

染色体複製の多様性と新たな細胞増殖法の開発をめざして：複製開始の分子スイッチ Cdc7-ASK キナーゼ複合体を中心に

東京大学医科学研究所、基礎医科学大部門、染色体制御分野、教授、新井賢一

染色体 DNA 複製は通常ゲノム上の定点から開始し、秩序正しい細胞周期の進行と厳密に連動している。同時に、高等生物の染色体複製は、受精卵の初期発生に見られるきわめて特異性の低い DNA 複製のように、発生や分化の段階に応じてその複製起点の使用頻度や、塩基配列特異性を変化するという柔軟性をも兼ね備えている。また、種々の増殖因子や、DNA 損傷誘導因子、ストレスにตอบสนองして細胞の DNA 複製様式が変化し制御される可能性がある。一方、ゲノムの忠実な複製は、多能性幹細胞の自己複製のために必須である。我々は、染色体複製機構の多様性を明らかにし、その分子機構に基づいて、細胞増殖の新たな制御法を開発し、それを多能性幹細胞の自己増幅に応用することを究極の目的として研究をすすめている。

複製開始の分子スイッチ、Cdc7 キナーゼ複合体の発現と機能

出芽酵母を用いた研究により、染色体複製には、Cdc7(触媒サブユニット)-Dbf4(活性制御サブユニット)キナーゼ複合体の機能が必要であることが明らかになっていた。我々は、Cdc7-Dbf4 の機能的ホモログを分裂酵母(Hsk1-Him1)および動物細胞(Cdc7-ASK)で同定し、その機能が、それぞれの生物種での染色体複製開始に必須であることを証明した。ヒト Cdc7 キナーゼ活性は活性制御サブユニット ASK に依存する。ASK の発現は G1 初期に低く、G1 後期で上昇し S 期を通じて高く保たれる。この発現パターンは Cdc6 や CyclinE が S 期の初期に最大でその後急激に減少するのと対照的である。ヒト正常繊維芽細胞に ASK の抗体を微量注入すると、80%以上の細胞で DNA 複製が阻害されること、また ES 細胞においてマウス Cdc7 遺伝子を条件的に欠損させると DNA 複製および細胞増殖が速やかに停止することから Cdc7-ASK の機能が動物細胞の DNA 複製に必須であることが示された。

Cdc7 キナーゼ複合体の標的と複製開始の分子機構

In vitro で Cdc7 キナーゼ複合体はそれ自身のサブユニットを自己リン酸化するとともに、MCM 複合体を効率よくリン酸化する。なかでも、MCM2 サブユニットは *in vivo* においても Cdc7 により S 期にリン酸化される。Cdc7 は MCM2 上の多数のセリンおよびスレオニン残基をリン酸化するが、その中の一部をアラニンに置換した分裂酵母 MCM2 変異体は機能を失うことから、Cdc7 による MCM2 のリン酸化が複製開始に重要であることが示唆された。動物細胞において、Cdc7 によりリン酸化された MCM2 タンパク質は、クロマチンから遊離した画分に回収される。このことは、Cdc7 によるリン酸化が MCM 複合体の高次構造を変化させ複製活性化をもたらす可能性を示唆する。MCM は Cdk によってもリン酸化されるが、MCM 複合体内の MCM2 サブユニットの Cdc7 によるリン酸化は、Cdk の存在下で促進されることから、Cdk と Cdc7 はともに MCM を標的として、共同作用により複製開始を誘導する可能性が示された。

変異 ES 細胞、マウスを用いた muCdc7 の細胞増殖、個体発生における機能の解析

muCdc7 遺伝子を欠損したマウスは胎生 3.5 日から 6.5 日の間に死亡した。muCdc7 をコードする mRNA のひとつをトランスジーンとして構成的に発現させた状態で、muCdc7 遺伝子を完全に欠損した ES 細胞株を樹立できた。この変異 ES 株は野生株と同様に正常に生育するが、Cre-loxP システムにより、トランスジーンを除去すると、細胞増殖および DNA 合成が速やかに停止する。さらに、p53 遺伝子が活性化され、細胞は死滅していく。以上の結果は Cdc7 キナーゼが ES 細胞の増殖に必須であることを証明する。一方、同じトランスジーンが存在する下で muCdc7 ノックアウトマウスを作製することができたが、このマウスは、野生型マウスの半分くらいの体重しかなく、また同時に curly tail (曲がったしっぽ) の表現型を示す。約半数のマウスは誕生後 1-2 日で死亡する。我々の結果は、Cdc7 の発現パターンあるいはレベルの変化が、動物の個体発生に大きな影響を与えることを示している。

Dbf4 類似活性制御サブユニットに保存されたモチーフとこれによる Cdc7 キナーゼ活性化の分子機構

Cdc7 類似キナーゼの活性制御サブユニット上には、3 個の保存されたモチーフ(Dbf4-motif-N、Dbf4-motif-M および Dbf4-motif-C)が存在する。C2H2 タイプの Zn-finger 構造に類似した Dbf4-motif-C および Proline-rich な Dbf4-motif-M はいずれも単独で触媒サブユニットに結合できる。一方、キナーゼの最大の活性化および体細胞増殖には、Dbf4-motif-C (113 アミノ酸) および Dbf4-motif-M (65 アミノ酸) の両者の存在が必要かつ充分であることを証明した。BRCT (BRCA C-terminal domain) に類似した Dbf4-motif-N は体細胞 DNA 複製には必須でない。以上の結果から、Dbf4 類似遺伝子は Dbf4-motif-C および Dbf4-motif-M を介して Cdc7 触媒サブユニットに結合し、その結果触媒サブユニット上に何らかの構造変化を誘起してそのキナーゼ能を活性化すると考えている。Cdc7 活性化に必要な制御サブユニット上の領域が小さなアミノ酸配列に同定できたことにより、人為的に Cdc7 の活性化を誘導し、染色体複製の On-Off を制御する方法の開発への道が開かれた。

複製フォークの停止により誘導される組み換えと共役した DNA 複製の様式とその意義

大腸菌において複製フォークが予期せぬ障害により停止すると、SOS 反応の誘導をふくめ種々の反応が誘起される。組み換え酵素 RecA タンパク質に依存した DNA 複製の誘導もそのひとつである。我々は、この RecA 依存性の DNA 複製 (大腸菌では安定 DNA 複製と呼ばれている) の過程に PriA タンパク質が必須であることを以前報告した。私達は、PriA タンパク質は停止した複製フォークを認識し、結合し、組み換え酵素に依存した別の複製様式を誘導し、損傷の修復ならびに複製フォークの再構築を開始すると推定している。PriA タンパク質は DEXH-タイプの DNA ヘリカーゼドメインと C2C2 タイプの Zn-finger 構造を有する。種々の変異 PriA タンパク質の解析から ATP 加水分解/ヘリカーゼ活性および Zn-finger 構造はいずれも RecA 依存性の DNA 複製に必須であることを見出した。また、N 端近傍に PriA ファミリーによく保存された配列 (WYY モチーフ) を見出し、これを含む 200 アミノ酸の領域のみで D-loop 構造 (停止した複製フォークのモデル系と考えられる) に結合できることを示した。真核細胞においても PriA 様の因子が停止した複製フォークの認識および組み換え依存性の DNA 複製に重要な役割を果たしていると思われ、機能的に類似したタンパク質を生化学的に探索している。

1 Liu, J., Masuda E.S., Tsuruta L., Arai, N. and Arai, K. (1999) Two Independent Calcineurin-Binding Regions in the N-Terminal Domain of Murine NF-ATx1 Recruit Calcineurin to Murine NFAT-x1. *J. Immunol.* 162, 4755-4761.

2 Takeda, T., Ogino, K., Matsui, E., Cho, M-K., Kumagai, H., Miyake, T., Arai, K. and Masai, H. (1999) A Fission yeast gene, *him1*/ldp1**, encoding a regulatory subunit for Hsk1 kinase, plays essential roles in S phase initiation as well as in S phase checkpoint control and recovery from DNA damages. *Mol. Cell Biol.* 19, 5535-5547.

2 Kumagai, H., Sato, N., Yamada, M., Mahony, D., Seghezzi, W., Lees, E., Arai, K. and Masai, H. (1999) A novel growth- and cell cycle-regulated protein, ASK, activates human Cdc7-related kinase and is essential for G1/S transition in mammalian cells. *Mol. Cell Biol.* 19, 5083-5095.

3 Itoh, T., Liu, R., Yokota, T., Arai, K. and Watanabe, S. (1998) Definition of the role of tyrosine residues of the common β subunit regulating multiple signaling pathways of GM-CSF receptor. *Mol. Cell Biol.* 18, 742-752.

4 Masai, H., and Arai, K. (1997) *Frpo*, a novel single-stranded DNA promoter for transcription and for primer RNA synthesis of DNA replication. *Cell*, 89, 897-907

5 Sato, N., Arai, K. and Masai, H. (1997) Human and *Xenopus* cDNAs encoding budding yeast Cdc7-related kinases: *in vitro* phosphorylation of MCM subunits by a putative human homologue of Cdc7. *EMBO J.* 16, 4340-4351.