である。ゲノム上の複製開始部位の選択、その活性化の S 期内的なタイミング、複製部位の核内での局在、動態などを複製プログラムと名付ける。複製プログラムは遺伝的に規定されるとともに、発生過程や、細胞型あるいは細胞を取り巻く環境に応答して変化する可塑性を有する。本研究では、染色体複製プログラムを規定する分子機構の解明を通じて、染色体ダイナミクス、機能発現の可塑性を可能にするメカニズムの解明を試みる。染色体が内蔵する重要な特性である可塑性の本質の理解は、染色体の機能発現の変動が原因となる疾患や高次機能発現制御にも重要な洞察を与える。下記に、平成 21 年度研究助成金によりサポートされた研究成果について未発表 data を中心に報告する。

2 材料と方法

分裂酵母を用いた遺伝学的解析：すでに報告している方法に基づいて行った (Matsumoto et al. JBC [2005] 280, 42536)。細胞周期依存的な変動の解析を行うため、変異株 *cdc25-22* と *nda3-KM311* 株をそれぞれ高温もしくは低温にさらして、それぞれ G2 期後期もしくは M 期に細胞を同調し、許容温度で増殖を再開し同調的に細胞周期を進行する細胞集団を得た。

マイクロアレイを用いた ChIP-Chip 解析：標的タンパク質に Flag, HA, Pk 等の tandem epitope tag を融合させ、それらをゲノムの遺伝子座で発現させ、tag に対する抗体で染色体免疫沈降を行なう。分裂酵母の全ゲノムを高解像度 (20bp) で解析できる Affimetrix 社製のアレイに対して、免疫沈降 DNA を増幅してハイブリさせた。

動物細胞株：HeLa (ヒト子宮頸部癌細胞), U2OS (ヒト骨肉腫細胞), 293T (ヒト胎児腎上皮細胞), マウス胚性幹細胞株 CCE28 と D3。

動物細胞における複製因子の機能解析：oligofectamine 試薬 (Invitrogen) を用いて、siRNA を transfection した。HeLa 細胞, U2OS 細胞への plasmid DNA transfection は Lipofectamine Plus を用いた。293T 細胞への transfection には TransIT-293 (Mirus) を用いた。

3 結果

3-1 分裂酵母複製開始制御キナーゼ *hsk1* の欠損のバイパスを利用した複製プログラム制御因子の同定

Cdc7 は酵母から動物細胞まで保存されるキナーゼで、それぞれの複製起点における開始に必要とされる。Pre-RC の因子である MCM のリン酸化を介して *Cdc45* のクロマチンローディングを促進する。分裂酵母の *Cdc7* ホモログの *Hsk1* は 30°C の増殖に必須であるが、生育温度の上昇その他の条件により *hsk1Δ* 株が増殖できることを見出した (図 1)。

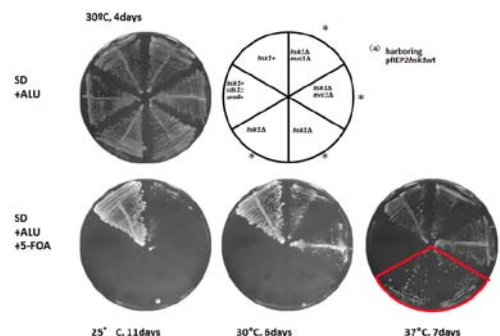


図 1 *hsk1Δ* 株は 37°C で生育できる。
Hsk1 を発現する plasmid を持っているため *hsk1Δ* 株が生育可能であるが 5-F0A を含む培地ではこの plasmid をもつ細胞は死滅する。25°C, 30°C では生育しないが、37°C では生育できる。これは 37°C では plasmid を失った *hsk1Δ* 株が生育可能であることを示している。

この時、一般に複製開始の脱制御がおこっていることを見出した(図2)。そこで、*hsk1* 欠損をバイパスする変異体のスクリーニングにより、複製プログラムを制御する因子を同定できるのではと考えスクリーニングを行なった。その結果 *hsk1Δ* 株の 30°C での増殖を回復する複数の因子を同定した(図3)。その中のひとつ Rif1 について詳細な解析を行なった。

3-2 分裂酵母 Rif1 の機能解析

rif1Δ は効率よく *hsk1Δ* 株の制限温度での増殖を回復した。さらに、*rif1Δ* 株における複製開始部位を ChIP-Chip で解析した結果、テロメア側のアーム領域を中心に、通常は HU 存在下で活性化されない複製起点が fire していることが明らかとなった(図3、6)。特に subtelomere 領域は HU 存在下では通常全く複製開始しないが、*rif1Δ* 株では強い複製開始シグナルが観察された。一方 centromere 近傍は一般に HU 存在下で複製開始する起点が集積しているがその中には *rif1Δ* 株で複製開始が抑制されるものもある。特に centromere コア領域は preRC が集積しており HU 存在下で強く複製が観察されるが、*rif1Δ* 株では複製シグナルが喪失した。

3-3 Rif1 の染色体上結合部位

Rif1 は染色体に結合するのでその結合部位を ChIP-Chip で解析した(図4)。Rif1 は Subtelomere 領域に結合する。一方、arm 領域ではテロメア側を中心に結合する。また、セントロメア領域ではコア領域に特異的に結合している(図5)。以前に報告されたように、subtelomere 領域への Rif1 の結合が Taz1 依存的であったが、arm 領域への結合は非依存的であった(図6)。この事実は、Rif1 の結合様式は telomere と arm 領域で異なることを示す。

3-4 ヒト Rif1 タンパク質

ヒトの Rif1 タンパク質は、同様にクロマチン結合タンパクであるが、テロメア維持における機能はほとんどないと言われている。ヒト細胞において、Rif1 を発現抑制し複製におよぼす影響を調べた結果、1) S 期の長さには大きな影響はない、2) S 期初期の複製起点活性化の核内パターンが S 期を通じて維持される、3) β-globin 後期複製起点が初期に fire する(図7)、などが明らかとなった。このことは、ヒト細胞においても、Rif1 の欠損は複製プログラムの変動をもたらすことを示す(図8)。一方、細胞周期を同調した細胞で Rif1 を抑制すると、G2 から M 期にかけての進行が遅延することが明らかとなった。

3-5 ES 細胞の未分化能維持における Rif1 の役割

Rif1 は、全能性 ES 細胞において高いレベルで発現している。分化誘導するとそのレベルは急激に低下した。ES 細胞で、Rif1 の発現を siRNA で抑制すると、一部分化マーカー遺伝子が発現し、アルカリフォスファターゼ染色が低下し分化が誘導されていることが示唆された。これらは、Rif1 が ES 細胞の未分化能の維持に関与することを示す。

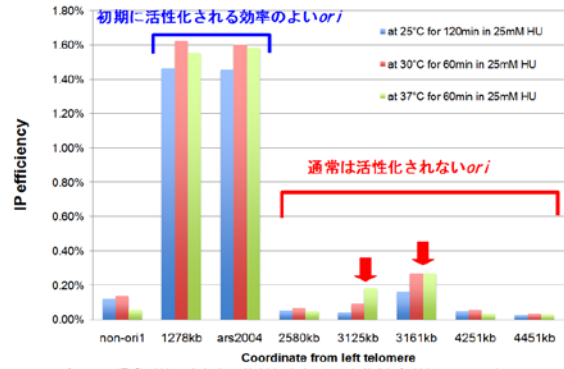


図2 37°C では通常活性化されない複製起点(ori)から複製が活性化している。各温度において、H₂O₂存在下でのBrdU取り込みを、種々の潜在的複製開始部位で測定した。BrdU抗体で免疫沈降したDNA断片を定量的PCRで定量した。

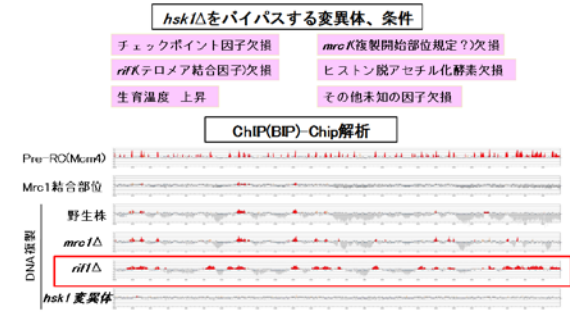


図3 *hsk1Δ*をバイパスする変異体、条件と、それらの変異体におけるpreRC(潜在的複製開始部位)の形成とDNA複製開始部位のゲノムワイド解析。preRC(潜在的複製開始部位)は10kbに1個くらいの頻度で存在するが実際にその一部が初期複製開始に使用される。しかし、*mrc1Δ*株や*rif1Δ*株では通常使用されない部位から開始する。特に、*rif1Δ*株では複製起点活性化の大規模な抑制が起きている。一方、*hsk1Δ*変異株では開始頻度が減少する。なお、上記はHU存在下での複製開始のシグナルである。Mrc1は初期複製開始部位に選択的に結合する。

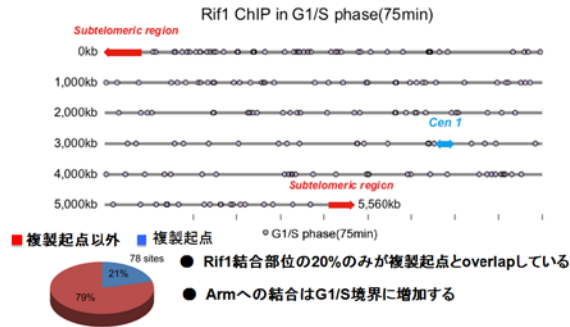


図4 Rif1の分裂酵母第一染色体上の結合部位。ndu37Δレストからrelease 75分のG1/S境界期におけるRif1の結合部位をChIP-Chipで同定した。

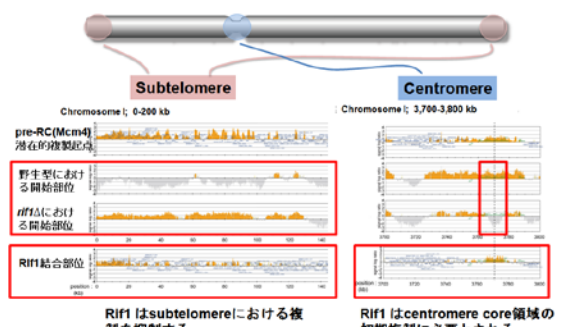


図5 Subtelomere および centromere における Rif1 結合部位。Rif1 は subtelomere および centromere core 領域に結合する。しかし rif1 欠損が複製開始に及ぼす影響は両者で異なる。



図6 Rif1の染色体結合のまとめ。Rif1は、染色体の特定の領域に結合する。テロメア側の領域はrif1欠損により複製開始が促進される起点が多く集まっており、セントロメア近傍は、rif1欠損により抑制される複製起点が存在する。

4 考察

DNA複製は、pre-RC(G1期に染色体上に形成される複製開始前複合体)の形成と再複製の阻害など、たいへん厳密な制御機構とともに、環境への高い適応性、可塑性を特徴とする緩やかな制御の二段階の制御を受ける。後者は、細胞の生存に直接影響を与えるものではないが、遺伝子発現への影響などを介してゲノム機能発現に大きな影響をおよぼす。本研究では、Rif1が酵母及び動物細胞において複製プログラムの制御に関与することを発見した。Rif1の非存在下では、通常fireしない複製起点の活性化が観察され、これが、*hsk1*の欠損をバイパスする原因となっていると想像している。Rif1は染色体に結合するが、その結合部位は複製開始部位とは異なるものが80%を占める。Rif1は何らかの機構で複製開始を抑制すると考えられるが、結合部位と抑制されている複製起点は一致しないので、直接複製開始複合体と相互作用して活性を抑制するとは考えにくい。一方、*rif1Δ*株はチェックポイントに異常はないので、Rif1がチェックポイント依存的に複製開始を抑制する可能性も否定される。一方、最近分裂酵母のRif1タンパクを精製しその生化学的解析を行なった結果、Rif1はヒストン由来のペプチドに結合することが明らかとなった。Rif1の作用機序について、ヒストンの修飾を介してクロマチン構造の改変を誘導する可能性、ヒストンシャペロンとしてクロマチン再構成に機能する可能性、クロマチンの核内構築を制御する可能性など、を現在考えている。来年度は、Rif1のクロマチン制御における機能を解明するとともに、ヒト細胞においてRif1欠損がゲノムワイド複製プログラムに及ぼす影響を解析する。

5 発表論文(2010年以降)

原著論文

Tanaka, T., Yokoyama, M., Matsumoto, S., Fukatsu, R., You, Z. and Masai, H. (2010) "Fission yeast Swi1-Swi3 complex facilitates DNA binding of Mrc1." *J. Biol. Chem.* 285, 39609-39622.

Kundu, L.R., Kumata, Y., Kakusho, N., Watanabe, S., Furukohri, A., Waga, S., Sekia, M., Masai, H., Enomoto, T., Tada, S. (2010) "Deregulated Cdc6 inhibits DNA replication and suppresses Cdc7-mediated phosphorylation of Mcm2-7 complex." *Nucleic Acid Res.* 3, 5409-5418.

Takeishi, Y., Ohashi, E., Ogawa, K., Masai, H., Obuse, C., and Tsurimoto, T. (2010) "Casein kinase 2-dependent phosphorylation of human Rad9 mediates the interaction between human Rad9-Hus1-Rad1 complex and TopBP1." *Genes Cells* 15, 761-771.

Furuya, K., Miyabe, I., Tsutsui, Y., Paderi, F., Kakusho, N., Masai, H., Niki, H. and Carr, A. M. (2010) "DDK phosphorylates checkpoint clamp Rad9 and promotes its release from damaged Chromatin." *Mol. Cell* 40, 606-618.

Day, T.A., Palle, K., Barkley, L.R., Kakusho, N., Zou, Y., Tateishi, S., Verreault, A., Masai, H. and Vaziri, C. (2010) Cdc7-Mediated Rad18 Phosphorylation Directs the Accumulation of DNA Polymerase η at Sites of Stalled Replication. *J. Cell Biol.* 191, 953-966.

Matsumoto, S., Shimmoto, M., Kakusho, N., Yokoyama, M., Russell, P., and Masai, H. (2010) "Hsk1 kinase and Cdc45 regulate replication stress-induced checkpoint responses in fission yeast." *Cell Cycle* 9, 4627-4637.

総説

Masai, H., Matsumoto, S., You, Z., Yoshizawa-Sugata, N. and Oda, M. (2010) Eukaryotic DNA replication; where, when and how? *Annual Rev. Biochem.* 79, 89-130.

Masai, H., Tanaka, T. and Kohda, D. (2010) "Stalled replication forks: Making ends meet for recognition and stabilization." *Bioessays* 32, 687-697. (Review)

Tanaka, T. and Masai, H. (2010) "Bacterial primosome." In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001048.pub2

Tanaka, T. and Masai, H. (2010) "Bacterial replication fork: synthesis of lagging strand." In: Encyclopedia of Life Sciences (ELS). John Wiley & Sons, Ltd: Chichester. DOI: 10.1002/9780470015902.a0001049.pub2

Masai, H. "FANCS regulate firing of DNA replication origins." (2010) *Cell Cycle* 2010 Jul 1; 9(13). [Epub ahead of print] PubMed PMID: 20647748.

Vaziri, C. and Masai, H. (2010) "Integrating DNA replication with Trans-Lesion Synthesis via Cdc7." *Cell Cycle* Dec 15; 9(24). [Epub ahead of print] PMID: 21150323

Toh G-T. and Masai, H. (2011) "Cdc7L1." *UCSD-Nature Molecule Pages*, in press (Review)

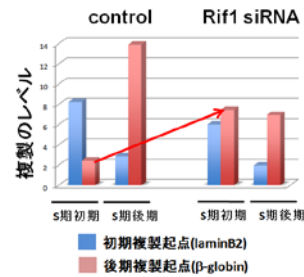


図7 Rif1ノックダウン細胞では後期複製起点が初期に複製されるようになる。HeLa細胞でS期初期に複製しているDNA断片と後期に複製するDNA断片に分離し、laminB2領域と β -globin領域の複製タイミングを解析すると、これらはそれぞれ初期、後期であることを確認した。Rif1をノックアウトすると、 β -globin領域の複製タイミングが後期から初期に変化するようになった。

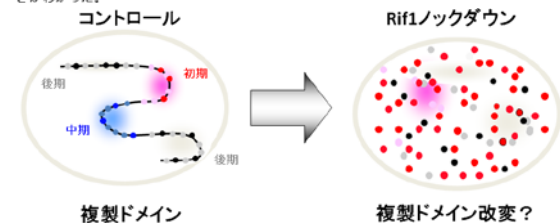


図8 ヒトRif1発現抑制は核内の複製ドメインの構築に影響を与える可能性がある動物細胞の染色体は、複製ドメインに区分される。しかしRif1をノックダウンした細胞ではこのドメイン構造が改変し、後期複製起点が初期に複製するようになっている可能性がある。