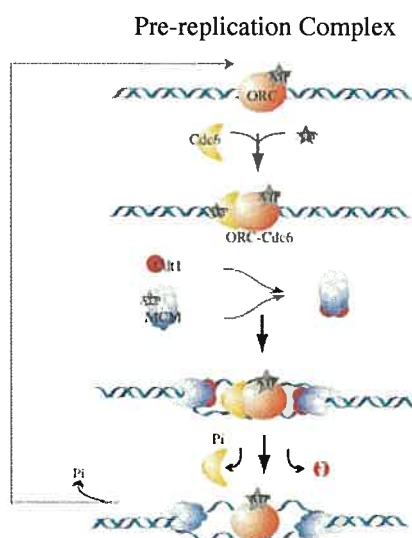


研究経過・成果報告書

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、遺伝情報を次世代の細胞に継承する上で不可欠である。ゲノムDNAの安定な維持は細胞増殖、老化、さらに種々の疾患の発生あるいは生物種の進化とも密接に関連する。染色体複製開始は、複製前複合体 (pre-replicative complex: pre-RC) の形成と引き続くpre-RCの活性化の二段階で進行する。それぞれのステップで、ORC (origin recognition complex)とMCM (minichromosome maintenance)蛋白質は重要な役割をはたす。真核生物のDNA複製開始部位として働くDNA配列は、出芽酵母では特定の塩基配列をもったDNA配列として同定されているが、動物細胞などの高等真核生物では複製開始部位として機能する特異的な配列は未だに同定されていない。アフリカツメガエルの卵抽出液の中では、導入されたプラスミドDNA上のどんな配列でも複製を開始できる、酵母のようなコンセンサス配列はないというモデルが有力である。一方、複製開始に関わる複製開始タンパク質因子については酵母から動物まで保存された様々なタンパク質がこれまで同定されている。ORCサブユニットを含むタンパク質複合体がDNA複製に必須であることが確かである。

ORCは、複製開始点を認識する6つのサブユニットからなる複合体として出芽酵母において同定され、ヒトにまで保存されている。複製開始部位からの複製開始が許容される前に、ORC複合体を中心としたCdc6, Cdt1, Mcm2-7複合体等を含む複製前複合体が複製開始部位に形成され、このpre-RC形成はDNA複製の開始に必須のステップである。さらに、ORC複合体はATPase活性がもっている、ORC1サブユニットがこのATP加水分解活性を担っているが、ORC4サブユニットもこの過程に貢献していることが出芽酵母の研究から明らかになった。しかし、動物細胞ではORC、Cdc6とMCMなどの複製開始タンパク質因子がDNA上でどのように機能してpre-RCを形成させるのかについては、未だ不明な点が多い。

私は、これまで主に動物細胞におけるDNA複製開始と複製フォークにおけるDNA複製制御の解析を進めてきた。具体的には、二本鎖DNAの巻き戻し役割を担うDNA複製ヘリ



カーゼであるMCMタンパク質複合体を中心とした複製フォーク複合体の分子構築と活性制御のメカニズムの解析を通じて、複製そして複製フォークの形成と維持が細胞癌化や老化に及ぼすインパクトを明らかにしようとして研究を進めてきた。これまでの精製したタンパク質を用いて生化学的酵素学的に調べることは、学術的にきわめて重要かつ意義のある研究方法である。しかし、真核細胞のDNA複製における細胞内での生理的意義を試験管でいち早く再現できる実験系も重要と考えている。そこで、細胞内でのDNA複製能を反映する唯一の試験管内実験系—卵抽出液複製系の開発者であり(*Science* 333 & 326 & 275; *Nature Cell Biol.* 6 & 8; *Cell in press* & 127; *Mol Cell* 40a & 40b & 5 & 1; *Genes Dev.* 25 & 21 & 22)、この分野で世界をリードするハーバード大学医学部Johannes Walter教授の研究室との共同研究の実施を行った。MCMヘリ

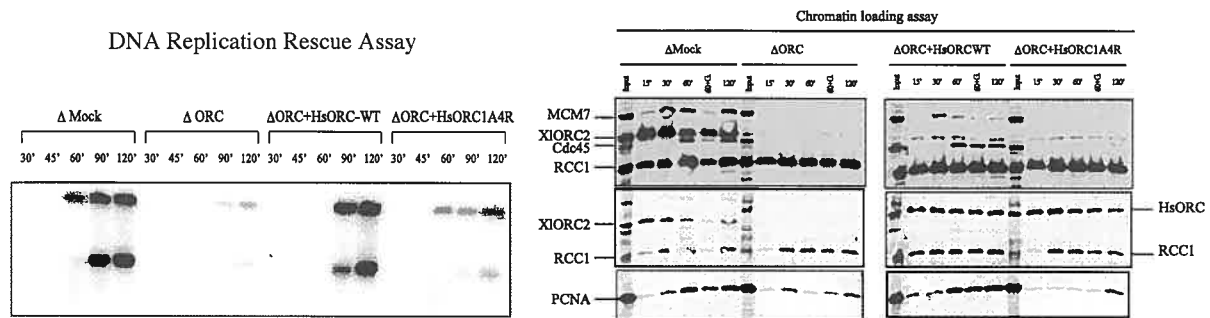
カーゼが染色体上のようなメカニズムでロードされることを理解するために、段階的なpre-RCアセンブリを先ず解明する必要がある、その先頭にたっているのが複製起点認識複合体ORCである。私は複製開始とその制御の分子メカニズムを普遍的に理解するために、真核細胞のDNA複製における細胞内での生理的意義を試験管で再現できる唯一の実験系で

あるアフリカツメガエル卵抽出液を用いた DNA複製を解析系として、pre-RC形成におけるORC複合体およびMCMタンパク質の詳細な機能解析を目指した。

アフリカツメガエル卵無細胞系は、高度に細胞周期で同調された細胞抽出液と精子核DNAを用いた複製システムで、複製開始蛋白質の活性制御という観点から、真核細胞のORC複合体の役割分担や各サブユニットの特異性を検討した。まず、ORC1サブユニットに特異的な抗体を用いて卵抽出液からORC複合体を免疫沈降除去してDNA複製を調べた。これまでの知見と同じ、ORC複合体はDNA複製に必須であることが確認された。次に、ヒトORCのサブユニットをコードする遺伝子をクローニングし、バキュロウイルス発現系を用いて、全6個HsORCサブユニットの共発現した野生型ヒトORCサブユニット1から6を含む複合体(HsORC1-6)を精製することを成功した。精製された組換えタンパク質HsORC1-6複合体は、ORC枯渇したアフリカツメガエルの卵抽出液でDNA複製能を回復することができたことで、組換えヒトORC複合体が機能的に働いていることが示唆された。また、クロマチンローディングアッセイでは、MCMやCdc45のクロマチン上のローディングは組換えヒトORC複合体の添加によって回復されることが確認された。

本研究では、Pre-RCの形成にどのようにORCによるATPの結合とその加水分解がDNA複製に影響を与えるか、そのORCの機能制御メカニズムを明らかにするため、ORC複合体の機能領域の変異体とその生化学的な性質を解析した。真核生物のORC複合体は、ATP結合のウォーカーモチーフとアルギニンフィンガーモチーフがORC1, ORC4とORC5サブユニットでよく保存されている。出芽酵母の研究では、ORCによるATPの加水分解はOrc1とOrc4サブユニットの協調機能が必要であることが示唆されて、ORC4で保存されたアルギニン残基の変異は、Orc1のATPase活性の失いとMCMのDNAローディングの減少を導く、そして最終的に細胞死をもたらす知見が明らかになった。そこで、ヒトORC4のアルギニンフィンガーモチーフに保存されたアルギニンをアラニンに置換し、変異ORC4と他のORCサブユニットをバキュロウイルス発現系で共発現し、ORC4Rを含む安定したヒトORC変異複合体が得られた。精製した変異ORC複合体を用いて、ORC複合体を免疫除去したアフリカツメガエルの卵抽出液のDNA複製能が変異ORC複合体の添加によって回復できるかどうかを調べた。結果はヒトORC4の変異はゲノムDNAの複製に影響しないことが示された。また、クロマチン上にMCMとCdc45がロードされた量も野生型と変異型における差が認められなかった。この結果はヒトORC4のアルギニンフィンガーモチーフは、出芽酵母でのような重要ではないことが示唆された。続いて、ヒトORC1のウォーカーモチーフ変異体を含むORC変異複合体を用いて、同様な実験を行った。しかし、出芽酵母で細胞死にもたらすORC1のウォーカーモチーフ変異もヒトではDNA複製をサポートすることができた。複製因子MCMとCdc45のクロマチン上のローディングも野生型と同様である。

ORCのATP加水分解はORC1のATP結合とORC4の加水分解による協調的に機能すると考えられる。そこで、ORC1のウォーカーモチーフとORC4のアルギニンフィンガーモチーフのダブル変異体を含むORC複合体を精製した(HsORC1A4R)。それを用いて、試験管のDNA複製能と複製因子のクロマチンローディングを調べた。図で示したように、ORC複合体を免疫除去した卵抽出液にヒトHsORC1A4Rを補ってDNA複製のレスキューアッセイを調べた結果、HsORC1A4RのDNA複製能は著しく低下した。さらに、ヒトORCのクロマチン上のローディングは野生型と変異型において同じに対し、ダブル変異体HsORC1A4Rでは複製因子MCM、Cdc45とPCNAがクロマチンにロードされない結果が得られた。これはORC1のウォーカーモチーフとORC4のアルギニンフィンガーモチーフ両方がDNA複製に必要な不可欠であることを示している。



続いて、そのDNA複製能欠損の原因を探るため、これらのORC複合体のATPアーゼとDNA結合活性を生化学で調べた。野生型HsORC1-6は一本鎖DNAの存在下ではATPアーゼ活性は他の真核生物（出芽酵母とショウジョウバエ）の同様に、半分までに減少された。一方、ORCの変異複合体HsORC1A、HsORC4RとHsORC1A4RのいずれかがATPase活性が野生型と比較すると顕著に減少したことが分かった。また、HsORCのDNA結合活性はニトロセルロースフィルター結合アッセイで調べた。ORCの変異複合体HsORC4RのDNA活性は野生型の半分になったが、ORCの変異複合体HsORC1AとHsORC1A4RのDNA結合効率は野生型に比べて約4倍に低下した。これらの生化学的結果は生体内の変異体のDNA複製能の欠損を説明することができない。更なるATP結合、Cdc6やCdt1のクロマチンへのローディングを調べる必要がある。実際出芽細胞ではORCのATP加水分解能はCdc6の添加によって大きく促進されて、ORCの変異体でもCdc6の添加によってORC野生型単独以上に活性が回復した報告があった。従って、ORC-Cdc6複合体の総ATPの加水分解は、ORCのシングル変異体と二重変異体の間で著しく異なる可能性がある。

本研究の解析から、出芽酵母では重要と考えていたORC1のウォーカーモチーフとORC4のアルギニンフィンガーモチーフの単独変異を含むヒトORC複合体ではなく、そのORC1と4の二重変異を含むヒトORC複合体がDNA複製やpre-RC形成のサポートをできなくなることから、ORC1のATP結合とORC4のATP加水分解の連携がDNA複製に欠かせないことが示された。さらに、各変異体のATPase活性の差がないため、Cdc6を含むORC-Cdc6複合体のATPの加水分解能が細胞内のDNA複製制御機構に影響を及ぼすと推測される。実際ORC-Cdc6複合体の立体構造やアミノ酸配列の整列比較からもORC-Cdc6は一分子であることが示唆されている。動物細胞の複製開始点はコンセンサス配列がなく、ORCおよびCdc6がどのようにATP能を利用して、MCM複合体分子をDNA上にロードし機能しているのかを理解する上で本研究の解析結果は大変重要な結果であると考えている。

一年間のハーバードメディカルスクールでの海外研究従事は新しいカエルの卵抽出液を用いた複製システム技術を学ぶ、新たな知見を得ることができ、ゲノム複製の基本的メカニズムの理解に顕著な進歩があった。大変素晴らしい研究環境の中、先生や同僚に恵まれたため、アフリカツメカエル研究初心者である私ですが、比較的短時間で一通りの技術を習得することができた。さらに、行ってきた研究の1つがまとまりつつである。このような貴重な経験の全てが貴財団の支援のお陰だと心より御礼申し上げる。これまで得意としていた精製タンパク質を用いた生化学と酵素学的な解析に、カエル卵抽出液を用いた再構成系の染色体動態の解析が加われ、多彩なアプローチを駆使することができた。これまでとは違った視点からの研究を推進することで、細胞増殖の精緻な分子機構の新たな側面が解明されることが期待される。得られた知見はゲノム複製の基本的メカニズムの解明とともに、疾患の発症機構の解明やがん化のプロセスの解明の研究へ多岐に役立ち、最終的にその成果は社会に還元されると考えられる。