

2002 年度長期派遣援助 成果報告書

(研究課題名:真核生物 MCM 複合体の複製開始点への結合機構)

複製開始前複合体に依存した *Xenopus* Scc2 と cohesin の染色体結合

Harvard Medical School 高橋 達郎

(派遣開始前の所属は大阪大学)

派遣期間 2002 年 10 月 1 日～2003 年 9 月 30 日

研究機関 Department of Biological Chemistry and Molecular Pharmacology,
Harvard Medical School, 240 Longwood Ave, Boston, MA 02115, USA

研究指導者 Dr. Johannes Walter

要旨

コヒーシンは正確な染色体分配に必須の蛋白質複合体であり、複製された姉妹染色体を染色体分配時まで接着する機能を持つ。酵母では、コヒーシンの染色体結合には、Scc2/Mis4 蛋白質が必要である。高等動物では、コヒーシンは染色体分配終期 (telophase) に染色体結合を開始することが知られているが、染色体結合の分子機構は明らかにされていない。コヒーシンの染色体結合と同時期に、染色体には複製開始点認識複合体 ORC、Cdc6、Cdt1、MCM2-7 複合体が順次結合し、複製開始前複合体 (pre-replication complex: pre-RC) を形成する。MCM2-7 は複製開始のヘリケースと考えられている。S 期初期に、pre-RC は蛋白質リン酸化酵素 Cdk2 により活性化され、染色体複製が開始する。

私は MCM2-7 の染色体結合機構と、その活性化の機構に興味を持ち、アフリカツメガエル卵抽出液を用いて MCM2-7 依存的に染色体に結合する因子の網羅的同定を試み、興味深いことにコヒーシンのサブユニット Smc1 と Smc3 を得た。コヒーシンの染色体結合の要求性を詳しく検討したところ、コヒーシンの染色体結合は pre-RC の構成要素である ORC、Cdc6、Cdt1 と MCM2-7 に依存し、一方で Cdk2 と、複製開始点の開裂には依存していなかった。また、アフリカツメガエル Scc2/Mis4 のホモログ (XSc2) を単離してその機能を解析したところ、XSc2 はコヒーシンの染色体結合に必須であり、XSc2 の染色体結合は MCM2-7 依存的であった。これらの結果は、高等動物においては、MCM2-7 を中心とする pre-RC の形成が、複製開始と Scc2 およびコヒーシンの染色体結合を結びつけていることを示している。

序論

細胞の増殖には、遺伝情報の正確な複製と分配が必須である。真核生物では、染色体 DNA 複製と分配は細胞周期の進行により厳密に制御されている。染色体 DNA は G1 期における複製開始前複合体 (pre-RC) の形成と、S 期初期の pre-RC の活性化という二段階の機構により、全ての領域が一回の細胞周期に一度だけ複製される¹。pre-RC は、複製開始点認識複合体 (ORC)、Cdc6、Cdt1 と、複製開始のヘリケースと考えられている MCM2-7 複合体が、

順次複製開始点に結合することにより形成される。S 期初期に、主として Cdk2 蛋白質リン酸化酵素の機能により、Cdc45 蛋白質を含む多数の複製開始因子が pre-RC に結合して活性化し、染色体複製が開始すると考えられている。Cdk2 は同時に新たな pre-RC 形成を阻害することにより、染色体の再複製を防止する。高等動物では、Cdt1 の阻害因子である geminin が S 期以降核に蓄積し、Cdk2 と独立の機構で再複製防止に機能することが知られている。

S 期において複製された姉妹染色体 DNA は、コヒーシン(cohesin)と呼ばれる蛋白質複合体によって接着され、M 期に姉妹染色体が分配されるまで対合したまま保持される²。この姉妹染色体の接着(コヒージョン: cohesion)は、染色体を正確に整列させ、正しく分配するのに必須の機構である。コヒーシンは Smc1、Smc3 の二つの SMC (Structural maintenance of chromosome) 蛋白質と、Scc1/Rad21 および Scc3 の二つの non-SMC 蛋白質により構成される巨大なリング型の蛋白質複合体である。このリングが複製された二本の染色体 DNA を取り囲み保持するという興味深い仮説が、Kim Nasmyth らのグループにより提唱されている³。M 期中期—終期において染色体が分配される際には、Scc1/Rad21 サブユニットが特異的蛋白質分解酵素により切断され、リングが開裂することにより姉妹染色体の接着が解消されると考えられている⁴。

コヒージョンの維持と解消の機構は比較的良く研究されている一方で、どのようにコヒーシンが染色体に結合し、コヒージョンが成立するかはよく分かっていない。酵母では、コヒーシンの染色体結合には Scc2/Mis4 蛋白質が必要であるが^{5,6}、詳しい分子機構は不明である。高等動物では、コヒーシンは染色体分配の終期から染色体結合を開始する^{7,8}が、その機構は分かっていない。私はアフリカツメガエル卵抽出液をモデル系として、コヒーシンの染色体結合が pre-RC の形成に依存することを示したので、ここに報告する。

結果と考察

私は、MCM2-7 の染色体結合を中心とした複製開始の分子機構を解析する目的で、MCM2-7 に依存して染色体に結合する因子の網羅的同定を試みた。アフリカツメガエル卵抽出液は、真核生物染色体複製開始のモデル系として広く利用されており、高濃度の複製開始蛋白質を含む試験管内反応系であるという点で、生化学的解析に特に適している。精子核 DNA を卵抽出液 (Low speed supernatant: LSS) に加えることにより、pre-RC が染色体上に形成され、ついで疑似核が形成され核輸送が起こることにより、複製開始蛋白質が核内に濃縮され、染色体複製が開始する。私の受け入れ先研究機関である Harvard 大学 Johannes Walter 博士は、ポストドク時代に John Newport 博士の研究室において、核を必要としない複製系の開発に成功しており、この無核複製系は様々な点で優れた特徴を持っている⁹。本系では、核膜成分を除去した卵細胞質抽出液 (High speed supernatant: HSS) に精子核を加えることにより pre-RC が染色体上に形成され、これに核抽出液 (Nucleoplasmic Extract: NPE) を加えることにより複製が開始する。この系では複製開始は NPE の添加に依存する為きわめて同調的であり、さらに核膜を必要としない為、複製開始蛋白質を NPE から除去することでその機能を詳細に知ることが可能である。私はこの無核複製系を利用して、MCM2-7 依存的に染色体に結合する蛋白質の網羅的同定を試みた。MCM2-7 の染色体結合を geminin を用いて阻害し、染色体

に結合した蛋白質を回収して二次元ゲル電気泳動により分離し、MCM2-7 の結合を阻害していない染色体を参照として比較した。その結果、MCM2-7 のサブユニットの他に、分子量 160k Da および 140k Da の、二つの蛋白質が MCM2-7 の存在と NPE の添加に依存して染色体に結合することを見いだした。Harvard Medical School, Department of Cell Biology の Steven Gygi 博士と共同で、質量分析によりこれら蛋白質を同定したところ、p160 はコヒーシンサブユニットの一つ Smc1、p140 は同じく Smc3 であると推測された。

コヒーシンの結合が MCM2-7 の染色体結合に依存するかどうかを確認する為に、コヒーシンの各サブユニットに対する抗体を入手し、染色体結合を免疫染色により検討した。結果、全てのサブユニットの染色体結合は geminin を加えることにより消失し、また NPE はコヒーシンの染色体結合を強く促進した。NPE は核抽出液であることから、NPE によるコヒーシン結合の促進は、コヒーシン結合が核輸送により促進されることを示しているのではないかと考え、核依存的に複製が行われる LSS において核輸送を阻害したところ、コヒーシンの染色体結合は強く阻害された。

geminin は Cdt1 の阻害因子である為、geminin によるコヒーシン結合の阻害は、この過程が Cdt1 の機能に依存していることを示唆する。この可能性を検証する為、卵抽出液から Cdt1 を特異的抗体により除去したところ、コヒーシン結合は阻害された。重要なことに、大腸菌から精製した組み替え Cdt1 蛋白質を Cdt1 を除去した卵抽出液に加えることにより、コヒーシンの染色体結合は回復した。Cdt1 は MCM2-7 の染色体結合に機能する為、次に MCM2-7 がコヒーシン結合に必要なかどうかを、卵抽出液から MCM2-7 を特異的抗体により除去して調べたところ、コヒーシン結合は阻害された。これと一致して、MCM2-7 の染色体結合に関わる他の二つの因子、ORC と Cdc6 もコヒーシンの染色体結合に必須であった。これらの結果は、MCM2-7 を含む pre-RC の形成が、コヒーシンの染色体結合に必須であることを示している。

pre-RC は複製開始に必須であることから、次に複製開始反応がコヒーシンの結合に必須である可能性を検討した。複製開始に必須の Cdk2 の活性を特異的阻害蛋白質 p27Kip により阻害したところ、複製開始は阻害されたが、コヒーシン結合は阻害されなかった。同様に、複製開始に必須の Cdc45 蛋白質を卵抽出液から除去した場合にも、コヒーシン結合の阻害は観察されなかった。これらの実験と一致して、コヒーシンの結合は MCM2-7 の染色体結合後、Cdc45 の結合前に開始することを、time course 実験により確認した。これらの結果は複製開始反応はコヒーシンの結合に必要なではないことを示している。

酵母ではコヒーシンの染色体結合には Scc2/Mis4 蛋白質が必要であることから、Scc2/Mis4 のツメガエルホモログ (XScc2) 遺伝子の一部をクローニングし、抗 XScc2 抗体を作成して XScc2 の機能を解析した。XScc2 は約 300k Da の蛋白質であり、NPE に濃縮されていることから核タンパクであると考えられた。XScc2 を卵抽出液から除去するとコヒーシンの結合が阻害され、Scc2 が酵母のみならず高等動物でもコヒーシン結合に機能することが示された。XScc2 の染色体結合は geminin によって阻害され、また MCM2-7 に依存していた。

高等動物では、コヒーシンは染色体分配終期に染色体結合を開始する。興味深いことに、pre-RC の形成も同時期に開始する¹⁰。これらの観察は、我々の発見した pre-RC に依存するコヒーシン結合機構が、高等動物で共通している可能性を示唆する。重要なことに、酵母での

研究から、コヒーシンの成立の為にはコヒーシンは DNA 複製の前に染色体に結合しなければならぬことが示されている¹¹。pre-RC に依存したコヒーシン結合機構は、コヒーシンの結合サイトが細胞周期の初期に確立することを保証するのではないだろうか。

酵母ではコヒーシンの結合は Cdc6 に、よって pre-RC に非依存的である¹¹。従って、酵母と高等動物では、コヒーシン結合の経路は異なっていると思われる。しかしながら、Scs2 は酵母同様ツメガエルでもコヒーシン結合に必要であった。もし Scs2 がコヒーシンを染色体に結合させる分子装置であるなら、本質的なコヒーシン結合の機構は真核生物で保存されていると考えられる。このコヒーシン染色体結合装置をどのように染色体に局在させるかという点で、高等動物と酵母に違いがあるのかも知れない。

参考文献

1. Bell, S. P. & Dutta, A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **71**, 333-74 (2002).
2. Nasmyth, K. Disseminating the genome: joining, resolving, and separating sister chromatids during mitosis and meiosis. *Annu Rev Genet* **35**, 673-745 (2001).
3. Gruber, S., Haering, C. H. & Nasmyth, K. Chromosomal cohesin forms a ring. *Cell* **112**, 765-77 (2003).
4. Uhlmann, F., Lottspeich, F. & Nasmyth, K. Sister-chromatid separation at anaphase onset is promoted by cleavage of the cohesin subunit Scs1. *Nature* **400**, 37-42 (1999).
5. Ciosk, R. et al. Cohesin's binding to chromosomes depends on a separate complex consisting of Scs2 and Scs4 proteins. *Mol. Cell* **5**, 243-54 (2000).
6. Tomonaga, T. et al. Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes Dev.* **14**, 2757-70 (2000).
7. Sumara, I., Vorlaufer, E., Gieffers, C., Peters, B. H. & Peters, J. M. Characterization of vertebrate cohesin complexes and their regulation in prophase. *J Cell Biol.* **151**, 749-62 (2000).
8. Darwiche, N., Freeman, L. A. & Strunnikov, A. Characterization of the components of the putative mammalian sister chromatid cohesion complex. *Gene* **233**, 39-47 (1999).
9. Walter, J., Sun, L. & Newport, J. Regulated chromosomal DNA replication in the absence of a nucleus. *Mol. Cell* **1**, 519-529 (1998).
10. Mendez, J. & Stillman, B. Chromatin association of human origin recognition complex, cdc6, and minichromosome maintenance proteins during the cell cycle: assembly of prereplication complexes in late mitosis. *Mol Cell Biol* **20**, 8602-12 (2000).
11. Uhlmann, F. & Nasmyth, K. Cohesion between sister chromatids must be established during DNA replication. *Curr. Biol.* **8**, 1095-101 (1998).