

試験管内反応系を用いた 分裂酵母複製開始制御機構の解析

特集 プロジェクト研究

升 方 久 夫*

Mechanisms of initiation of fission yeast DNA replication
and its regulation

Key Words : Eukaryotic DNA Replication, Replication origin, Cell cycle

1. はじめに

大阪大学大学院理学研究科での教育研究のかたわら、平成9年度10月から科学技術振興事業団のさがけ研究21「素過程と連携」のプロジェクト研究に参加している。この紙面をおかりして、私が携わっている研究内容を簡単に紹介したいと思う。

まず「さがけ研究21」プロジェクトは、名前からして21世紀に大きく開花するような意欲的な野心的な研究を行いなさいという主旨と判断される。私の研究分野は基礎的でベンチャー的な要素の少ない分野であるが、この機会に普通の科研費申請では躊躇するような、break-throughを目指した研究を行ってみたいと思った。

2. 真核生物の複製研究

まず、簡単に真核細胞での複製研究の背景を紹介したい。

細胞が増殖するためにはゲノムDNAを正確に倍加し娘細胞に分配することが必須である。特に真核生物ではゲノムDNAの複製と分裂期(M期)が密接にリンクしている。例えばM期が終わってからはじめてDNAの複製が開始することができ、また逆に複製が終了しないうちは分裂が起こらないように制

御されている。真核生物でもDNA合成反応そのものは原核生物で解明された機構と大筋で同じであろうと考えられるが、真核細胞の場合には複製を細胞周期の他の反応と密接に関連して制御するために、複製の開始機構が複雑になっていると思われる。

今から20年ほど前に私が生物学を学び始めた頃、原核生物特に大腸菌での複製研究が隆盛を極めており、日本においても優れた研究成果が続々と提出されていた。一方真核細胞の複製研究は1968年にHubermanとRiggsが哺乳動物染色体の複製が定点から両方向に進行することを示したが、その後の長い間ブラックボックスから抜け出せなかった。その最も大きな原因は多くの真核細胞では複製開始点があった以上に複雑であり、しかも生物種によって非常に異なっているためであろうと考えられる。真核生物の中で最初に複製開始点の構造が明らかになったのは出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* であり、染色体断片を環状にして細胞に導入することにより自律複製(染色体外で独立して複製)させることができた。出芽酵母では自律複製配列(ARS)の機能構造の解析を経て複製開始点を認識する機構まで一気に解析が進んだ。さらに、細胞周期の制御に関わる多数の遺伝子の発見に伴って、複製と細胞周期の非常に緊密な連携を明らかにする研究が急速な進展を遂げ始めた。

3. 複製研究のモデル系としての分裂酵母

私がさがけ研究21での真核生物の複製開始研究の材料として選んだ分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* はその名の通り増殖する際に細胞が大きくなって2つに分裂する点が、芽を出して増えていく出芽酵母とは大きく異なる。このような形態の違いに



*Hisao MASUKATA
1952年10月5日生
1975年大阪大学・理学部・生物学科卒業
現在、大阪大学大学院・理学研究科・
生物科学専攻、助教授、理学博士、
分子遺伝子
TEL 06-6850-5432
FAX 06-6850-5440
E-Mail masakata@bio.sci.osaka-
u.ac.jp

とどまらず、分裂酵母は多くの遺伝子にイントロンがあること、染色体分配に必要なセントロメアが高等真核生物のように長い領域から構成されていることなど、出芽酵母とは非常に大きな違いがみられる。とりわけ複製開始点の構造が出芽酵母とは非常に異なっており高等動物の複製開始点と類似性がみられることがわかってきた。

まず、出芽酵母の複製開始点は自律複製配列 (autonomously replicating sequence : ARS) の解析から約 100 塩基対 (base pair : bp) のなかに 11bp の必須配列と十数 bp の補助配列を 2-3 個含む非常に単純な構造をしている。それに対し、ヒト等の哺乳類では染色体上の数十キロ bp の領域がひとつの複製開始点の機能に必要であり、十分な複製効率を示す自律複製断片は得られていない。したがって出芽酵母とヒトでは複製開始点の構造に非常な違いがある。我々はこれまでに分裂酵母染色体の 100kb の領域にある自律複製断片 (ARS) を網羅的に解析し 5 つの ARS を分離した。それらのうち自律複製効率が高い 3 つは染色体上でも複製開始点として機能することを証明した。分裂酵母での複製に必要な塩基配列を明らかにするために、最も効率よく複製する *ars2004* という約 3kb の自律複製断片に欠失、塩基置換を導入して自律複製能を解析した結果、約 1kb の断片内の数十 bp ずつの 3 つの領域が複製に必要であることが判明した (図 1 参照)。それらの 2 つはアデニンが片方の DNA 鎖に非常に片寄って連続する配列であり、様々な人工的な配列との置換により、アデニン/チミンストレッチが分裂酵母 ARS の最も重要な配列であることを結論した。アデニン/チミンストレッチの長さによって複製能が高くなることからアデニン/チミンストレッチが重複して存在することが効率よい複製に必要であると考えられる。この様にある意味でいい加減な構造は高等動物の複製開始点の構造と類似していると考えられ、出芽酵母とは非常に異なっている。分裂酵母の複製開始点

は高等動物のプロトタイプに近いのではないかと想像される。

細胞周期において制御されているステップは複製の開始段階であり、複製開始点と蛋白質の相互作用が重要な段階として考えられる。よって、複製開始点上で起こる複合体形成反応を明らかにすることが複製の制御機能の解析には不可欠である。分裂酵母の複製開始点は、高等動物との類似点を持ち、かつ複製開始点での DNA 構造の変化や蛋白質因子の相互作用を解析可能であるという点でこのうえない材料であると思われる。

4. 何を明らかにするか

限られた時間のプロジェクト研究において何を明らかにするか、研究の焦点をどこに絞るかが問題である。この研究では、機能構造の解明された分裂酵母の複製開始点を最大限に利用して、細胞内での複製開始点に作用する蛋白質複合体の機能の解明と、試験管内での複製開始反応の再現を目標とすることにした。

出芽酵母 ARS では複製に必須の 11bp の配列を認識する蛋白質 (origin recognition complex : ORC) が分離されており、6 つのサブユニットからなることが知られている。ほとんどの真核生物で ORC サブユニットのホモログが分離されていることから ORC は他の生物種でも何らかの機構で複製開始点を認識している可能性が高い。分裂酵母では *orpl*, *orp2* の 2 つの ORC サブユニット遺伝子が分離されている。いずれも増殖に必須であり S 期への進行が起こらなくなることから複製開始に重要な機能を持つと考えられている。

まず、分裂酵母の複製開始点の認識機構を解明する必要がある。分裂酵母複製開始点の構造は出芽酵母のような短い必須配列が見出されず、長いアデニン/チミンストレッチが必須である。この様に異なる構造と配列を認識するのがはたして ORC であろうか？

次に複製開始点上に形成される蛋白質複合体を明らかにし、細胞周期の制御の中で複合体の性質あるいは構成成分がどのように変化するかを明らかにすることが必要である。これらの解析を細胞内で行うとともに、さらに充分な理解を得るためには試験管内での反応系を用いて生化学的な解析を行う必要がある。真核生物では現在のところ試験管内で複製反応が可

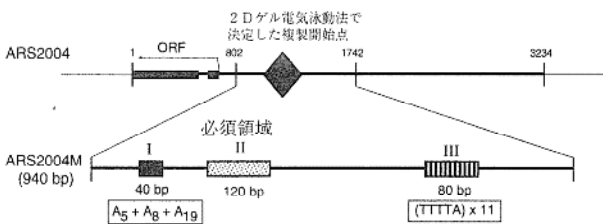


図 1 分裂酵母 *ars2004* の必須構造

能な系はアフリカツメガエル卵の抽出液のみである。この系では、外から加えた DNA あるいは精子核 DNA を 1 回限り複製する。その際に ORC をはじめ他の生物種で複製に必要とされる蛋白質が必要である点で正常な複製反応と考えられる。ただし、本来のアフリカツメガエルの DNA だけでなくどのような DNA でも複製し、さらに複製開始点が決まっていないう特性を持つ。したがって、複製開始段階での DNA の局部構造の変化などを解析するのは困難である。かつて出芽酵母を用いて ARS 断片を細胞抽出液に加えることによって複製を行わせようという試みが行われたがいずれも特異的な複製開始点からの複製を検出することはできなかった。この理由として細胞周期の条件が満たされていないためにいくつ複製開始点が供給されても開始反応にいたらなかったのではないかと考えられる。なんとか分裂酵母で試験管内での複製開始を行わせることができないかというのがこのプロジェクトの最も大きな狙いである。

5. 分裂酵母複製開始点の認識

我々は出芽酵母とは大きく異なる構造を持つ分裂酵母複製開始点に ORC が結合するか否かを検定した。染色体上の *orp1* 遺伝子を FLAG タグを組み込んだ FLAG-*orp1* 遺伝子に置換し、FLAG 抗原基を検出する抗体を用いて Orp1 蛋白質を検出可能にした。細胞内の DNA-蛋白質複合体をホルマリンで固定した後、DNA を超音波で小さな断片に切断し、FLAG 抗体により Orp1 と共に免疫沈降される DNA 断片を PCR 反応により検出した。染色体上の複製開始点の存在しない領域は検出されないのに対し、*ars2004* 領域や別の複製開始点である *ars3002* 領域は PCR によって増幅された。よって、分裂酵母染色体の複製開始点に ORC が特異的に結合すると結論した。

6. 試験管内複製開始点認識反応

分裂酵母 ORC による複製開始点の認識機構を明らかにするために試験管内での解析系を開発した。FLAG-Orp1 組換え蛋白質を発現している細胞から FLAG 抗体により FLAG-Orp1 を含む蛋白質複合体を免疫沈降し、放射能標識した DNA を試験管内で加え形成された DNA-蛋白質複合体を再び免疫沈降により回収することにより結合反応を検出し

た。複製開始点である *ars2004* 断片に対して結合が見られ、複製能のない断片には結合しなかった。この結合反応は *ars2004* 断片内の複製必須領域断片を多量に加えることにより競合阻害され、またアデニン/チミン 40mer 断片によっても阻害された。現在のところ FLAG 抗体で回収した画分に ORC 構成成分である Orp2 が含まれることを確認しており ORC 複合体の活性であろうと考えている。これらの結果から分裂酵母 ORC は複製開始点の必須配列であるアデニン/チミンストレッチに特異的に結合するものと考えている。分裂酵母複製開始点には非常に長い領域にわたってアデニン/チミンストレッチが見られることから、ORC が多重に結合し特異的な高次複合体を形成する可能性が考えられる。これらの点については ORC を部分精製して解析したい。

7. 細胞周期特異的な複製開始点複合体形成

アフリカツメガエル卵の抽出液を用いた研究から細胞周期あたり 1 回限りの複製を保証する複製ライセンス因子の構成成分として Mcm 蛋白質複合体が同定されている(大阪大学、滝澤ら)。Mcm 複合体は非常によくにたアミノ酸領域を持つ 6 つのサブユニットから構成され、生物種を通じて非常によく保存されている(Mcm ファミリー蛋白質)。したがって他の生物種でも複製開始の制御に重要な機能を果たすと考えられる。ツメガエル、ヒト等では M 期終了と共に Mcm 複合体が染色体のほぼ全域に結合し、S 期が進行するに連れて染色体から解離することが示されている。出芽酵母では Mcm 複合体は M 期終了後複製開始点に結合することが示されている。また出芽酵母あるいは分裂酵母で Mcm 蛋白質ファミリー遺伝子は全て増殖に必須であり S 期への進行が異常になることが示されている。これらの知見から分裂酵母でも Mcm が 1 度限りの複製の制御に深く関与していると考えられる。我々は Mcm サブユニットである Mcm6 の特異的抗体を用いてクロマチン免疫沈降法により、Mcm が G1 期から S 期に特異的に分裂酵母複製開始点に結合することを証明した。

Mcm 蛋白質の機能はまだ解明されていないが、三菱化成生命研究所の石見らはヒト Mcm の 3 つのサブユニットが作る 6 量体が DNA 二重鎖を巻き戻す DNA ヘリカーゼ活性を持つことを示している。複製開始点が ORC によって認識されたのちに DNA

合成が開始する前段階の反応として複製開始領域の DNA 二重鎖が巻き戻されて開裂する可能性が、ColE1 プラスミド、大腸菌、SV40 ウイルスなどのシングルレプリコンの複製開始機構から類推することができる。出芽酵母では Mcm 蛋白が複製フォークと共に染色体上を移動するという結果も報告されており、Mcm が複製開始点に結合した後にどのような機能を果たすのかが複製開始反応の重要な鍵となる。さらに Mcm は複製の開始を何らかの方法でモニターし、自らが染色体から解離して再複製を阻止すると考えられる。これらの問題を明らかにするために (1) 分裂酵母細胞内で Mcm 蛋白質が複製開始点にどのような機構で結合するのか、(2) 複製開始前後で Mcm と複製開始点との相互作用ならびに結合部位は変化するか、(3) Mcm を染色体から解離させる機構を解析しつつある。分裂酵母では細胞周期を停止させる変異株や複製開始に異常のある変異株を用いて、複製開始にいたる各ステップを分割することにより上記の問題への答えが得られることが期待される。さらに、各ステップから調整した DNA-蛋白質複合体、あるいは試験管内での再構成した複合体を細胞抽出液によって処理することにより、試験管内での複製開始反応、複製開始点の二重鎖構造の変化、Mcm 蛋白質の移動や離脱を検出する予定である。細胞内での S 期への移行には Cdk キナーゼや Cdc 7 キナーゼが関与することが示唆されている。これらのキナーゼの効果を試験管内で検出することも可能であると思われる。

8. 遺 伝 的 解 析

ここまで試験管内での解析に重きをおいた経過と計画を説明してきたが、分裂酵母の大きな利点のひとつは遺伝的手法を用いることである。複製開始に関与する因子は ORC, Mcm, Cdc6/Cdc18, Cdc7-Dbf4, Cdc45 など複製開始だけですでに 15 種類以上が知られており、さらに実際に DNA 合成反応を行う DNA ポリメラーゼの構成成分と複製開始因子とポリメラーゼを結びつける因子を含めるとゆうに 30 以上の遺伝子産物が必要と考えられる。複製開始に限って考えても未だ未発見の因子があるのではないかと考えられる。この様な遺伝子を分離する

ために新たな変異株を分離しようと考えている。分裂酵母染色体上には数百個の複製開始点があると考えられるのに対し、複製開始点を 1 つか持たない ARS プラスミドは複製効率の低下がすぐさまプラスミドの喪失として検出できると考えて、ARS プラスミドを脱落しやすい変異株を分離しつつある。

一方で、複製開始に必要な ORC 構成成分や Mcm の機能を明らかにするためにそれぞれの遺伝子から変異遺伝子を作製し、解析しつつある。*orp1*, *orp2* の遺伝子の温度感受性株は複製に欠損を示し、複製の開始あるいは S 期の進行に伴って致死となる。また *orp1*, *orp2* 変異株の中には、複製の異常をモニターするチェックポイント材構に異常を示すものも得られた。この様な欠損が起きる機構を明らかにすることにより ORC の別の機能が示されるのではないかと考えている。

9. お わ り に

最近、ヒト染色体の複製開始点である β -globin 領域を染色体の他の場所に移動して新たな複製開始点を作り出したという成果が報告された。複製開始点となるために必要な断片はアデニンとチミンに富む 2-3kb の領域であるが、この断片だけでは自律複製能は検出されないことからアデニンとチミンに富む領域は複製開始に必要であるが十分ではないと考えられる。ヒトの ORC がはたしてこの領域に選択的に結合するか否かが興味を持たれる問題である。分裂酵母では複製開始点に ORC が集約的に結合することにより複製開始に必要な構造を作り上げることができるのではなかろうか。それに対し、高等動物ではより広範囲の領域に ORC 結合配列が分散し、複製開始のためには他の要因、例えば転写因子によるクロマチン構造の改変や特別の高次構造の形成を必要とするのではないかとと思われる。

染色体複製は全ての生物種に必要な反応であり、複製開始の制御は普遍的な機構によって行われていると考えられる。一方で個々の生物種はそれぞれの染色体構成の変化と共に独自の構造の複製開始点発達させてきたのではなかろうか。複製開始機構はこの様な生物種の独自性と普遍性の接点の反応であると思われる。