

## 真核生物の DNA 複製開始制御機構の解明

### Regulatory Mechanism of Eukaryotic DNA Replication

研究代表者 岡山大学薬学部助教授 水島徹

Faculty of Pharmaceutical of Science, Okayama University

Tohru MIZUSHIMA

An interaction between the Origin Recognition Complex (ORC) and Cdc6p from *S. cerevisiae* is the first and a key step in the initiation of chromosomal DNA replication. We report that ORC and Cdc6p bind to each other in the presence of ATP and origin DNA. This process is regulated by adenine nucleotides bound to ORC. Furthermore, Cdc6p increases the DNA binding specificity of ORC in a manner dependent on Cdc6p ATPase activity. These data suggest that Cdc6p participates with ORC in selecting the location of origins in chromosomes of yeast. Based on these results in yeast, we suggest that in metazoan species, Cdc6p may be an essential determinant of origin specificity.

#### 1. 研究目的

遺伝情報の複製という、生物にとって最も重要な役割を担う DNA の複製反応は、厳密に制御されなければならない。この制御機構に関する最も重要な研究課題に、「どのような機構で、複製された直後の複製開

始点からの再複製開始が抑制されるか」という問題がある。この再複製開始抑制機構はこれまで全く未解明であったが、申請者はこれまで大腸菌を使ってこの機構に対し、全く新しいモデルを提唱しその証明に成功した。一方最近、真核細胞の複製開始因子が同定され、その構造及び機

能がこれまで申請者が研究してきた大腸菌の複製開始因子とよく似ていることが明らかになった。そこで、真核生物にも、申請者が大腸菌で明らかにした再複製開始抑制機構と同様の機構が存在する可能性が考えられた。本研究提案の目標は、この考えに基づいて真核生物の DNA 複製開始制御機構を明らかにすることである。真核生物の DNA 複製の制御機構を知ることは細胞増殖の制御機構の解明につながり、生物学的にも、また医学的応用的にも大変重要な課題である。申請者は、この研究が新しい抗ガン剤のターゲットの発見にもつながると考えている。現在の抗ガン剤の多くは、DNA 複製を阻害してガン細胞を死滅させようとするものである。私は、もともと高い DNA 複製能を持つガン細胞の DNA 複製を阻害し細胞を殺すより、過剰な DNA 複製をおこさせて殺す方が効率的であり、ガン細胞に対する選択性も達成しやすいと考えている。すなわち本研究により、再複製開始抑制機構が明らかになれば、それを阻害し過剰な複製開始をおこさせる薬剤の抗ガン剤としての開発につながると考えている。

## 2. 研究経過

大腸菌に比べ、真核生物の染色体 DNA 複製の研究は大変遅れている。その理由は、染色体 DNA 複製の試験管内再構成系が確立されていないためである。大腸菌で 1984 年にこの染色体 DNA 複製の試験管内再構成系が初めて確立されてからわずか 10 年程度の間、染色体 DNA 複製の分子機構、及び制御機構が明らかになったことから考えても、真核生物の染色体 DNA 複製の試験管内再構成系の確立は大変重要な課題である。

生化学的解析に比べ、真核生物の DNA 複製に関する遺伝学的解析は最近急速に進んでいる。その結果、細胞内における DNA 複製開始機構のモデルが提唱されている。出芽酵母の場合、複製開始部位を認識する因子 ORC (Origin Recognition Complex) は細胞周期を通じて複製開始部位に常に結合している。従って、複製開始反応の最初の段階は、次の因子 (Cdc6p) が、複製開始部位に結合している ORC に結合する反応である。この反応は複製開始反応の律速反応と考えられており、複製開始制御機構において、最も重要な反応である。しかしながら前述のように、この最初の反応に関しても、その試験管内再構成系は確立されておらず、複製開始の制御機構の研究は全く進んでいない。

我々は大腸菌において、複製開始因子 DnaA の ATPase 活性が、DnaA を活性型の ATP 結合型から、不活性な ADP 結合型へ変換することにより、活性化すること、及びこの不活性化が、複製開始後の再複製開始抑制に主要な役割を果たしていることを見いだした。前述の ORC と Cdc6p は、共に ATP 結合活性、ATPase 活性を有している。そこで我々は、大腸菌 DnaA に相当する真核生物の因子を ORC、あるいは Cdc6p と考え、少なくともどちらかの ATPase は、DnaA 同様、再複製開始の抑制に関与していると考えた。この考えを生化学的に証明するためには、前述の、Cdc6p が複製開始部位に結合している ORC に結合する反応の試験管内再構成系を確立する必要があったので、そこから研究を開始した。

昆虫細胞で大量発現した分裂酵母の ORC 及び、大腸菌内で、GST 融合型蛋白質として大量発現した分裂

酵母の Cdc6p を精製し、種々の条件下で結合実験を行った。その結果、ORC と Cdc6p が複製開始部位を含む DNA 依存的に結合する条件を見いだした。放射標識した DNA を用いた実験からこの条件では、ORC と Cdc6p と DNA が1対1対1で大変効率的に複合体を形成していることが分かった。その結果は、我々が、ORC と Cdc6p の相互作用の試験管内再構成に世界で初めて成功したことを示している。

次に我々はこの再構成系を使い、複製開始反応の最初の段階であるこの ORC と Cdc6p の相互作用の制御機構を開始した。DnaA の場合を参考に、この相互作用も ATP/ADP により制御される可能性を考え、ATP、及び ADP の ORC と Cdc6p の相互作用に対する効果を調べた。その結果、ADP が阻害的に働くことを見いだした。変異蛋白質を用いた解析から、ADP が ORC に結合すると ORC と Cdc6p の相互作用が抑制されることを示した。このことは、DnaA 同様、ORC への ATP/ADP 結合により複製開始反応が制御されていることを示唆している。また、ORC の ATPase も、ORC を不活性化し、複製後の再複製開始抑制に関与していることが考えられる。

次に我々は、Cdc6p が ORC に結合することにより ORC と DNA の結合がどのように変化するかを調べた。その結果、Cdc6p が ORC の複製開始部位への結合の特異性を大きく上昇させることを見いだした。興味深いことに、この Cdc6p の新しく発見された機能は、Cdc6p の ATPase 依存であった。即ち、Cdc6p の ATPase 活性は、ORC の複製開始部位への結合を促進し、複製開始を促進する可能性が示された。

### 3. 研究成果

(1) これまで、何度も試みられてきたが成功しなかった複製開始部位を持つ DNA 依存的な ORC と Cdc6p の相互作用の試験管内再構成系を確立した。

(2) ORC の ATPase が、この複合体形成を負に制御する可能性を示した。

(3) ORC の DNA 結合の特異性を上昇させるという Cdc6p の新たな機能を発見した。またこの機能が Cdc6p の ATPase 依存であることを示唆した。

### 4. 今後の課題と発展

1. この複合体にさらに複製に必要な因子を加え、染色体 DNA 複製の試験管内再構成系を確立する。
2. 同様の実験をヒト細胞で行い、ガン化との関連性、及びその阻害剤の抗ガン剤としての有効性を調べる。
3. Cdc6p が ORC の DNA 結合の特異性を上昇させる分子機構を解明する。

### 5. 発表論文リスト

1. Makise, M., Mima, S., Tsuchiya, T., and Mizushima, T. Identification of amino acids involved in the functional interaction between DnaA protein and acidic phospholipids. *J. Biol. Chem.* in press.
2. Yamaguchi, Y., Hase, M., Makise, M., Mima, S., Yoshimi, T., Ishikawa, Y., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Involvement of Arg-328, Arg-334, and Arg-342 of DnaA protein in the functional interaction with acidic

- phospholipids. *Biochem. J.* 340, 433-438. (1999)
3. Makise, M., Sakamoto, K., Tsuchiya, T., and Mizushima, T. Identification of a high-copy-number plasmid suppressor of a lethal phenotype caused by mutant DnaA protein which has decreased intrinsic ATPase activity *Biol. Pharm. Bull.* 22, 904-909. (1999)
  4. Mima, S., Yamaguchi, Y., Kondo, T., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Role of the amino-terminal region of the DnaA protein in opening of the duplex DNA at the *oriC* region. *FEMS. Micro. Lett* 176, 163-167. (1999)
  5. Mizushima, T., Tsutsumi, S., Rokutan, K. and Tsuchiya, T. Suppression of ethanol-induced apoptotic DNA fragmentation by geranylgeranylacetone in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Dig. Dis. Sci.* 44, 510-514. (1999)
  6. Tsutsumi, S., Rokutan, K., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Geranylgeranylacetone suppresses spontaneous apoptotic DNA fragmentation in cultured guinea pig gastric pit cells *Biol. Pharm. Bull.* 22, 886-887. (1999)
  7. Tsutsumi, S., Rokutan, K., Tsuchiya, T. and Mizushima, T. Spontaneous apoptotic DNA fragmentation in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Dig. Dis. Sci.* in press.
  8. Mine, T., Morita, Y., Kataoka, A., Mizushima, T. and Tsuchiya, T. Expression in *Escherichia coli* of a new multidrug efflux pump, MexXY, from *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 43, 415-417. (1999)
  9. Shiota, S., Shimizu, M., Mizushima, T., Ito, H., Hatano, T., Yoshida, T., and Tsuchiya, T. Great reduction in the MIC of  $\beta$ -lactams in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by epicatechin gallate, an ingredient of green tea (*Camellia sinensis*). *Biol. Pharm. Bull.* 22, 1388-1390. (1999)
  10. Mizushima, T. (2000) Site-directed mutational analysis of DnaA protein, the initiator of chromosomal DNA replication in *E. coli*. *J. Biochem.* in press.