

部位特異的変異導入法を用いた ORC の機能解析

分子機能薬学専攻 薬学微生物学分野 竹原 正也

染色体DNAの複製反応は原核生物から真核生物まで多くの生物で保存された遺伝情報の維持に必須の反応であり、複製開始点 (origin DNA) を起点に開始されるという空間的な制御や、細胞周期の中でDNA合成期 (S期) に1度だけ行われるという細胞周期依存的な制御を受けている。このような機構は遺伝情報の維持に重要な機構であり、出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*でよく解析されている。なお、本稿では出芽酵母のDNA複製反応について述べる。

染色体DNAの複製反応は複製開始反応に必須の複製開始前複合体 (pre-replicative complex: pre-RC) がorigin DNA上に特異的に形成されることで空間的な制御を受けている。pre-RCはOrigin Recognition Complex (ORC) を足場に、Cdc6pやMinichromosome Maintenance Proteins (Mcm2-7p: MCM) がDNA複製準備期 (G1期) に順次結合することで形成され、その後DNA複製反応が開始される。pre-RC構成因子の中でORCは細胞周期を通じてorigin DNAに特異的に結合しており、この特異的な結合はpre-RCがorigin DNA上に特異的に形成される空間的な制御に寄与しており、DNA複製開始反応の空間的な制御を保障している。

ORCは6つのサブユニット (Orc1-6p) からなるタンパク質複合体であり、保存されたnucleotide binding motifを持っているOrc1p、4p、5pはATPases associated with a variety of cellular activities family (AAA⁺ family) に属している。ORCのサブユニットの中でOrc1p、Orc5pはATP結合活性を持ち、Orc1pはATPase活性を持つことがそれぞれ分かっている。そして、Orc1pのATP結合活性はORCのorigin DNA特異的な結合に寄与していることから、この活性がDNA複製開始反応の空間的な制御に寄与していると考えられている。これに対して、ORCの持つATPase活性がDNA複製反応の中でどのような役割を果たしているか分かっていない。

また、染色体DNAの複製反応はCyclin dependent protein kinase (CDK) により細胞周期依存的な制御を受けている。具体的には、高いCDK活性はpre-RC構成因子をリン酸化することで同じ細胞周期内にpre-RCが再形成されることを抑制し、これがDNAの再複製反応を抑制している。これまでに、pre-RC構成因子の中でCDKはOrc2p、Orc6p、Cdc6p、MCMがCDKによりリン酸化を受けることが示されている。そして、このリン酸化によりCdc6pはユビキチン・プロテアソーム系による分解、MCMは核外移行がそれぞれ促進されpre-RCの再形成が抑制される。一方、Orc2p及びOrc6pのリン酸化もpre-RC再形成の抑制に寄与することが示唆されている。それは、リン酸化による分解を受けにくい変異Cdc6p及び核移行シグナルを付与したMCMを発現する細胞に、CDKによってリン酸化されない変異Orc2pと変異Orc6pを同時に発現させ

ると G2/M 期に染色体 DNA の再複製反応が誘発されることから示唆された。しかしながら、ORC のリン酸化がどのような機構で DNA の再複製反応を抑制しているかは分かっていない。

このように ORC は染色体 DNA 複製反応の空間的な制御や細胞周期依存的な制御に関与していることが分かっているが、ORC の ATPase 活性がどのような機能を持つか、またリン酸化された ORC がどのような機構で DNA の再複製反応を抑制しているかは明らかにされていない。そこで、私はこれらの ORC の機能や性質を解明しようと考えた。

まず始めに私は部位特異的変異導入法を用いて Orc1p の Sensor モチーフに変異を導入した変異 *orc1* を作製し、その遺伝学的な機能解析を行った。その結果、Orc1R694Ep は ATPase 活性が特異的に欠損した変異型 Orc1p であることが予想された。そこで、私は Orc1R694Ep をサブユニットとして含む変異型 ORC (ORC-1R) を精製し、これを生化学的に解析した。その結果、ORC-1R は ATPase 活性が特異的に低下していること、すなわち Orc1R694Ep は ATPase 活性が特異的に低下した変異型 Orc1p であることが分かった。そこで、私は Orc1R694Ep の細胞内での機能を解析した。その結果、Orc1R694Ep を発現している細胞では pre-RC の形成が抑制されること、すなわち Orc1p の ATPase 活性が pre-RC の形成を促進し染色体 DNA 複製反応を促進していることが分かった。これらの結果から Orc1p の ATPase 活性は ATP 結合活性と同様に染色体 DNA 複製反応の空間的な制御に寄与していることが分かった。

次に私は部位特異的変異導入法を用いてリン酸化型変異 Orc2p 及び変異 Orc6p を作製し、これらの遺伝学的な機能解析を行った。その結果、Orc2p の S188 をアスパラギン酸に置換したリン酸化型変異 Orc2p (Orc2-5Dp) を発現する細胞では pre-RC の形成が低下し、DNA 複製反応が遅延することが分かった。また、Orc2p の S188 が CDK 依存的、細胞周期依存的 (S 期や G2/M 期) に細胞内でリン酸化されていることが分かった。これらの結果から細胞周期の中で活性が変化する CDK は Orc2p の S188 をリン酸化することで pre-RC の形成を制御し、これが染色体 DNA 複製反応の細胞周期依存的な制御に寄与していることが分かった。さらに、私は Orc2-5Dp をサブユニットとして持つ変異型 ORC (ORC2-5D) を生化学的に解析し、ORC2-5D では Orc5p の ATP 結合活性が特異的に低下していることを明らかにした。これらの結果は CDK による Orc2pS188 のリン酸化が Orc5p の ATP 結合活性の低下を介して pre-RC の形成を制御していることを示唆している。

このように、私は部位特異的変異導入法を用いることでこれまで分かっていなかった Orc1p が持つ ATPase 活性の機能、並びに CDK による Orc2p のリン酸化が pre-RC の形成を抑制する機構を明らかにし、染色体 DNA 複製反応の制御機構を解明した。