

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するようになる。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 22 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)。

マイクロアレイを用いた複製タイミングドメイン解析：BrdU で短時間新生 DNA を標識した細胞を FACSsorter により S 期前期および後期の画分に分画した。それぞれから BrdU 抗体により標識された新生 DNA を免疫沈降により回収し、増幅した後に tiling array とハイブリさせ複製タイミングドメインを解析した。

蛍光免疫染色によるヒト Rif1 の細胞内局在の観察：Abcam 社から購入したヒト Rif1 抗体を用い、PFA で細胞を固定して免疫染色した。なおある場合にはカバーガラス上の細胞を Triton で prewash してから、あるいはさらに DNaseI で DNA を切断してから PFA 固定した。

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), ヒト正常皮膚繊維芽細胞 (NHDF)、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 (Cdc7 ホモログ) の欠損をバイパスする条件とその複製プログラムに及ぼす影響 (表 1)

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、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

	<i>mrc1</i> Δ (複製フォーク因子)	<i>cds1</i> Δ (チェックポイント因子)	高温	<i>rif1</i> Δ (テロメア結合)
Cdc7機能のバイパス	++	+	++	+++
複製起点の活性化	タイミング促進、 活性亢進	タイミング促進、 活性亢進	タイミング促進、 活性亢進	タイミング促進、 活性亢進 および タイミング遅延、 活性抑制
クロマチンへの結合	初期複製起点	NT	NT	大部分複製起点以外

表 1 分裂酵母で同定された複製プログラムに影響を与える種々の因子。チェックポイント因子 *mrc1*, *cds1* の欠失あるいは高温は、複製タイミングを促進し、活性化するが、*rif1* の欠失は、複製タイミングを両方向に変動させ、一般的に S 期のタイミング制御が喪失する。

を促進する。平成 21 年度までの研究で、分裂酵母の Cdc7 ホモログの Hsk1 は通常の増殖に必須であるが、チェックポイント変異体(*mrc1-3A*, *cds1Δ* など)や高温(30° C)の条件で増殖能を回復することを見出した。これらの条件下では、通常 fire しない(あるいは後期にしか fire しない)複製起点が S 期初期に活性化される。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。その結果テロメア結合因子 Rif1 の欠損が *hsk1Δ* 株の 30° C での効率よい増殖を回復することを見出した。

3-2 分裂酵母 Rif1 の機能解析 *rif1Δ* は効率よく *hsk1ts* 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。一方効率よい初期複製起点の活性化が、多くの部位で遅延・抑制されていた。すなわち、Rif1 は、複製起点活性化のゲノムワイドのタイミング制御に必須であることが明らかとなった。

3-3 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 期初期に Cdc7 キナーゼの標的のリン酸化および Cdc45, PCNA などのクロマチン結合の亢進、2) S 期中期の複製 foci の消失(図 1)、3)ゲノムワイドな複製タイミングドメインの変動(図 2)、が観察された。このことは、ヒト細胞においても、Rif1 は複製プログラムの決定に重要な役割を果たすことを示す。

3-4 Rif1 の細胞内局在とその制御 HeLa 細胞において Rif1 は大部分が核に局在する。Rif1 のシグナルは、染色固定前に DNase I を用いて大部分の DNA を消化しても観察される。したがって、Rif1 は核内の不溶性の構造に結合していると推察される。Rif1 は間期を通じて染色体に結合しているが、分裂期 Pro phase には染色体から解離する。そして telo phase に再び結合する。Rif1 の局在は M 期中期の複製 foci と一致しており、Rif1 は、S 期中期の複製タイミングドメインを形成することにより、複製タイミングを制御することが示唆された(図 3)。

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、大変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、種々の遺伝的背景あるいは生理的条件により複製開始部位の選択やそのタイミングが大きく変動することを発見した。この事実は複製プログラムの可塑性を直接示すとともに、その分子基盤に洞察を与える。

一方、複製のタイミング制御に関与する因子として Rif1 を同定した。酵母及び動物細胞において、Rif1 の非存在下では、複製タイミングプログラムが大きく変動する。動物細胞では Rif1

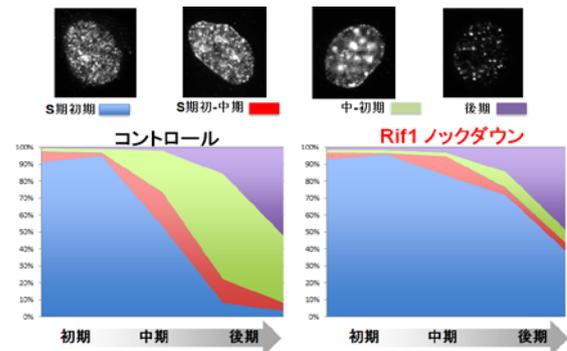


図 1 Rif1 発現抑制による S 期中期複製ドメインの喪失
同調した HeLa 細胞を BrdU で標識し、免疫染色法により取り込まれた BrdU を検出した。核内の DNA 複製領域を観察、複製タイミングを分類しその数を算出した。Rif1KD により S 期中期の複製 foci パターンを示す細胞が特異的に消失した。

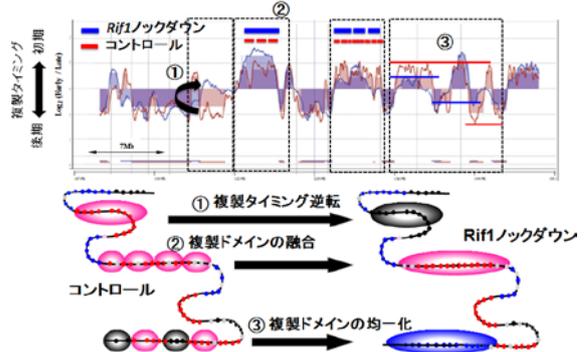


図 2 Rif1 ノックダウンにより複製タイミングドメインがゲノムワイドで変化する。ヒト 5 番染色体 5q 領域 42 Mb の複製タイミングを決定した。Rif1 抑制により、一部のゲノム領域で複製タイミングドメインの大きな変化が観察された。

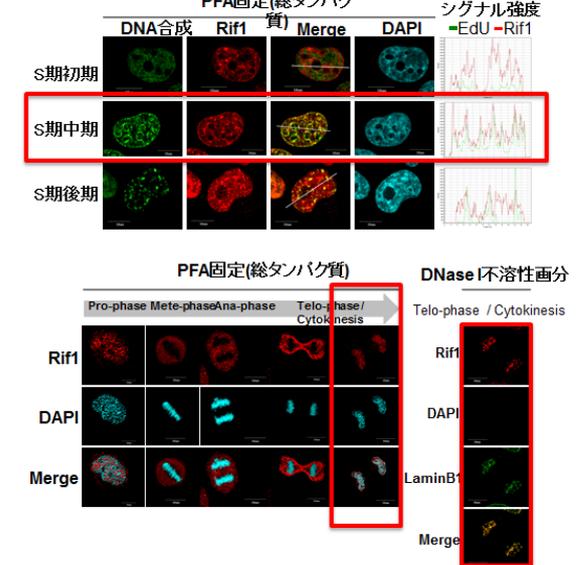


図 3 Rif1 は M 期後期にクロマチンに結合し、S 期中期の複製 Foci に共局在する。Rif1 は M 期後期に DNase I 不溶性の核内構造に結合する。そしてその局在は S 期中期の複製 foci と一致する。

抑制により S 期中期の複製ドメインが消失する。さらに興味深いことに、Rif1 は S 期中期の複製 foci と共局在する。Rif1 は核内の不溶性のクロマチン構造に結合しており、Rif1 抑制によりクロマチンループのサイズが増大する。一方、以前の研究から複製タイミングは G1 期初期の TDP (Timing Decision Point) に決定されると提唱されている。Rif1 は、M 期後期から G1 初期にクロマチンに結合し S 期中期複製ドメインを形成すると考えられ (図 4)、これがまさに TDP の本体である可能性が示唆される。今後、Rif1 がどのようなメカニズムで複製タイミングドメインを形成するのか、さらにその生理学的な意義についてさらなる研究を行なう予定である。

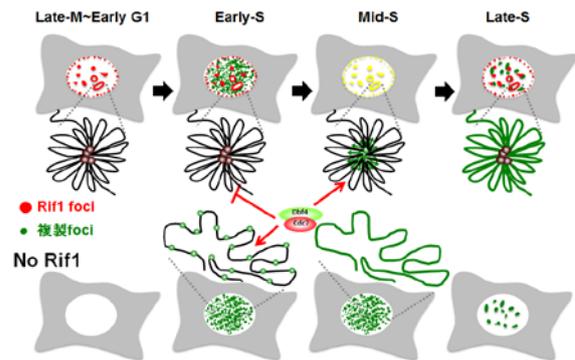


図 4 Rif1により形成される特殊な染色体高次構造は、S期中期まで複製されない複製タイミングドメインを形成する。Rif1非存在下ではこの核内構造が形成されず、通常活性化されないS期中期複製ドメインの複製起点がCdc7によりS期初期に活性化され、複製が亢進する。

5 発表論文(2010年以降)

原著論文

Hayano, M., Kanoh, Y., Matsumoto, S., Shrahige, K. and Masai, H. (2012) "Rif1 is a global regulator of site selection and timing of replication origin firing in fission yeast." *Genes and Development*, in press

Hayano, M., Kanoh, Y., Matsumoto, S., Kakusho, N. and Masai, H. (2011) "Pre-firing binding of Mrc1 defines the early-firing origins which are selectively hyper-activated upon loss of fork stabilizing factors in fission yeast." *Mol. Cell. Biol.* 31, 2380-2389.

Uno, S and Masai, H. (2011) "Efficient expression and purification of human replication fork-stabilizing factor, Claspin, from mammalian cells: DNA binding activity and novel protein interactions." *Genes to Cells*, 16, 842-856.

Matsumoto, S., Hayano, M., Kanoh, Y. and Masai, H. (2011) "Bypass pathways of the Hsk1 function suggest plasticity of origin selection in fission yeast." *J. Cell Biol.* 195, 387-401.

Kitamura, R., Fukatsu, R., Kakusho, N., Cho, Y-S., Taniyama, C., Yamazaki, S., Toh, G-T., Yanagi, K., Arai, N., Chang, H-J. and Masai, H. (2011) "Molecular mechanism of activation of human Cdc7 kinase: Bipartite interaction with Dbf4/ASK stimulates ATP binding and substrate recognition." *J. Biol. Chem.* 286, 23031-23043.

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. (2011) "RecQL4: a helicase linking formation and maintenance of a replication fork." *J. Biochem.* 149, 629-631 (commentary)

Masai, H. (2011) "Cdc7" The Encyclopedia of Signaling Molecules SpringerReference and Database Publishing, in press

Masai, H. (2011) "Dbf4" The Encyclopedia of Signaling Molecules SpringerReference and Database Publishing, in press

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

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* 9, 2494..

Vaziri, C. and Masai H. (2010) "Integrating DNA replication with Trans-Lesion Synthesis via Cdc7." *Cell Cycle* 9, 4818-4823.