

真核生物の染色体 DNA 複製の制御機構と細胞周期チェックポイント 微生物遺伝研究部門 (荒木研)

連絡先：荒木弘之 (hiaraki@lab.nig.ac.jp) TEL：055-981-6754、FAX：055-981-6762
研究室 URL：<http://www.nig.ac.jp/labs/MicGen/index.html> (遺伝研 Web ページからリンクあり)
研究室の構成 (総勢 12 名、2011 年 4 月現在)
教授：荒木 弘之 助教：田中 誠司・日詰 光治 技術職員：坂本 佐知子
ポスドク：3 名、大学院生：2 名、技術補佐員：3 名、秘書：1 名

研究内容

生物が世代を超えてその遺伝情報を正確に子孫に伝達するために、真核生物の染色体 DNA 複製は各細胞周期において過不足なく一度だけ起きるよう厳密に制御されています。また、複製に何らかの異常が生じた場合には、細胞周期チェックポイントが働いて細胞周期の進行を停止させ、ゲノム DNA に異常を持ったまま細胞が M 期に進入しないように制御されています。本研究室では、真核生物のモデルである出芽酵母を用いて、染色体 DNA 複製機構と S 期チェックポイントの分子レベルでの解明を目指しています。

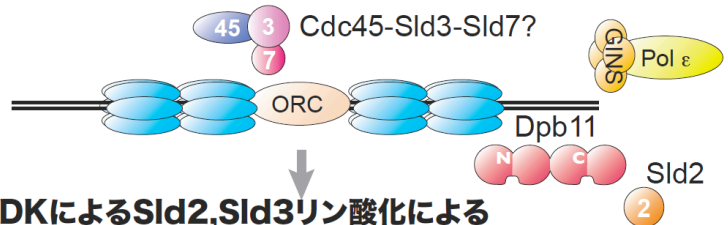
1) 複製開始機構の解析

図に模式的に示したのは、これまでに得られた知見をもとにして描いた真核細胞の DNA 複製開始機構です。G 1 期には、染色体上の複製起点上に複製前複合体 (pre-replicative complex; pre-RC) が形成され、DNA 複製開始の準備が整います。S 期になると、細胞周期エンジンである CDK (Cyclin-dependent kinase) と、DDK (Dbf4-dependent kinase) の働きにより、pre-RC が活性化され、DNA 複製が開始します。我々は、これまでの解析から、DNA 複製開始に必須な多くの因子を多数発見・解析し (図中、Dpb11, Sld2, Sld3, Sld7, GINS)、先導的な研究を行ってきました。

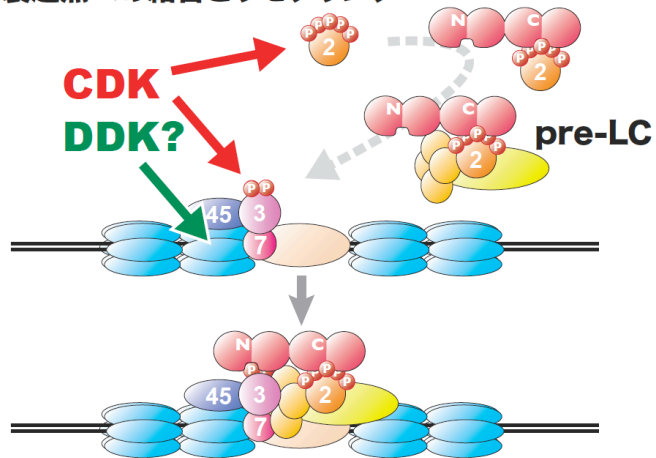
最近の解析では、DNA 複製開始反応における S 期 CDK の基質が Sld2 と Sld3 であることを突き止め、これらのタンパクが CDK によりリン酸化されると、Dpb11 と結合し、複製が開始すること (論文 3)、またこの過程においては、Sld2 のリン酸化依存的に新たな複合体 (pre-loading complex; pre-LC) が複製起点とは別に形成され、複製起点に結合・CDK によりリン酸化された Sld3 を標的として結合することで、最終的に DNA 合成の場である複製フォークが形成されることを見いだしました (論文 2)。さらに、これらの反応において鍵となる因子である Sld3 の活性を制御する新たな因子として、Sld7 を発見し、その解析も行っています (論文 1)。

現在は、染色体 DNA 複製開始反応の分子レベルでの解明を目指して、*dpb11*、*sld* の各種変異体を用いた解析、精製した複製関連タンパク質を用いた生化学的解析や試験管内での再構成系の構築を進めています。さらに、これら反応をクロマチン構造を取った DNA 上で進め、原子間力顕微鏡を用いた解析を試みています。

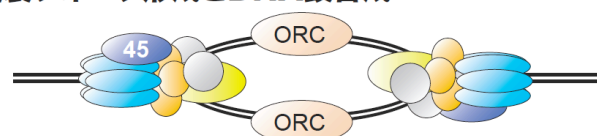
🍏 pre-RC (複製前複合体)



🍏 CDKによるSld2,Sld3リン酸化によるpre-LC形成・複製開始因子群の複製起点への結合とリモデリング



🍏 複製フォーク形成とDNA鎖合成



2) 細胞周期チェックポイントとの関わり

上記の一連の研究が大きく発展するきっかけは、染色体 DNA 複製に必要な DNA polymerase ϵ と相互作用する因子として Dpb11 を単離したことでした (Araki, H. et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92(25):11791-5)。最初に単離した *dpb11* 変異体は、DNA 複製に問題が生じたときに細胞を G2 期で停止させることができず、生存率の大幅な減少を示しました。このことは、この変異が複製が終了する前に細胞が M 期に侵入して致死となることを防いでいる S 期チェックポイントに欠損を持つこと示しています。そこで、細胞周期チェックポイントがどのような DNA 上の問題をモニターし、細胞周期を停止させるのか、この過程でどのような因子が関与し、どのように細胞周期停止を導くのか、等の問題に分子レベルで解答を与えるため、解析を進めています。

主要論文

1. Tanaka, T., Umemori, T., Endo, S., Muramatsu, S., Kanemaki, M., Kamimura, Y., Obuse, C. and Araki, H. (2011) Sld7, an Sld3-associated protein required for efficient chromosomal DNA replication in budding yeast. **EMBO J.** doi:10.1038/emboj.2011.115
2. Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y.S., Kamimura, Y. and Araki, H. (2010). CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol ϵ , and GINS in budding yeast. **Genes Dev.** **24**:602-612.
3. Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y. and Araki, H. (2007). CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. **Nature.** **445**:328-332.
4. Tak, Y.S., Tanaka, Y., Endo, S., Kamimura, Y. and Araki, H. (2006). A CDK-catalysed regulatory phosphorylation for formation of the DNA replication complex Sld2-Dpb11. **EMBO J.** **25**:1987-1996.
5. Iida, T. and Araki, H. (2004) Noncompetitive counteractions of DNA polymerase epsilon and ISW2/yCHRAC for epigenetic inheritance of telomere position effect in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol Cell Biol.** **24**:217-227.
6. Takayama, Y., Kamimura, Y., Okawa, M., Muramatsu, S., Sugino, A and Araki, H. (2003) GINS, a novel multi-protein complex required for chromosomal DNA replication in budding yeast. **Genes Dev.** **17**:1153-1165.
7. Masumoto, H., Muramatsu, S., Kamimura, Y. and Araki, H. (2002) S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast. **Nature.** **415**:651-655.
8. Kamimura, Y., Tak, Y.S., Sugino, A. and Araki, H. (2001) Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. **EMBO J.** **20**:2097-2107.

最近の総説など

1. Tanaka, S. and Araki, H (2010) Regulation of the initiation step of DNA replication by cyclin-dependent kinases. **Chromosoma** **119**, 565-574.
2. Araki, H (2010) Cyclin-dependent kinase-dependent initiation of chromosomal DNA replication. **Curr. Opin. Cell Biol.** **22**, 766-771.
3. Araki, H. (2010). Regulatory mechanism of the initiation step of DNA replication by CDK in budding yeast. **Biochim. Biophys. Acta** **1804**: 520-523.
4. Tanaka, S., Tak, Y.S. and Araki, H. (2007). The role of CDK in the initiation step of DNA replication in eukaryotes. **Cell Div.** **2**:16 (1-6).
5. 田中誠司、荒木弘之 (2008) 真核細胞染色体 DNA 複製開始反応と CDK による制御、細胞工学 **27**、985-991.
6. 田中誠司、荒木弘之 (2007). CDK による染色体 DNA 複製開始制御機構. 実験医学増刊「染色体サイクルの分子メカニズム」正井久雄、渡邊嘉典 編、**25(5)**:614-20.
7. Walter, J.C. and Araki, H. (2006) Activation of Pre-replication Complexes. pp 89-104. in DNA Replication and Human Disease. (Ed. DePamphilis M.L.) Cold Spring Harbor Laboratory Press.