

出芽酵母で見出した 全く新しいタイプの染色体 DNA 複製起点の解析

Analysis on the replication origin, which shows novel characteristics,
in budding yeast

(日本遺伝学会推薦)

代表研究者 高知工科大学 田中 誠司 Kochi University of Technology Seiji TANAKA

Many analyses to date have provided insight on the regulatory mechanisms of DNA replication in eukaryotes. While the protein factors that act in trans are well conserved throughout eukaryotes, the cis factors on the DNA side, the replication origins, are surprisingly diverse. Budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* is the representative organism with distinct conserved replication origins and has played a pioneering role in elucidating the mechanism of DNA replication in eukaryotes. In this organism, every replication origin has conserved 13-bp-long ARS consensus sequence (ACS), which is T-rich. Moreover, it is known that there is another less conserved sequence, which is A-rich, in the proximity of the ACS. The replication origin identified in this study has completely new features that have never been described before. That is, there is no conserved sequence or similar sequence in the replication origin, and the replication origin usually functions with only one copy, whereas this replication origin requires two or more copies. Therefore, the identification of this new-type replication origin may lead to a better understanding of the diversity of eukaryotic replication origins and a more comprehensive understanding of replication origins in general.

研究目的

本研究では、われわれが最近発見した、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の全く新しいタイプの染色体 DNA 複製起点(以下 ORI と略)の機能解析を行い、その特徴や性質を理解することを第一の目的として、解析を行った。さらに、同様の性質を備えるような DNA 配列の網羅的同定を試みることで、真核生物の複製起点全般についての包括的な理解が得られるのではないかと考え解析を進めた。

研究経過

これまでに知られている全ての生物において DNA 複製は、DNA 上の特定の領域 (複製起点: replication origin) から開始する。原核生物では一般的に、複製起点はゲノム上に 1 箇所だけ存在するが、真核生物では、その巨大なゲノム DNA を過不足なく一定時間内に複製するために、多数の複製起

点から DNA 複製を開始させることで、その問題を解決する。真核生物の良いモデルである単細胞生物である出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* からヒトのような多細胞生物に至るまで、複製起点は、平均して約数十 kb につき 1 箇所存在するという驚くべき保存性を示す。

真核生物 DNA 複製における進化的保存性は上記の複製起点の配置だけにとどまらない。真核生物細胞では、1 回の細胞周期につき、DNA 複製が 1 度だけ起きることを保証するために、複製時に DNA 2 本鎖を巻き戻すヘリカーゼの働きを細胞周期の時期特異的に 2 段階に制御している。すなわち、1) G1 期には、ヘリカーゼを不活性型として複製起点に装着し (ライセンス化反応)、2) DNA 複製が起きる S 期にヘリカーゼを活性化し、DNA 合成の場である複製フォークを形成 (ヘリカーゼ活性化)、このとき同時に、ライセンス化反応を抑制し、次の

G1期までライセンス化をブロックし続けることで、1回の細胞周期につき、DNA複製が1度だけ起きることが保証される。このヘリカーゼの活性「制御メカニズム」自体のみならず、ヘリカーゼ本体であるMcm2-7複合体を始めとして、ヘリカーゼの活性制御機構においてははたたく種々の因子群についても、真核生物間で保存されていることがわかっている。このように、生命の根幹をなすDNA複製という現象は、様々なレベルで真核生物間で高度に保存されていることが良く理解されるようになった。

一方、ヘリカーゼが装着され、その活性化によるDNA2本鎖巻き戻しが最初に起きる場である、複製起点自体は、その塩基配列を含め真核生物間で驚くほど保存されていないということもわかってきた。出芽酵母 *S. cerevisiae* は真核生物で最初に複製起点が同定された生物である。その実験では、断片化した染色体DNAをプラスミドに組み込み、そのプラスミドが染色体外で自律複製が可能かどうかを調べる(ARSアッセイ)ことで、プラスミドに自律複製能力を与えるDNA配列、すなわち **autonomously replicating sequence: ARS** が同定された。ARSは後に染色体上でも複製起点として機能していることが示された。このような実験系でARSを単離可能であったことより、出芽酵母では多数のARSが単離され、それらの詳細な解析より、ARSには保存された配列: **ARS consensus sequence (ACS)** が存在することが示された。ACSはもともとは11bpの配列であったが、現在では、その領域が拡張された、17bpの拡張ACS配列 (**extended ACS**) と呼ばれることもある。一方、ヒトなどの脊椎動物では、ARSアッセイが機能しない。そのため、複製起点の単離は困難を極めたが、近年の次世代シーケンサー等に代表されるゲノムワイド解析技術の進化により、その理解が飛躍的に高まった。すなわち、動物細胞の複製起点には保存配列は存在しないこと、複製起点は単独では存在せず、複製起点のポテンシャルを持つ領域が複数集まった複製開始ゾーンとして存在すること、近傍にG4などの特徴的な配列を取りうる領域が存在するものの、おそらくはクロマチンの状態と複製起点の間には密接な関わりがあると考えられるに至った。真核生物の良いものであるもう一つの酵母: 分裂酵母においてはARSアッセイが機能するが、出

芽酵母のようにACSは存在せず、その配列はA/T richであることが示されている。このように、真核生物の複製起点DNAの配列には、進化的な保存性は見られず、このことは複製起点の分布や複製制御因子に見られる進化的保存性とは、極端な対照性を示すということが理解されている。

出芽酵母では、ARSアッセイとACSの存在、さらに、近年になって開発された、精製タンパク質を用いた *in vitro* 再構成系より、複製開始反応の詳細な理解が得られるようになってきた。これまで知られているいかなる生物においても複製起点からは、両方向に進行する2つの複製フォークが生成する。このことは、DNA2本鎖を巻き戻す活性型ヘリカーゼが「1つ」の複製起点から「2つ」生じるということを意味する。このために、ヘリカーゼを複製起点に装着するライセンス化反応の時点で、ヘリカーゼが「2セット、かつ対称的な配置」で装着されていることもわかっていた。一方、真核生物で最もよく理解されている複製起点である出芽酵母ARSにある保存配列であるACSの塩基配列は、方向性を持つ。すなわちこのことは、複製起点ACS配列を特異的に認識して結合し、その後ヘリカーゼを装着するという働きを持つ複製起点認識複合体 (ORC) が、ARSに「1セットで1方向性」に結合するということを意味する。したがって、1分子のORCが、どの様にして2分子のヘリカーゼを対称性を持つ形で装着させることができるのかという大きな疑問があった。

一方、ARS解析の初期の頃より、ARS内には完全なACSに加え、複数のACS様配列が、様々な向きで存在することが知られていた。この意味するところは長い間全くの謎であったが、*in vitro* 再構成系を用いたヘリカーゼ装着機構の解析より、その意味するところが明らかとなった。すなわち、まず、ORC結合の特異性が高い第1の部位(ACS)を用いて、最初のヘリカーゼを装着したのちに、そのヘリカーゼを用いてORCが第2のACS様配列(この配列はA-rich、すなわち、T-richであるACSとは逆の極性となっている)に結合し、第2のヘリカーゼを、対称的な形で装着するというものである

(Fig.1)。このメカニズムの解明により、ヘリカーゼ装着に関する疑問が解かれると同時に、長年の疑問であった複製起点に見られる「ACS様」配列の謎も解かれることとなった。すなわち、複製起点に

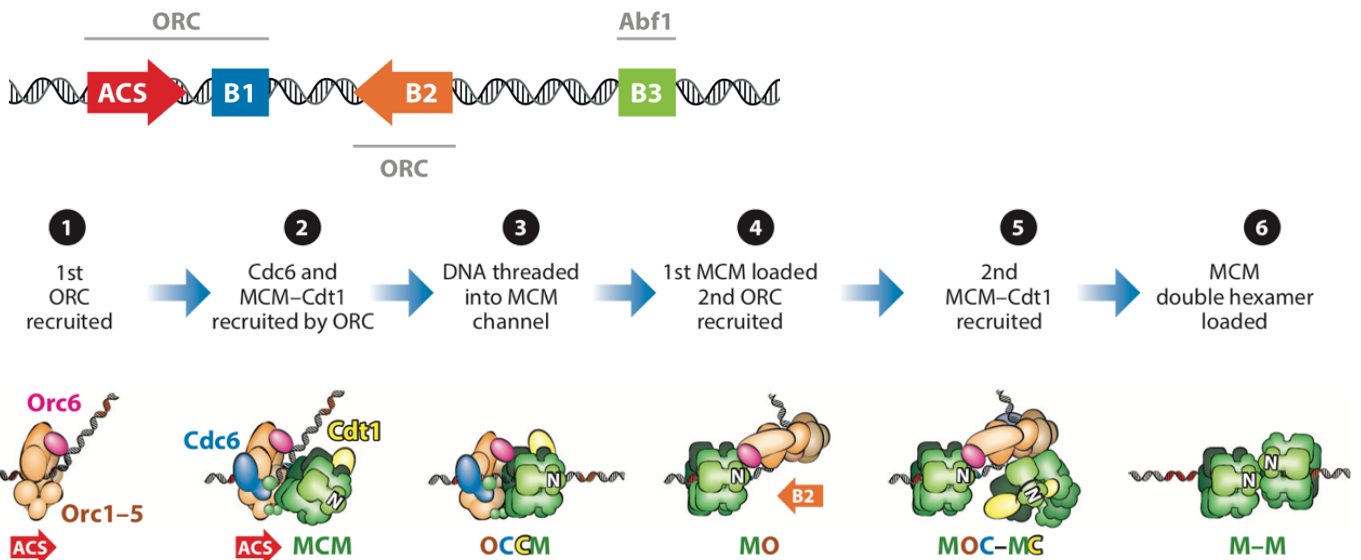


Figure 1. Structure of ARS in *S. cerevisiae* and the mechanism of helicase loading reaction (licensing). [Upper panel] Schematic presentation of the structure of ARS1, whose structure and function is best understood. ACS, B1 and B2 region is essential for the function of this ARS. Extended ACS (e-ACS) consists of ACS and B1. ACS and B1 sequences are T-rich, and B2 is A-rich. [Lower panel] The molecular mechanism of helicase loading. MCM is helicase core complex. ORC binds to the e-ACS and loads the first MCM helicase with Cdc6 and Cdt1 (①~③). ORC then binds to the B2 site, whose polarity is opposite to the e-ACS, with the help with the first MCM and load the second MCM to assemble head-to-head MCM double hexamer (④~⑥). (Original figures are in the review by Costa & Diffley (2022) *Annu Rev. Biochem.* 91:26.1-26.25)

は緩やかではあるが、ORCを二度結合させるための「対称構造」がその機能のために必須であることが明らかとなった (Fig.1)。

これまでに、ゲノムワイドなORC、MCMの結合部位の同定ならびに新生鎖のマッピング等のテクノロジーと、上述の拡張ACSの存在との組み合わせより、出芽酵母ゲノム上の全複製起点の同定が試みられてきた他、それらの情報をデータベース化し、Webサイトとして公開したOriDB

(cerevisiae.ori-db.org) が作られ、広く一般に提供されている。複製起点とされた全ての領域について、ARSアッセイによる機能測定が行われたわけではないため、なかにはその機能が疑わしいものも存在するが、これまでに機能があるとされたものについては、例外なく上記の「ACSの存在」ならびに「ACS様配列を持つことによる対称構造」を持つ。一方、本研究で対象とした複製起点は、

- ・明確なACS配列を持たない
- ・2コピー以上存在して初めてARS活性を示すという、これまでの複製起点にはない特徴を示す。

本領域は、メタロチオネインCup1をコードするタンデムリピート領域内に存在する。このリピートユニットはその長さが2kbであり、実験室酵母株においては、数個から十数個のタンデムリピートと

して存在し、以前より、リピート内にARSが存在するとされていた。興味深いことに、上述のOriDBと、出芽酵母に関する解析情報を網羅的にまとめた *Saccharomyces genome database* (SGD:

www.yeastgenome.org) におけるARS位置が異なる。OriDBが指定する領域には、ACS様の配列が見られるが、SGDが指定する領域にはACS様配列はない(単なるT-richな配列は存在する)。本研究では、それぞれがARSとする領域(ARS^{OriDB}、ARS^{SGD})を取り出し、それぞれARSアッセイに供したが、いずれの領域もARS活性を示さなかった。また、2kbのリピートユニット全長を用いてARSアッセイを行なったが、ARS活性は示さなかった。以前の解析で、顕著なARS活性の提示のためにはリピートユニットが2つ以上必要であることを突き止めていたため、ARS^{OriDB}、あるいはARS^{SGD}のみをタンデムに2コピー以上含むものを作製し、その活性を調べたが、いずれもARS活性は示さなかった。また、リピートユニットからARS^{OriDB}とARS^{SGD}を同時に除いた領域をタンデムに2コピー持つものを作製したが、これもARS活性を示さなかった。

これらの結果より、2コピーのリピートユニット全長を含むものを出発点とし、両側から削り込んで

長さを短くした多数のコンストラクトを作製し、ARS 活性を調べたところ、リピートユニット左端付近の約 90 bp 内に ARS 活性に大きく影響を与える領域が存在することがわかった。一方、本領域内には ACS 様配列もなく、本領域が複数あったとしても ARS 活性は見られない。上述したように、出芽酵母複製起点が機能するためには、その内部に向かい合って存在する 2 つの ORC 結合部位があることが必要である。あそこで、この短い領域を予め ACS を組み込んだ、ARS 活性を示さないプラスミドに挿入し、ARS として機能させることができるようになるか否かを調べることにした。

解析の結果、上記の新規に同定した約 90 bp の領域（以下の解析結果より、「新型エレメント」と呼称する）は、ACS を配置したプラスミドの

- ACS の上流に配置しても ARS 活性に影響はない (Fig. 2 の 7 と 8) が、
- ACS の下流に配置すると、ARS 活性を誘導できる (Fig. 2 の 5 と 6) 。しかも、この活性には、
- 既存 ACS との位置関係が重要であり、
- 新型エレメント自体の向きは重要ではないことがわかった (Fig. 2 の 5~8) 。一方、単純に、
- 新型エレメントを複数重ねただけでは ARS 活性を示さないことがわかった (Fig. 2、11) 。この結果は、上述の、リピートユニットから ARS^{OrnDB} と ARS^{SGD} を同時に除いた領域をタンデ

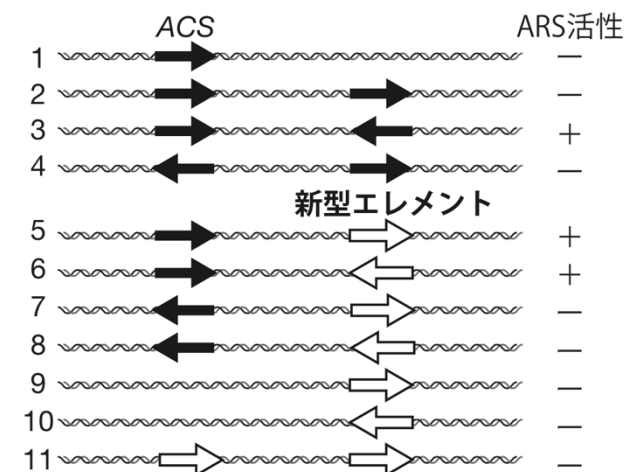


Figure 2. Newly identified element has unique features in the function of ARS.

Conserved ACS sequence placed on the plasmid is shown in filled arrows and the newly identified 'the new-type element' is shown in open arrows. The direction of arrows indicates the polarity of the sequence. +/- indicates the ARS activity of the construct shown in left.

ムに 2 コピー持つものは ARS 活性を示さないという結果と矛盾しない。

新型エレメント内には ACS に似た配列は存在しないものの、T 塩基が 4-5 個連続する領域があるため、それらを GC-rich な配列に置き換えたものについても解析を行ったが、ARS 活性促進効果への影響は見られなかった。

考察

今回、我々が出芽酵母 CUP1 リピート領域から新規に発見した ARS は、これまでに記述例がないような全く新しい特徴を備えていた。即ち、

- 出芽酵母の既知複製起点にある保存配列 ACS およびその類似配列が無い。
- 複製起点は通常 1 コピーで機能を示すが、本領域は 2 コピー以上必要。

今回行った解析より、

- 該当領域に、複製起点があるとされていたが（根拠不明）データベースに記述されている場所は、データベースにより異なり、また、それらを取り出してタンデムな 2 コピー以上の形にしても顕著な ARS 活性は示さないこと、
- データベース上で複製起点とされている場所を取り除いたリピートユニットをタンデムな 2 コピー以上の形にしても顕著な ARS 活性は示さないこと、
- 2 コピー以上のタンデムなリピートユニット（ARS 活性あり）から出発すると、完全な 1 ユニットに加え、部分的な重複があれば、顕著な ARS 活性が見られ、
- この重複部分はどこでも良いわけではなく、ARS 活性に顕著な影響を及ぼす領域（新型エレメントと呼称）があること、
- 新型エレメントは、複製ライセンス化反応において第 2 の ORC 結合部位として機能可能なものであるが、
- 通常の ARS の B2 エレメントで見られるような、A-rich 配列はなく、さらにその方向特異性も示さない。

という、解析を進めれば進めるほど驚きの結果が得られた。

これらの特徴は、本 ARS が全く新しいタイプの複製起点であることを示しており、その発見自体が

DNA 複製研究において大きなターニングポイントとなる可能性がある。

真核生物における DNA 複製の研究では、1979 年に出芽酵母で ARS が初めて真核生物の複製起点として発見され、その領域が 100~200 bp というごく狭い領域に限定でき、保存配列も存在していたこと、その後見出された出芽酵母の他の複製起点も例外なく同様の性質を備えていたことから、そこに結合する因子の同定をはじめ、出芽酵母で得た概念を拡張する形で真核生物の DNA 複製を理解するという大きな流れがあった。これまでに蓄積された概念とは異なる性質を持つ本 ARS の発見とその機能解明は、真核生物の DNA 複製起点に対する概念を次のレベルへと導くものかもしれない。また、新型エレメントとリピートユニットの複製活性に対するさらなる理解が、ヒト細胞のように複製起点に保存配列がなく、潜在的な複製起点が多数集合して染色体上で複製開始「ゾーン」を形成しているような生物の複製起点を理解する上で大きな助けとなることも期待できる。

次々に新たな予期しない性質が現れたことにより、本研究期間中にその性質を完全に明らかにすることはできなかったが、山田科学振興財団の研究援助により、研究を発展させ、思いもよらなかった発見をすることができた。最後になりましたが、本研究を援助していただいたことに対し、深く感謝いたします。

研究の発表

口頭発表

- Shiho Ogawa¹, Sae Ninomiya¹, Seiji Tanaka. Unique function of the N-terminal domain of Sld3 in *Schizosaccharomyces pombe*. ICY15 (The 15th International Congress on Yeasts) meets ICYGMB30 (the 30th International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology) Aug 23-27, 2021. Online.
- Sae Ninomiya, Shiho Ogawa, Seiji Tanaka. Role(s) of *Schizosaccharomyces* specific N-terminal domain of Sld3. Cold Spring Harbor Laboratory Meetings on EUKARYOTIC DNA REPLICATION & GENOME MAINTENANCE September 8-12, 2021. Online.
- 鳥山竜暉、池澤一希、小川志帆、田中誠司. 出芽酵母 CUP1 領域のコピー数変化のメカニズム. 第 38 回 Yeast Workshop. 2021 年 11 月 26 日, Online.
- 西谷 悠、小川志帆、田中誠司. RSC クロマチンリモデラーと DNA 複製・チェックポイント因子 Dpb11 の相互作用. 第 38 回 Yeast Workshop. 2021 年 11 月 26 日, Online.
- 渡邊加菜、小川志帆、田中誠司. 出芽酵母 S 期サイクリン Clb5 の機能を再考する. 第 38 回 Yeast Workshop. 2021 年 11 月 26 日, Online.
- 小川志帆、二宮沙絵、田中誠司. 複製因子 Sld3 の分裂酵母に特異的な N 末端ドメインの役割. 日本遺伝学会第 93 回大会. 2021 年 9 月 8~10 日, Online.
- 小野 凜之助、宮田 侑香、大迫 泰輝、小川 志帆、田中 誠司. 出芽酵母 S 期サイクリン Clb6 の高発現が引き起こす致死性の解析. 日本分子生物学会 第 44 回 年会. 2021 年 12 月 1~3 日. 横浜市/Online.
- 岡本愛加、田中 誠司. 過剰複製に対する細胞応答とゲノム不安定化. 酵母遺伝学フォーラム 第 53 回研究報告会. 2020.09.09. Online.
- 他 4 件.

誌上発表

- Seiji Tanaka, Shiho Ogawa (2022) Dimerization of firing factors for replication origin activation in eukaryotes: a crucial process for simultaneous assembly of bidirectional replication forks? *Biology* in press.
- Seiji Tanaka (2021) Interaction of replication factor Sld3 and histone acetyl transferase Esa1 alleviates gene silencing and promotes the activation of late and dormant replication origins. *Genetics*, Vol.217, iyaa001. <https://doi.org/10.1093/genetics/iyaa001>
- Seiji Tanaka (2020) Construction of Tight Conditional Mutants Using the Improved Auxin-Inducible Degron (iAID) Method in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods in Molecular Biology, Yeast Protocols*, Vol.2196, ISBN: 978-1-0716-0868-5, pp.15-26.