

DNA複製の再開制御機構の解明

－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. 研究成果と考察

(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。この系において、ORCとCdc6pの結合はorigin DNA依存적であり、Cdc6pはORCを介してのみorigin DNAと結合出来ることが分かった。これらの性質は、遺伝学的解析から得られた結果とよく一致している。

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、その系を使って、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の重合阻害活性は、加水分解されないATPのアナログであるATP-g-Sで阻害された。また、ATPase活性を持たない変異型Cdc6pは、ATP存在下でも、この重合阻害活性を持たなかった。従って、このCdc6pの活性は自身のATPase活性に依存している。さらに私は、このCdc6pの活性の分子機構を検討した。その結果、Cdc6pは自身のATPase活性を使って、ORCの高次構造を変化させてORCが非特異的にDNAに結合するのを抑制することによって、結果としてORCのorigin DNA上での重合を抑制していることが分かった。

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。

3. 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. Identification of amino acids involved in the functional interaction between DnaA protein and acidic phospholipids. *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 a dnaA46 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.

4. その他

招待講演数 12 (国内9 海外3)