

DNA 複製開始因子の DNA 結合の分子ダイナミクス

Dynamics of DNA binding of replication initiation proteins

(日本生化学会推薦)

代表研究者 大阪大学 和賀 祥 Osaka University Shou WAGA

Summary

I investigated the dynamics of DNA binding of replication initiation proteins during formation of the pre-replicative complex (pre-RC) on plasmids in *Xenopus* egg extracts. The pre-RC was efficiently formed on plasmids at 23°C, with one or a few ORC molecules and about 10-20 MCM2 molecules loaded onto each plasmid. MCM interacted weakly but stoichiometrically with the plasmid in an ORC-dependent manner, even in the presence of geminin (with about 10 MCM2 molecules per plasmid). Interestingly, DNA binding of ORC, CDC6 and CDT1 was significantly stabilized in the presence of geminin, under which conditions about 10-20 molecules each of ORC and CDC6 were bound. Moreover, a similarly stable ORC-CDC6-CDT1 complex rapidly formed on DNA at lower temperature (0°C) without geminin, with about 10-20 molecules each of ORC and CDC6 bound to the plasmid, but almost no binding of MCM. However, upon shifting the temperature to 23°C, most ORC, CDC6 and CDT1 molecules were displaced from the DNA, leaving about one ORC molecule on the plasmid, while about 10 MCM2 molecules were loaded onto each plasmid.

These results imply that each DNA-bound ORC molecule loads only one or a few MCM2-7 complexes during metazoan pre-RC formation.

研究目的

真核生物の DNA 複製はゲノムの特定の領域から開始する。その開始に必要な DNA 配列については、出芽酵母では特定の塩基配列をもった DNA 配列として同定されているが、動物細胞などの高等真核生物では未だその詳細は不明であり、現在のところ酵母のようなコンセンサス配列はないというモデルが有力である。一方、複製開始に関わる複製開始タンパク質因子については酵母から動物まで保存された様々なタンパク質がこれまで同定されている。

複製の開始の際、複製開始因子 ORC が先ず DNA に結合し、その後、別の複製開始因子である CDC6 と CDT1 と共同して、DNA ヘリカーゼ活性を有する MCM2-7 複合体を DNA にロードすると考えられている。この結果生じた DNA-タンパク質複合体を複製前複合体 (pre-replicative complex: pre-RC) といい、この pre-RC 形成は DNA 複製の開始に必須のステップである。しかし、特に動物細胞では ORC などの複製開始タンパク質因子が DNA でどのように機能して pre-RC を形成させるのかについては、未だ不明な点が多い。この点を明らかにするために、本研究では、真核生物の細胞性 DNA 複製を *in vitro* で再現できる唯一の実験系であるアフリカツメガエル卵抽出液を使った *in vitro* DNA 複製を解析系として、pre-RC 形成における ORC、CDC6、CDT1 および MCM2-7 複合体の DNA 結合について詳細な解析を行った。

研究経過

先ず、解析をより容易にするために従来のアフリカツメガエル卵 *in vitro* DNA 複製系の改良を行い、マグネチックビーズに固定化した環状プラスミド DNA を鋳型とした DNA 複製系をこれまでに確立した。このプラスミドビーズ上に DNA および ORC に依存して pre-RC が形成され、またこの形成は pre-RC 形成の特異的阻害タンパク質である geminin によって阻害された。さらに、pre-RC 形成依存的に DNA 合成も起こることが確認された。

次に複製開始因子のプラスミドビーズへの結合の定量的な解析を行った。23℃で 30 分間卵抽出液とインキュベートすると、約 10 kb のプラスミド 1 分子に 1-2 分子の ORC および CDC6 が結合し、さらに 10-20 分子の MCM2-7 複合

体がプラスミド上にロードされた pre-RC が形成された。この MCM / ORC の結合比率 10・20 は、従来から鋳型として使われている精子クロマチンを使った場合とほぼ同じ値であることから、プラスミドビーズ上でも *in vivo* を反映した仕組みで pre-RC 形成が行われると推測される。

ところが、0℃で卵抽出液とインキュベートすると、MCM の DNA へのローディングがほぼ完全に阻害される一方で、ORC および CDC6 の DNA 結合量が約 10 倍増加することが分かった(プラスミド 1 分子につき約 10・20 分子の ORC および CDC6 が結合)。さらに、この状態から引き続き温度を 23℃に上げると、速やかに時間とともに ORC、CDC6 および CDT1 が DNA から解離し、一方、MCM2-7 は徐々に DNA へロードされていくことが分かった。また、0℃で形成された ORC-CDC6-CDT1-DNA 複合体を単離し、そこへ精製した MCM2-7 複合体を加えて 23℃でインキュベートすると、ATP 依存的に MCM2-7 の DNA へのローディングが行われた。

さらに、23℃の条件下でも *geminin* 存在下では 0℃と同様に ORC や CDC6 の DNA 結合量が約 10 倍増加した。興味深いことに *geminin* 存在下でも 10・20 分子の MCM2-7 が弱いながらも ORC 依存的にプラスミドに結合することが分かった。

以上のように、卵抽出液中の pre-RC 形成においては複製開始因子の DNA 結合と解離がダイナミックに行われていることが判明した。

考察

MCM2-7 複合体が DNA にロードされる前後での ORC や CDC6 の DNA 結合変化ならびに結合した分子数の比較から、アフリカツメガエル卵抽出液中でプラスミドに pre-RC が形成される際には次のようなことが起こっていると考えられる (Fig.1 参照)。ORC の DNA への結合は迅速に起こり、プラスミド 1 分子に 10・20 分子の ORC が結合する。さらに、ほぼ同じ分子数の CDC6 が (おそらく CDT1 も) ORC 依存的に DNA に結合し、ORC-CDC6-CDT1-DNA 複合体を形成する (Fig.1、stage I)。今回の解析から、この複合体は実際に MCM ロードラーとしての活性を有することが示唆された。本研究の解析から、MCM がロードされるとともに ORC、CDC6 および CDT1 は DNA から解離することが示された。そして、最終的に 1・2 分子の ORC と約 10・20 分子の MCM が DNA に結合した形の pre-RC が形成されると考えられる (Fig.1、stage III)。一方、

geminin 存在下では (Fig.1、stage II)、ORC-CDC6-CDT1 複合体に MCM2-7 複合体が弱く結合した中間体様の構造が形成されていると推測される。<Fig.1 挿入位置>

このモデルは、これまで考えられてきたモデル、すなわち DNA に結合した ORC が MCM2-7 複合体のローディングを繰り返して多コピーの MCM 複合体分子を DNA 上にロードするというモデルとは異なるものである。今回導かれたモデルが正しいとするならば、MCM が DNA にローディングされる量は、ORC の DNA への結合頻度によって決められる可能性がある。そして、ORC の DNA への結合を調節することによって、ロードされる MCM の量が調節される可能性がある。

現在、動物細胞で同定されている複製開始領域は 30 ヶ所ほどであるが、その間でのコンセンサス配列が見つかっていないばかりではなく、その領域の長さにも大きなばらつきがある。このような多様性を有する動物細胞の複製開始点がどのように形成され機能しているのかを理解する上でも本研究の解析結果は大変重要な結果であると考えている。

研究発表

口頭発表

1. Shou Waga; Analysis of the stepwise assembly of pre-replicative complex on immobilized plasmid DNA. 2005 Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Eukaryotic DNA Replication (Cold Spring Harbor, New York, September 2005)

誌上発表

1. Shou Waga and Akiko Zembutsu; Dynamics of DNA binding of replication initiation proteins during *de novo* formation of pre-replicative complexes in *Xenopus* egg extracts. *J. Biol. Chem.* In press (2006)

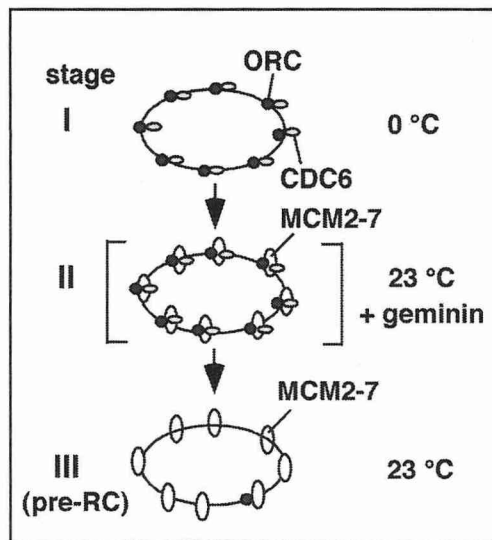


Fig.1 The model for multiple MCM loading on plasmid in *Xenopus* egg extracts.