

哺乳類細胞増殖制御機構の分子遺伝学的研究

Molecular genetical studies on the control mechanism of mammalian cell proliferation

代表研究者	理化学研究所主任研究員 Chief Scientist, RIKEN Institute Fumio HANAOKA	花岡文雄
協同研究者	東京大学薬学部講師 Lecturer, Fac. of Pharm. Sci., Univ. of Tokyo Takemi ENOMOTO	榎本武美
	米国デューク大学医学部研究員 Res. Assoc., Dept. of Med., Duke Univ. Hitoshi KUROSE	黒瀬等
	九州大学医学部助教授 Assoc. Prof., Fac. of Med., Kyushu Univ. Kenji SHIMIZU	清水憲二

In order to elucidate the control mechanism of mammalian cell proliferation, we have mainly studied the mechanism of mammalian chromosome replication as a whole. We have chosen three approaches. First approach is a genetic one. Certain number of temperature-sensitive (ts) mutants were isolated from mouse FM3A cells. One of the ts mutants, designated as tsFT 20, was shown to contain heat-labile DNA polymerase α (pol. α). By the use of this mutant strain, it was proved that pol. α is essential for mammalian DNA replication. In addition, the human gene for pol. α on the X chromosome was assigned. We have also identified several mutants including a mutant defective in cytokinesis, a mutant defective in H1 histone phosphorylation, and a mutant which has heat labile ubiquitin-activating enzyme, E1. As for the isolation of mutants from mammalian cells, we have shown that a new type of nucleoside analogue, N^4 -aminocytidine, is effective on mouse FM3A cells. Second approach is an enzymological one. FM3A cells were used for the identification and characterization of enzymes and proteins supposed to be involved in DNA replication. DNA polymerase α /primase complex, a primase stimulation factor, four DNA-dependent ATPases, three pol. α stimulation factors, DNA topoisomerases I and II have been identified, as well as a stimulation factor for the assembly of nucleosome. DNA helicase activity was detected in two of the DNA-dependent ATPases (B and C1). Third approach is the reconstitution of DNA replication in cell-free system. By use of polyoma virus DNA as a template, cell-free extract from FM3A cells supported DNA replication in the presence of polyoma virus large T-antigen. This cell-free system will be useful for the analysis of the function of replication enzymes and proteins as well as the characterization of ts mutants.

研究目的

哺乳類細胞の増殖制御機構を明らかにすることは、細胞の癌化・分化・老化・再生といった高次な生命現象を理解するために是非とも必要であ

る。一般に多細胞生物では、細胞間相互作用を含めた外からの刺激が細胞膜受容体に作用し、そこで細胞内に向けて新たな情報（セカンド・メッセンジャー）が作り出される。例えば静止期（ G_0

期)にある細胞を血清などで刺激すると、まず血清中の増殖因子と細胞膜上の受容体との結合が起こり、受容体と直接、あるいは伝達器であるGTP結合蛋白質(G蛋白質)を介して間接的に結合しているエフェクター分子に情報が伝達され、各種のセカンド・メッセンジャーが作り出される。その後、様々な情報伝達系の関与を経て種々の遺伝子の発現が誘導され、最終的には核でのDNA複製へとつながっていく。細胞膜近傍での情報伝達系については、G蛋白質を中心として数多くの知見が蓄積している。一方、核でのDNA複製の開始機構についてはまだほとんど解析が進んでいないのが現状である。

本研究の最終目的は、細胞膜受容体からの情報がどのような道筋でDNA複製の開始につながっていくのかを明らかにするところにある。そのためにはまず、DNA複製の開始機構をはじめとして、遺伝子の複製機構を、これまではほとんど分離されていなかったDNA複製に欠陥のある温度感受性(ts)突然変異株を中心に解析する。同時に同じ細胞からDNA複製に関連した酵素・蛋白質を精製し、またポリオーマウイルスDNAを鋳型とした無細胞DNA複製系を確立し、哺乳類細胞の遺伝子複製機構を総合的に理解することを目的とした。

研究経過と成果

1. 温度感受性突然変異株の分離と解析

a) 変異株分離法の確立

大腸菌K12株を例に持ち出すまでもなく、共通の材料を多くの研究者が用いることは、相互の材料や情報を交換し合うことにより飛躍的な研究の進展が期待できる。筆者らは温度感受性(temperature-sensitive; ts)変異株の分離に使用する親株として、わが国の体細胞遺伝学者によく用いられているマウスFM3A細胞を選択した。

FM3A細胞は、C3Hマウス乳癌(腺癌)を腹水型化し、マウス腹腔内で継代移植されていたものを東北大の中野博士が培養細胞化したものである。もともと腹水癌のため、培養においても静置状態で浮遊細胞として増殖し、大腸菌と同じような容易さで継代できる。また軟寒天内でのコロニー

形成能がほぼ100パーセントで、パスツールピペットによって容易に細胞のクローニングができるという遺伝学的操作に有利な特徴をもっている。更に世代時間が37°Cで12-13時間、33°Cでも15-16時間と、培養哺乳類細胞としては極めて増殖が速いことも利点である。更にこの細胞をマウスの腹腔内で培養すると、高密度の細胞浮遊液が得られるので、生化学的な研究材料としても有用である。

突然変異誘起剤としてはニトロソグアニジン(*N*-methyl, *N'*-nitro, *N*-nitrosoguanidine; MNNG)を用いることとした。MNNGはDNAの塩基をメチル化するもので、大腸菌ではDNA複製分岐点で、より高頻度に変異を誘発することが知られている。変異を起こさせた細胞集団のなかからts変異株を効率よく見つけるためには、変異を起こしていない野生株を選択的に殺す処理が必要である。その目的にはトリチウム自殺法を用いた。これは培地に高濃度の ^3H チミジンを加えて、その時点でDNA合成をしている細胞のDNAに ^3H チミジンを取りこませる。その後の培養で、 ^3H 崩壊により発生する β 線によって自殺させるというものである。

筆者らがDNA合成に関するts変異株を分離するうえで特に考慮した点は、従来の方法が変異原処理した細胞を制限温度(高温:通常39°Cを用いる)に長時間曝していたために、DNA合成のts変異株も死んでいたのではないかということである。そこで制限温度に曝す時間をできるだけ短くするように、S期同調細胞を用いることにした。

表1にはこのような細胞同調の効果を実際に調べた例を示す。FM3A野生株に0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でMNNGを作用させ(生存率10%程度)、半分はそのまま、残りの半分は過剰チミジンでS期に同調し、39°Cで10 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ の ^3H チミジンをそれぞれ16時間及び6時間作用させた。非放射性チミジンを加えた培養液で洗浄し ^3H チミジンを除いたのち、33°Cで軟寒天培地内にコロニーを形成させた。分離したコロニーの中でtsのもの割合が、同調集団を用いた場合に非同調

表 1. 同調法および非同調法による温度感受性変異株の分離効率

Selection system	No. of isolated colonies(A)	No. of ts mutants (B)	(B)/(A)+100
Randomly growing	1176	5	0.425
Synchronized at S phase	1680	44	2.76

Selection system	No. of ts mutants			
	0-40%	41-60%	61-80%	81-100% ^{a)}
Randomly growing	0	0	2	0
Synchronized at S phase	2	11	9	7

^{a)} Percentage of ³H-dTMP incorporation: 39°C, 5 h/39°C, 0 h.

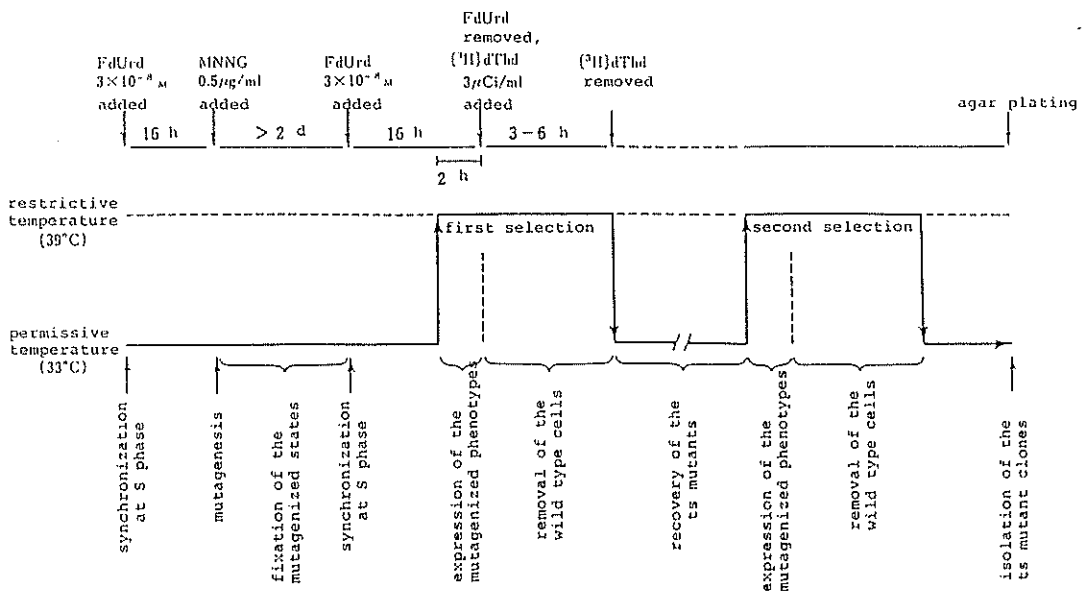


図 1. DNA 複製関連温度感受性変異株の濃縮・分離法のスケジュール

に比べ約 7 倍高くなっている。表 1 の下半分は、39°C での DNA 合成の低下度で ts 変異株を分けたものである。39°C, 5 時間処理によって, [³H]チミジンのとりこみが対象の 60% 以下のものが非同調系では全く得られていないのに対し, S 期同調系では 13 株も得られている。図 1 には DNA 複製に関連した ts 変異株の分離法の全体を示した。トリチウム自殺法は通常, 2 回繰り返す, 最終的に残った細胞を軟寒天培地に播き, 33°C でコロニーを形成させる。生じたコロニーを 2 枚の寒天培地に竹串で拾ってレプリカし, 33°C と

39°C でインキュベート, ts 性をチェックする。

なお突然変異誘起剤として, いつも同じ薬剤を用いることはゲノムの同じ箇所に変異を起こし, 結果的に同じタイプの突然変異株しか得られない可能性がある。そこで新しいタイプのヌクレオシド類似体である N⁴-アミノシチジンを FM3A 細胞に適用し, 変異株の分離に有用であることを明らかにした。

b) ts 変異株の解析

前述の方法でマウス FM3A 細胞より分離した ts 変異株について, まず放射性チミジン, ウリジ

表 2. マウス FM3A 細胞の細胞周期性温度感受性変異株の相補性群

Group	Strain	Phenotype	ts Protein	Arresting point
(A)	tsFT 20	DNA ts	DNA polymerase α	G1/S-S
(B)	tsFT 5			
	tsFT 21	DNA ts		
	ts 85	Disappearance of uH 2A	Ubiquitin-activating	S-G 2
	tsFT 144	protein	enzyme (E1)	
	tsFT 173			
(C)	tsFT 48	DNA ts	Unknown	G1/S-S
(D)	tsFT 107	DNA ts	Unknown	G1/S-S
(E)	tsFT 111	DNA ts	Unknown	G1/S-S
(F)	tsFT 117	DNA ts	Unknown	G1/S-S
(G)	tsFT 141	DNA ts	Unknown	S-G2
(H)	tsT 244	DNA ts	Unknown	G1/S-S
		Decrease in nuclear DNA polymerase α		
(I)	tsFT 50	Multinuclei formation	Unknown	M*
(J)	tsFT 101	Multinuclei formation	Unknown	M*
(K)	tsFT 74	Micronuclei formation	Unknown	M*
(L)	tsFT 210	Defect in hyperphosphor- ylation of histone H1	H1 kinase(?)	G2
	tsFT 666			

* These cells were not arrested in the M phase but were defective in M phase function.

ン、ロイシンの酸不溶性画分へのとりこみを調べ、高温で DNA 合成が特異的に低下するものを選択した。次に ts 変異株どうしをポリエチレングリコールを用いて細胞融合し、増殖に関する ts 性が相補されるか、といういわゆる相補性試験を行った。その結果、表 2 にまとめたように 12 の遺伝的相補性群が得られた。次にサイトフルオロメーターを用いて細胞周期の解析を行った。例えば tsFT 20 と名付けた細胞を 39°C で 16 時間培養したときの細胞ごとの DNA 量の分布は、野生株の FM3A 細胞に DNA 合成阻害剤であるアフディコリンや過剰チミジンに 16 時間作用させたときと同様に、G1/S 期境界及び S 期に細胞が蓄積したパターンを示した。tsFT20 細胞をあらかじめ 5-フロデオキシウリジン (FdUrd) 処理により G1/S 期に同調しておき、同調解除後、33°C 及び 39°C で培養したところ、33°C では 6 時間ではほぼ完全に S 期を通過するのに対し、39°C では S 期に入ったところで止まってしまった。これらのことから、tsFT20 細胞は S 期に停止点をもつ変異株であることが明らかになった。また増殖復帰株の出現頻度から、tsFT20 細胞の変異が

single mutation であることが示唆された。

サイトフルオログラフィーの結果から、tsFT 20 細胞の変異蛋白質が DNA ポリメラーゼ α (pol. α) である可能性を考え、細胞抽出液を調製し、活性化 DNA を鋳型・プライマーとして pol. α 活性を調べた。まず、39°C で培養した細胞から無細胞抽出液を調製し、その pol. α 活性を 33°C で測定したところ、39°C での培養時間が長くなるほど活性は低下し、8 時間では 33°C の 20% 以下にまでなった。この低下のパターンは、同時に測定した細胞レベルでの DNA 合成能の低下とよく一致していた。

次に、33°C で培養している細胞から無細胞抽出液を調製し、試験管内で 39°C 及び 33°C のプレインキュベーションを行った後、pol. α 活性を 33°C で測定した。ここでも 39°C でのインキュベーションが長くなるほど活性は低下し、tsFT20 細胞の pol. α 活性は、野生株に比べて明らかに温度感受性を示した。そこで無細胞抽出液から pol. α を部分精製して調べたところ、tsFT20 細胞の pol. α は確かに ts であった。後に述べるように pol. α に対するモノクローナル抗体を用いたア

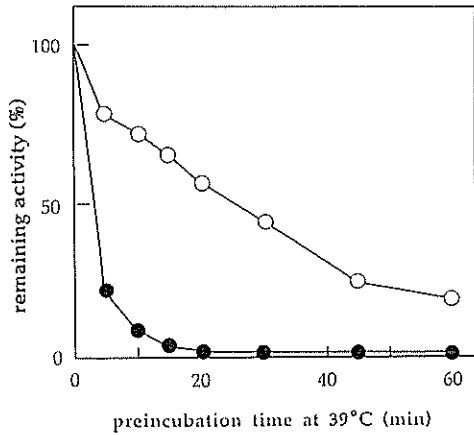


図2. 精製したDNAポリメラーゼ α の温度感受性: tsFT 20細胞のpol. α (●)およびFM3A cl. 28細胞のpol. α (○)を各時間、39°Cで前処理したのち、基質dNTP、(^3H) dTTPを含むを加え、33°Cで30分間保温し、pol. α の残存活性を測定した。tsFT 20由来pol. α は親株に比べて著しく高温感受性である。

フィニティーカラムを利用してほぼ完全精製したpol. α を用いても、tsFT20細胞のpol. α がtsであることが確認された(図2)。

この変異株のフローサイトメトリー、DNAファイバーオートラジオグラフィー、増殖復帰株解析、pol. α 活性の熱失活曲線解析などの結果から、pol. α がDNA複製に必須であることを最終的に証明した。また39°CでDNA鎖伸長速度は変化せず、レプリコン複製開始の頻度が低下すること、S期の途中で39°Cにシフトし、数時間後に33°Cに戻して細胞周期を進行させると、さまざまなタイプの染色体異常や姉妹染色分体交換(SCE)が高頻度に誘発されることが明らかとなった。このほか核から漏出しにくいpol. α の活性が非許容温度で低下するtsT 244、細胞質分裂に異常のあるtsFT101、G2期に停止点をもち、高温でヒストンH1のリン酸化が低下するtsFT 210などの

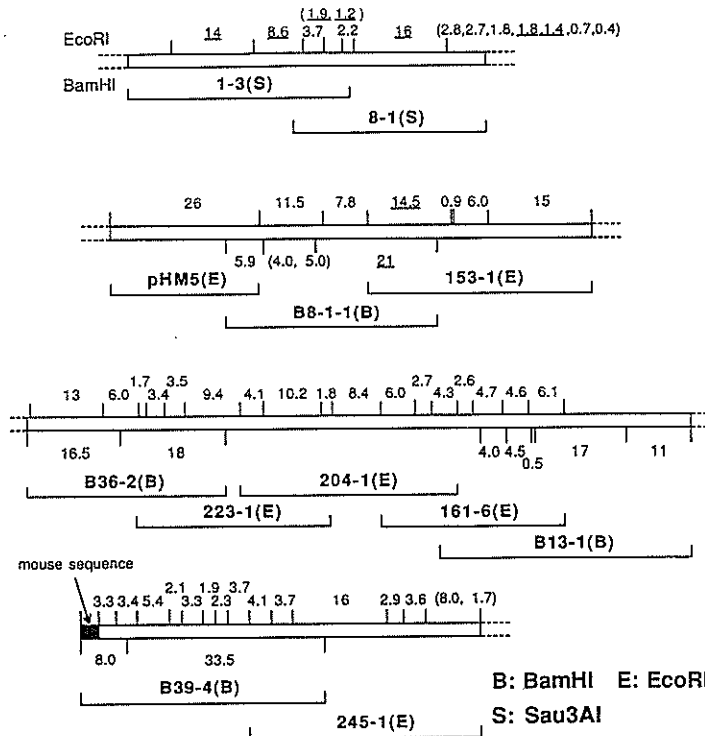


図3. DNAポリメラーゼ α 触媒サブユニットの遺伝子を含むヒトゲノムコスミッドクローン: 数字はkb(キロ塩基対)を示す。下線を引いた部分はcDNAとハイブリダイズする断片である。最上段の14 kbのEcoRI断片に触媒サブユニットのN末部分が含まれている。

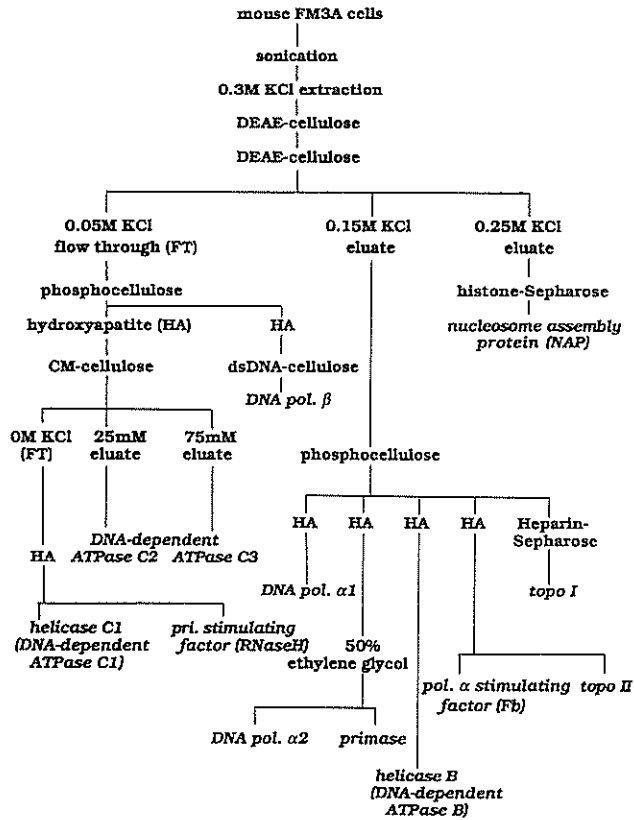


図4. マウス FM3A 細胞からの DNA 複製関連酵素・蛋白質の系統的分離・精製

変異株の性状解析を行った。

c) ヒト DNA ポリメラーゼ α 遺伝子の染色体マッピングとクローニング

変異株の応用の一つとして、当該遺伝子の単離が考えられる。上述の tsFT 20 細胞の場合、その ts 性を正常にもどすことのできる DNA 断片を分離すれば、そこに複製酵素である pol. α の遺伝子が含まれるはずである。そこでヒト DNA による増殖復帰株の分離を試みた。しかしながらリン酸カルシウム法での復帰株の分離はうまくいかなかった。その原因の一つとして、pol. α の種特異性が考えられたので、ヒト染色体で変異が救えるか否かを、ヒト細胞との融合実験によりチェックした。その結果、ヒト染色体のうち X 染色体のみが融合細胞の高温での増殖能及び抗体に対する反応性からみたヒト型の pol. α の発現とカップルしていた。そのことから pol. α の構造遺伝子が、ヒ

トでは X 染色体上にあることを示すことができた。またヒト染色体として X 染色体のみを含む融合細胞 (M 6-39) の亜株で、X 染色体の長腕部に欠損をもつものを解析し、pol. α 遺伝子が Xpter-Xq22 に局在することを証明した。次に M 6-39 株に γ 線を照射し、DNA を切断した後、tsFT 20 株と再度融合することにより、ヒト pol. α 遺伝子を含む領域を狭めようとした。この操作によって、ヒト DNA として 400-500 kb (X 染色体 DNA の 1% 弱) を含む第二次融合細胞を得たが、これに更に γ 線照射し、再度 tsFT 20 株と融合してヒト DNA を減らそうという試みには成功していない。この第二次融合細胞のヒト DNA 部分をコスミドベクターに結合したライブラリーは、ヒト pol. α のゲノムクローンの分離に適当な材料であろう (図 3)。

最近、米国スタンフォード大学の Wong 博士

らは、ヒト KB 細胞の pol. α の最大サブユニット (後述) の部分アミノ酸配列を決定し、それをもとに、DNA プローブを合成、cDNA のクローニングに成功した。我々も彼らの発表した塩基配列をもとに全長 5.4 kb に及ぶヒト cDNA を分離し、コスミドライブラリーとハイブリダイズさせ、このゲノムライブラリーの中に pol. α の最大サブユニット遺伝子が存在することを確認している。また推定される N 末部分を含むコスミドクローンも得られているので、転写制御領域の研究にも有用であろう。

2. DNA 複製関連酵素・蛋白質の分離と同定

筆者らは FM3A 細胞から DNA 複製に関与している酵素・蛋白質を分離・精製するために、C3H マウスあるいは ddY マウスの腹腔内に FM3A 細胞を接種し、細胞がかなり増えたところで FdUrd を腹腔内注射、S 期の細胞の割合が高い細胞集団を得る方法を確立した。この方法を用いて集めた FM3A 細胞を出発材料として、図 4 に示すように DNA 複製関連酵素・蛋白質の系統的な分離・同定を進めている。

a) DNA ポリメラーゼ α -プライマーゼ複合体

pol. α は哺乳類細胞に見出されている 4 種ないし 5 種の DNA ポリメラーゼのうちで最も早く分離された酵素である。その活性は DNA 複製能との間に密接な関係があること、pol. α 活性を中和する抗 pol. α モノクローナル抗体を細胞にマイクロインジェクトすると、細胞の DNA 複製が阻害されること、更に前述のように pol. α の ts 変異株 (tsFT 20) は DNA 複製も ts であること、などの実験的事実から、DNA 複製に必須の酵素であることが明らかである。また pol. α は RNA プライマーを合成する酵素であるプライマーゼと強固な複合体を形成しており、このことも複製酵素であることを積極的に支持している。

以前から pol. α には分子としての多様性が認められてきた。その原因の一部が内在性の蛋白質分解酵素による分解にあることは、pol. α に対するモノクローナル抗体カラムによる迅速な精製によって均一な標品が得られるようになったことから確かである。しかし pol. α の分子構成自体に

多様性をもたらす原因がある。すなわちサブユニット構成である。

筆者らは、マウス FM3A 細胞から、従来のイオン交換セルロースカラムクロマトグラフィーを中心とした方法で pol. α を精製し、プライマーゼ活性を伴う pol. α ($\alpha 1$) と伴わない pol. α ($\alpha 2$) の 2 種の pol. α を得た。その後、 $\alpha 1$ は 50% エチレングリコール存在下に DEAE セルロースや一本鎖 DNA セルロースのカラムクロマトグラフィーを行うことにより、ポリメラーゼとプライマーゼの活性を担う部分を分離できることを明らかにした。またこれらを混合することにより、 $\alpha 1$ の再構成にも成功した。その後、抗体カラムを用いて迅速かつ均一に精製できるようになり、マウス FM3A 細胞の pol. α -プライマーゼ複合体のサブユニット構成は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による推定分子量で、180-, 68-, 54-, 46-kDa の四つからなることが明らかとなった。更にサブユニットの解離実験から、DNA ポリメラーゼ活性は、180-kDa と 68-kDa の両方又はいずれかが担い、プライマーゼ活性は 54-kDa と 46-kDa の両方又はいずれかが担っていることが明らかになった。また前述の tsFT 20 細胞からも抗体カラムを用いて pol. α の高度精製標品を得て、180-kDa あるいは 68-kDa のいずれかに変異のあることを生化学的に示した。

これらのサブユニットの遺伝子としては、最小サブユニットが酵母とマウスから、また最大サブユニットの cDNA が酵母とヒトから、それぞれ分離されている。今後、他のサブユニットの遺伝子もクローニングされ、それぞれが大腸菌などで過剰発現されるような状況になれば、各サブユニットの構造と機能及びサブユニット間の相互作用の詳細な研究などが可能になるであろう。

b) DNA ポリメラーゼ α 活性促進因子

pol. α 活性の測定は、通常、未変性 DNA に限定的に DNase I を作用させ、一本鎖切断やギャップを入れた、いわゆる活性化 DNA を用いて行うが、ポリ (dA)・オリゴ (dT) (20:1) のような一本鎖部分の多い鋳型・プライマーを用いた場合、精製の過程で活性が急に低下することがあ

る。これは一本鎖 DNA を鋳型として読ませるために必要な因子が、pol. α と分離してしまうことによると考えられる。筆者らが FM3A 細胞より分離した促進因子は pol. α に特異的で、その鋳型・プライマーに対する Km 値を低下させる。この因子は分子量 30 K の蛋白質で、抗体染色により核内に存在し、細胞増殖の盛んな時期に増量することが認められている。DNA の複製分岐点では、比較的長い一本鎖 DNA 領域が生じていると考えられ、このような因子が実際に細胞内で働いている可能性が高い。

c) DNA ヘリカーゼ

複製フォークの進行に先立って、DNA 二重らせんの巻きもどしが必要である。同様の活性は、DNA 修復や組み換えにも働いている。その活性を担う酵素を DNA 巻きもどし酵素 (DNA unwinding enzyme) 又は DNA ヘリカーゼ (DNA helicase) と呼ぶ。原核細胞では既に数多くの DNA ヘリカーゼが同定されているが、例外なく DNA に依存して ATP を分解する活性 (DNA 依存性 ATP アーゼ) をもっている。

そこで筆者らはまず FM3A 細胞から DNA 依存性 ATP アーゼの分離を試み、互いに性質の異なる 4 種類の DNA 依存性 ATP アーゼ (B, C1, C2, C3) を分離した。続いて Hübscher と Stalder が仔ウシ胸腺から DNA ヘリカーゼ活性を検出するのに用いたのと同様、フェージ一本鎖 DNA に相補的な合成オリゴヌクレオチドをアニールさせたものを基質として、ヘリカーゼ活性の検出を試みたところ、ATP アーゼ B 及び C1 にヘリカーゼ活性を検出した。ATP アーゼ B, C1 共に一本鎖 DNA に結合し、結合した DNA 上を 5'→3' の方向へ移動しつつ最大 140 ヌクレオチド程度の二本鎖 DNA を巻きもどすことができる。これらのヘリカーゼの生理的機能は明らかではないが、複製あるいは修復に欠損のある変異株の解析から、徐々に分かりつつある。

一方、SV 40 やポリオーマなどの DNA がんウイルスの T 抗原は、ウイルス DNA の複製開始点 (*ori*) を認識する蛋白質であると同時に、転写の調節や非許容細胞の不死化にも関与する多機能蛋白

質であるが、更に DNA ヘリカーゼ活性をもっていることを、SV 40 については、Stahl らが、またポリオーマについては筆者らのグループが、それぞれ明らかにした。核 DNA のレプリコン複製開始時にも、これらの T 抗原と類似の作用をするヘリカーゼの存在が予想され、*ori* の同定とともに今後の重要な課題である。

d) DNA トポイソメラーゼ I 及び II

哺乳類細胞には、ATP を要求しない type I トポイソメラーゼ I (topo I) と要求する type II トポイソメラーゼ II (topo II) とが見出されている。両者はリン酸セルロースカラムクロマトグラフィーによりはっきりと分離できる。われわれはマウス FM3A 細胞から topo II をほぼ均一なまでに精製した。精製された topo II は分子量 167 K, 151 K の二本のバンドを含み、V8 プロテアーゼによる限定分解の実験から、両者は構造上、類似の蛋白質であることが示唆された。精製の過程で topo II とある程度まで挙動を共にする蛋白質リン酸化酵素 (PK II) が見出された。PK II は cAMP や cGMP により活性が影響を受けないこと、Ca²⁺ によって Mg²⁺ が置き換えられないこと、ヘパリンによる阻害度が強くないこと、などからよく知られている A キナーゼ、C キナーゼ、カゼインキナーゼ II などとは異なることが判明した。topo II をアルカリ性フォスファターゼ処理すると活性は大幅に低下し、それを PK II で処理して再リン酸化すると topo II 活性は顕著に増加した。マウス細胞内においても topo II はリン酸化蛋白質として存在しており、細胞周期の中で、リン酸化の度合いが変化する。細胞の topo II 活性の変化は、主として topo II 自体の量ではなく、リン酸化・脱リン酸化によって引き起こされていると考えられる。

e) プライマーゼ活性促進因子

細胞内で DNA が複製される際、少なくとも片側 (ラギング鎖と呼ばれる) は岡崎フラグメントの合成を介して進行する。従ってその合成開始に必要なプライマー RNA を効率よく合成するための機構が存在するはずである。そこで DNA ポリメラーゼ α -プライマーゼ複合体から解離したプ

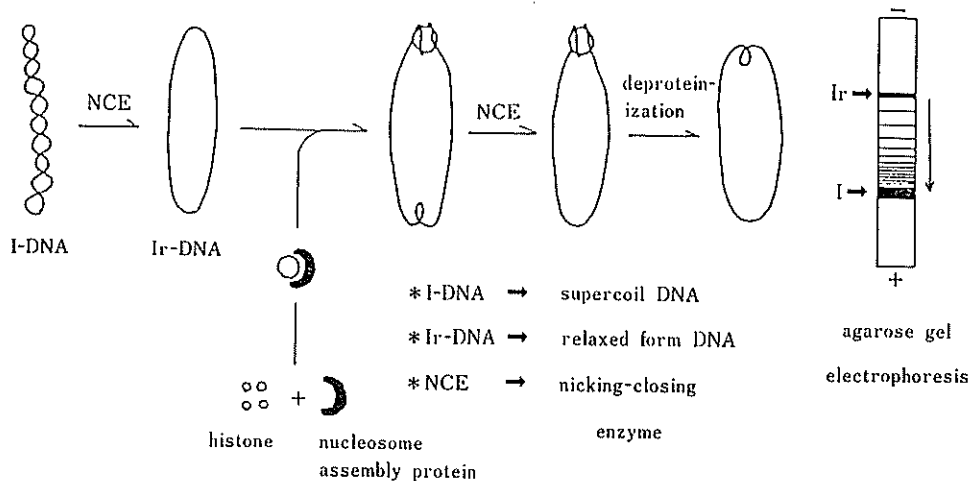


図5. ヌクレオソーム形成促進活性の検出法

ライマーゼを用い、ポリ dT を鋳型として ATP 存在下でプライマーを合成させ、大腸菌の DNA ポリメラーゼ I の Klenow fragment の共存により合成される DNA として、間接的にプライマー RNA 合成活性を測定した。プライマーゼ活性促進因子は、この活性の増加を指標として FM3A 細胞から精製した。精製標品には、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、分子量 35 K, 34 K, 21 K の 3 種のバンドのみが検出された。この因子は DNA ポリメラーゼ α -プライマーゼ複合体による DNA 合成を促進し、その促進はプライマー RNA 合成を介する DNA 合成の場合にのみ観察された。更にこの因子は、RNA-DNA ハイブリッドの RNA 鎖を endonucleolytic に切断する RNase H 活性を示した。以上の結果より、RNase H 活性をもつ因子がプライマーゼ RNA の除去に関与するばかりでなく、その合成にも関与していることが示唆された。

f) ヌクレオソーム形成促進蛋白質

DNA の複製に伴って、ヌクレオソーム構造が速やかに形成されることは、複製領域におけるクロマチンの電子顕微鏡観察などによって知られている。試験管内で 4 種のヒストンと DNA とを混合すると、塩基性蛋白質であるヒストンが無秩序に DNA と結合し、ヌクレオソーム構造は形成されない。これまで試験管内でヌクレオソーム構造

を形成させるには、高塩濃度、高尿素濃度の条件から透析によって徐々に生理的な塩濃度に近づけていくという方法が用いられていた。しかし細胞内では生理的塩濃度下でヌクレオソームが形成されるはずであり、それを促進する蛋白質性の因子の存在が予想された。そこで図 5 に示すアッセイ法で検索したところ、HeLa 細胞や FM3A 細胞の無細胞抽出液中にその活性を見出した。イオン交換セルロースカラムクロマトグラフィーなどによって精製されたヌクレオソーム形成促進蛋白質は、見掛けの分子量 53,000 の酸性蛋白質であった。この蛋白質に対するモノクローナル抗体を作製し、イムノブロットング法を行ったところ、粗抽出液の段階ではこの蛋白質は分子量 58,000 で、精製のステップや 4°C での保存時間が進むにつれて、分解されて 53,000 になることが明らかとなった。また抗体による細胞染色から、この蛋白質は核に局在し、細胞周期においてはヒストン合成と対応した変動を示した。

放射標識したコアヒストンと精製したヌクレオソーム形成促進因子（当初、assembly protein-I のつもりで AP-I と呼んでいたが、転写因子の AP-I が有名になってしまったため、nucleosome assembly protein, NAP と命名し直した）との結合実験を行った結果、(1) NAP と 4 種のコアヒストンは、12 S の複合体 (NAP, H2A, H2B, H3, H4

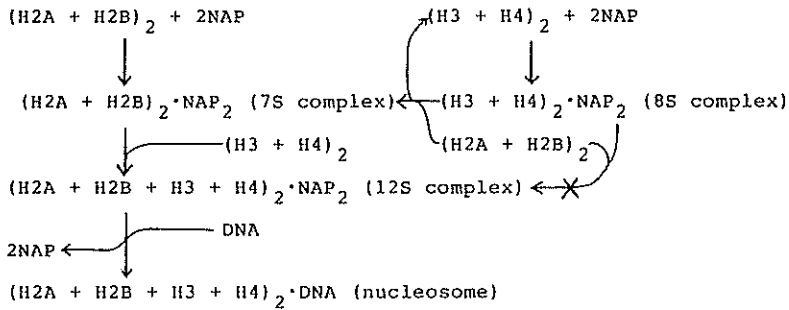


図6. ナクレオソーム形成促進蛋白質(NAP)によるナクレオソーム形成反応の模式図: 詳細は本文参照のこと。

各2分子ずつから成る)を形成する。(2) NAPとH2A, H2Bとは7Sの複合体(NAP, H2A, H2B各2分子ずつから成る)を形成する。(3) NAPとH3, H4とは8Sの複合体(2分子ずつのNAP, H3, H4から成る)を形成することが示された。7Sの複合体にH3とH4を加えると12Sの複合体が形成され、7Sは12S複合体への中間体と考えられる。一方、8S複合体にH2AとH2Bを加えても12S複合体は形成されず、8S複合体の7S複合体への移行、すなわちH3とH4がH2A, H2Bに追い出される現象が観察された。12S複合体をDNAと反応させるとNAPが遊離して、ナクレオソーム構造が形成されることから、12S複合体はナクレオソーム形成の中間体と考えられる。図6に以上の結果をまとめて模式的に表した。細胞内で、実際このような反応が起きているかどうかは、今後の課題である。

3. 無細胞DNA複製系

DNA複製などの複雑な生化学反応の機構を解明するためには、intact cellでの現象を反映したcell-free系の確立が必要である。哺乳類細胞のDNA複製については、幾つかのレベルの異なるcell-free系が開発されている。われわれはSV40やポリオーマといったパポバウイルス群のDNAを鋳型とした無細胞複製系を用いることにした。これらのウイルスDNAは、核内でナクレオソーム構造をとり、特定の部位(ori)から両方向に複製される、という核DNAと類似の構造及び複製様式をとる。またSV40やポリオーマウイルスのDNA複製に関与している蛋白質の中で、

ウィルスゲノムにコードされている蛋白質は前述のT抗原のみであり、他の因子はすべて宿主のものを利用する。すなわちSV40やポリオーマウイルスDNAのcell-free合成系は、宿主DNA複製のよいモデル系と考えられる。

a) ポリオーマウイルスDNAの無細胞複製系
村上らはSV40ウイルスDNAのcell-free複製系に準じ、ポリオーマウイルス(PyV)DNAのcell-free系を開発した。この系はポリオーマウイルスのoriとT抗原、それにマウス(やハムスター)の無細胞抽出液(なかでもpol. α -プライマーゼ複合体)を必要としている。筆者らはマウスFM3A細胞より分離したDNA合成に関するts変異株の解析にこのPyV DNAの系が利用できるかどうかをpol. α のts変異株であるtsFT20細胞と、ユビキチン活性化酵素E1がtsになっているtsFT5細胞を用いて調べた。これらの細胞を制限温度下で培養し、経時的に細胞抽出液を調製、PyV DNAのcell-free系における複製活性を測定したところ、細胞のDNA合成が、uH2A(ヒストンH2Aにユビキチンが結合したもの)の減少とともに低下するtsFT5の細胞抽出液ではPyV DNAの複製活性の低下は認められなかった。一方、tsFT20の抽出液ではPyV DNAの複製活性の顕著な低下が認められた。この抽出液にFM3A細胞野生株より精製したpol. α -プライマーゼ複合体を加えることにより、複製能は回復した。このようにPyV DNAのcell-free合成系は、マウス細胞のDNA合成に関するts変異株の解析に有用であることが示された。

b) SV 40 染色体の無細胞複製系

真核細胞の染色体 DNA は、いわゆるヌクレオソーム構造を形成しており、DNA 複製や転写の制御機構を考える上で、クロマチン構造の影響を考えることは重要である。われわれはモデル系として SV 40 染色体を材料に用い、クロマチン複製の分子機構を研究した。

まず SV 40 を感染した CV-1 細胞から SV 40 染色体を調製し、それを鋳型に無細胞複製系を構築した。この系はウイルス染色体、HeLa 細胞粗抽出液、精製した SV 40T 抗原の 3 者に依存した DNA 合成を行った。この DNA 合成は SV 40 DNA の複製起点から両方向に、かつ、半保存的に進行し、*in vivo* の DNA 複製様式をよく反映していた。さらにはこの系の DNA 合成は、HeLa 細胞粗抽出液をいくつかの精製蛋白質（DNA ポリメラーゼ α /プライマーゼ、SSB、DNA トポイソメラーゼ I、II）によって部分的に置き換えることができた。

粗抽出液系においては、鋳型 DNA に元来結合していたヒストンと抽出液中に存在する遊離ヒストンにより、複製された DNA はほぼ完全なヌクレオソーム構造を形成した。一方、精製蛋白質の系では、遊離のヒストンは存在しないが、親鎖由来のヒストンによって部分的にヌクレオソーム構造が形成された。このヌクレオソーム形成反応は過剰量の pBR 322 DNA の添加によってもあまり阻害されず、親鎖 DNA に結合していたヒストンの大部分は複製時にも DNA から遊離しないことが示唆された。さらに、この時親鎖 DNA に結合していたヒストンは、リーディング鎖とラギング鎖の両娘鎖にほぼ同等の割合で分配された。

今後の課題と発展

今回の研究によって、マウス FM3A 細胞から多数の温度感受性変異株が得られた。そのなかで ts 蛋白質が明らかになったのは DNA ポリメラーゼ α が ts の tsFT 20、ユビキチン活性化酵素 E1 が ts の ts85、そしてヒストン H1 キナーゼが ts の tsFT210 の 3 株である。tsFT 20 に関してはさまざまな細胞生物学的な解析を行い、数々の興味ある知見が得られた。一方、ts 85 に関しては同

じ相補性群に属する他の細胞、例えば tsFT 5 と比べ、非許容温度における停止点が異なるなど、まだ、複雑な様相を呈しており、細胞周期進行における蛋白質のユビキチン化の役割は今後に残された問題である。tsFT 210 に関しては、最近、金沢大の安田博士らにより、cdc 2 キナーゼ遺伝子の点突然変異であることが明らかにされ、細胞周期の制御において中心的な役割を果たしていると考えられる本酵素の哺乳類細胞における役割の解明に有用であろう。その他の相補性群については ts 蛋白質が何であるか、想像するのも難しい状況なので、遺伝子導入による増殖復帰株の分離などを通して、変異蛋白質の同定を行っていきたい。FM3A 細胞の ts 変異株の解析と並んで、細胞周期に関する遺伝子が既に多数分離されている酵母を利用して、その相同遺伝子を哺乳類細胞から分離するというアプローチも有効と思われる。筆者らはすでにそのような遺伝子の一つをクローニングしており、今後も同様の方法で、増殖関連遺伝子が分離されていくものと予想される。

DNA 複製に関連した酵素及び蛋白質については、幾種類もの分離・精製を行ってきた。その一部についてはアミノ酸の部分配列を決定するなど、遺伝子クローニングの準備ができています。今後、それらの遺伝子を分離し、さらには転写調節領域を解析するなどによって、細胞増殖の制御機構に迫ることができると期待される。

無細胞 DNA 複製系についての研究は、上記の ts 変異株と複製関連酵素・蛋白質の研究を結ぶものとして極めて有用である。特にクロマチン構造も含めた形での試験管内 DNA 複製系は、転写と複製とのカップリングや、DNA 損傷の修復と複製の問題など、DNA の複製だけにとどまらず、さらに高次の現象へとつなげるための足掛かりになるものと思われる。

謝 辞

本研究は昭和 62 年から平成 2 年までの 3 年間にわたる日産科学振興財団の研究助成によるものである。この助成により、これまであまり陽の当たらなかつた哺乳類細胞の体細胞遺伝学を中心とした基礎研究を、大きく発展させることができ、

さらに次のステップへの広い基盤を築くことができた。ここに同財団及び選考委員の方々に厚く御礼申し上げる。特に阪大細胞工学センター 岡田善雄教授には終始暖かい御指導と御鞭撻を賜り、深く感謝申し上げたい。また種々の有益な御助言を賜った東京大学薬学部 宇井理生教授、本研究に御協力頂いた東京大学薬学部生理化学教室、理化学研究所放射線生物学研究室の皆さんに心から感謝の意を表す。

発表論文

- 1) Ishimi, Y., Kojima, M., Yamada, M., and Hanaoka, F.: Binding mode of nucleosome assembly protein (AP-1) and histones. *Eur. J. Biochem.*, **162**, 19-24 (1987).
- 2) Ishimi, Y., Kojima, M., Takeuchi, F., Miyamoto, T., Yamada, M., and Hanaoka, F.: Changes in chromatin structure during aging of human skin fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, **169**, 458-467 (1987).
- 3) Hama-Inada, H., Takahashi, M., Kasai, M., Shiomi, T., Ito, A., Hanaoka, F., and Sato, K.: Optimum conditions for electric pulse-mediated gene transfer to mammalian cells in suspension. *Cell Struct. Funct.*, **12**, 173-180 (1987).
- 4) Seki, M., Enomoto, T., Hanaoka, F., and Yamada, M.: DNA-dependent adenosine-triphosphatase B from mouse FM3A cells has DNA helicase activity. *Biochemistry*, **26**, 2924-2928 (1987).
- 5) Eki, T., Enomoto, T., Murakami, Y., Miyazawa, H., Hanaoka, F., and Yamada, M.: Characterization of revertants derived from a mouse DNA temperature-sensitive mutant strain, tsFT 20, which contains heat-labile DNA polymerase α activity. *Exp. Cell Res.*, **171**, 24-36 (1987).
- 6) Eki, T., Enomoto, T., Murakami, Y., Hanaoka, F., and Yamada, M.: Characterization of chromosome aberrations induced by incubation at a restrictive temperature in the mouse temperature-sensitive mutant tsFT 20 strain containing heat-labile DNA polymerase α . *Cancer Res.*, **47**, 5162-5170 (1987).
- 7) Takahashi, M., Nishizawa, M., Negishi, K., Hanaoka, F., Yamada, M., and Hayatsu, H.: Induction of mutation in mouse FM3A cells by N^4 -aminocytidine-mediated replicational errors. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 347-352 (1988).
- 8) Eki, T., Enomoto, T., Murakami, Y., Hanaoka, F., and Yamada, M.: Characterization of DNA polymerase α activity from a mouse DNA temperature-sensitive mutant strain ts FT 20, which shows a defect in DNA polymerase α activity at restrictive temperatures. *Arch. Biochem. Biophys.*, **260**, 552-560 (1988).
- 9) Seki, M., Enomoto, T., Yanagisawa, J., Hanaoka, F., and Ui, M.: Further characterization of DNA helicase activity of mouse DNA-dependent adenosine triphosphatase B (DNA helicase B). *Biochemistry*, **27**, 1766-1771 (1988).
- 10) Suzuki, M., Enomoto, T., Masutani, C., Hanaoka, F., Yamada, M., and Ui, M.: DNA primase-DNA polymerase α assembly from mouse FM 3A cells: purification of constituting enzymes, reconstitution, and analysis of RNA priming as coupled to DNA synthesis. *J. Biol. Chem.*, **264**, 10065-10071 (1989).
- 11) Matsumoto, K., Nagata, K., Hanaoka, F., and Ui, M.: Tissue-specific DNA binding of nuclear factor proteins that bind to the adenovirus inverted terminal repeat. *J. Biochem. (Tokyo)*, **105**, 927-932 (1989).
- 12) Sugawara, K., Ishimi, Y., Yamada, M., Hanaoka, F., and Ui, M.: Heterogeneous assembly of nascent core histones to form nucleosomal histone octamers in mouse FM3A cells. *Eur. J. Biochem.*, **185**, 55-61 (1989).
- 13) Takeuchi, F., Hanaoka, F., Matsuta, K., and Miyamoto, T.: Inhibitory effects of gold sodium thiomalate on DNA polymerase α . *Clin. Exp. Rheumatol.*, **7**, 1-7 (1989).
- 14) Matsumoto, K., Nagata, K., Yamanaka, K., Hanaoka, F., and Ui, M.: Nuclear factor I represses the reverse-oriented transcription from the adenovirus type 5 DNA terminus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **164**, 1212-1219 (1989).
- 15) Hoshino S., Miyazawa, H., Enomoto, T., Hanaoka, F., Kikuchi, Y., Kikuchi, A., and Ui, M.: A human homologue of the yeast GST1 gene codes for a GTP-binding protein and is expressed in a proliferation-dependent manner in mammalian cells. *EMBO J.*, **8**, 3807-3814 (1989).
- 16) Eki, T., Enomoto, T., Miyajima, A., Miyazawa, H., Murakami, Y., Hanaoka, F., Yamada, M., and Ui, M.: Isolation of temperature-sensitive cell cycle mutants from mouse FM3A cells: Characterization of mutants with special reference to DNA replication. *J. Biol. Chem.*, **265**, 26-33 (1990)
- 17) Saijo, M., Enomoto, T., Hanaoka, F., and Ui, M.: Purification and characterization of type II topoisomerase: phosphorylation of topoisomerase

- merase II and modification of its activity, *Biochemistry*, **29**, 583-590 (1990).
- 18) Seki, M., Enomoto, T., Eki, T., Miyajima, A., Murakami, Y., Hanaoka, F., and Ui, M.: DNA helicase and nucleoside-5'-triphosphatase activities of polyoma virus large tumor antigen. *Biochemistry*, **29**, 1003-1009 (1990).
 - 19) Kato, K., Nakanishi, M., Arata, Y., Teshima, R., Terao, T., Miyamoto, H., Hanaoka, F., Ui, M., Masuzawa, Y., Hiraishi, S., Ishii, H., and Waku, K.: Characterization of a new type of variant of rat basophilic leukemia 2H3 cells presenting a different pattern of calcium signal. *Exp. Cell Res.*, **188**, 247-253 (1990).
 - 20) Masutani, C., Enomoto, T., Suzuki, M., Hanaoka, F., and Ui, M.: DNA primase stimulatory factor from mouse FM3A cells has an RNase H activity: purification of the factor and analysis of the stimulation. *J. Biol. Chem.*, **265**, 10210-10216(1990).
 - 21) Sugasawa, K., Murakami, Y., Miyamoto, N., Hanaoka, F., and Ui, M.: Assembly of nascent DNA into nucleosome structure in SV40 chromosomes by HeLa cell-free extract. *J. Virol.*, **64**, 4820-4829(1990).
 - 22) Takada-Takayama, R., Tada, S., Hanaoka, F., and Ui, M.: Peptide mapping of the four subunits of the mouse DNA polymerase α -primase complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **170**, 589-595(1990).
 - 23) Takada-Takayama, R., Suzuki, M., Enomoto, T., Hanaoka, F., and Ui, M.: Purification and characterization of mouse DNA polymerase α devoid of primase activity. *FEBS Lett.*, **273**, 27-30(1990).
 - 24) Kudo, M., Sugasawa, K., Hori, T., Enomoto, T., Hanaoka, F., and Ui, M.: Human ubiquitin-activating enzyme (E1): compensation for heat-labile mouse E1 and its gene localization on the X chromosome. *Exp. Cell Res.*, in press.