

高等真核生物における DNA 複製必須因子の全リスト、ついに完成へ



生命科学部 生命科学実習センター 助教 橋本 吉民

はじめに

筆者が東薬に赴任したのは、東北地方での震災直後の 2011 年 5 月のことでした。以来早 12 年以上が経過し、私の人生の中では東薬が最も長く所属した組織となりました。筆者は、これまで主に真核生物の DNA 複製制御に関する研究を行ってきました。本稿では、DNA 複製研究の歴史を振り返りつつ、最近筆者が得た研究成果の位置づけと意義について解説します。

DNA 複製研究の黎明期

1951 年にワトソンとクリックが発表した DNA 二重らせんモデルでは、相補的な塩基配列をもつ二本の DNA 鎖がより合わさってらせん構造を形成します。この構造から直ちに、それぞれの DNA 鎖を鋳型として相補鎖が合成されるという半保存的複製の仕組みが示唆され、その正しさは 1958 年メセルソンとスタールによって証明されました。しかし、DNA 複製はヌクレオチド基質があれば自発的に起きる訳ではなく、多くの触媒タンパク質を必要とする複雑な反応です。初期の研究では、主に大腸菌がモデルとして使われました。DNA ポリメラーゼやヘリカーゼなど複製に必要なタンパク質因子が続々と発見され、詳細な分子機構が明らかとなりました。日本人研究者の貢献としては、岡崎令治博士によるラギング鎖の不連続合成モデルが有名です。1984 年には、コーンバーグが 18 種類の精製タンパク質を用いて大腸菌 DNA 複製を試験管内で再構成することに成功しました。これは複製必須因子の同定が一通り

終わったことを意味しますが、新たな研究段階への出発点でもあり、現在でも大腸菌 DNA 複製は、特に構造生物学的な方面からよく研究されています。

原核生物から真核生物へ

一方で、多くの複製研究者の関心は、原核生物から真核生物へと移りました。真核生物モデルとして、出芽酵母とアフリカツメガエル卵を用いた研究が大きく貢献しました。化学物質としての DNA の性質や構造は普遍的であり、真核生物においても半保存的複製の原則は当てはまります。しかし、原核生物と真核生物の間では遺伝子配列の進化的な隔たりが大きく、大腸菌タンパク質のアミノ酸配列からは予想できない多くの因子が真核生物の DNA 複製に必要であることが分かりました。それでも、DNA ポリメラーゼなどの DNA 鎖伸長過程に関与する因子群は、1990 年代までにはほぼ同定されました。そして、最後に残ったのが複製開始を制御する因子群でした。

大腸菌と真核生物では、DNA 複製に関して大きく異なる点があります。大腸菌では環状ゲノム DNA の一ヶ所から複製開始が起こり、対数増殖期では複製を行いながら細胞分裂します。対して真核生物では、直鎖状ゲノム DNA に多数の複製開始領域が存在し、複製開始のタイミングは複雑な細胞周期制御を受けています。多くの真核生物では、現在でも複製開始に必要な DNA 共通配列が見つかっていませんが、例外的に出芽酵母では複製開始



領域として働く 100bp 程度の共通配列 (ARS) が存在します。ARS 結合因子として ORC、さらに ARS を有するミニ染色体の維持に必要な因子として MCM 複合体が発見されました。ORC は MCM を染色体へ結合させるために必要であることが分かりました。

複製ライセンス因子仮説とその実体解明

細胞周期とは、G1-S-G2-M 期の四つの時期からなる真核細胞の増殖制御過程のことです。S 期では染色体 DNA が正確に一度だけ複製され、M 期で染色体が娘細胞へと分配されます。1970 年にラオとジョンソンは、G1 期と S 期の細胞を融合すると G1 期核は即座に DNA 複製を開始するが、G2 期と S 期の細胞を融合した場合には G2 期核は複製開始しないことを報告しました。この結果は、G1 期核に働きかけて S 期進行を促進する因子の存在を示唆していて、後にそれが S 期 CDK (サイクリン依存性キナーゼ) であることが分かりました。一方、1988 年にブロウとラスキーは、細胞融合の結果を説明するため以下のような複製ライセンス因子仮説を提唱しました。1) G1 期核は複製ライセンス因子を持っていて (ライセンス化されると呼ぶ)、複製開始できる。ただし、複製ライセンス因子は一旦複製開始すると不活性化される。2) G2 期核は複製ライセンス因子を持っておらず、複製開始できない。しかし、M 期を通過すると再びライセンス化される。

ライセンス因子は空想上の存在でしたが、1995 年にブロウとラスキー、滝澤温彦博士がそれぞれ独立してツメガエル卵を用いた実験系により MCM 複合体がライセンス因子として働くことを明らかにしました。ここに至って真核生物の DNA 複製開始機構は、酵母から脊椎動物まで普遍的に保存されていると認識されるようになり、ゲノム計画推進によるデータベース充実化とも相まって、様々な真核生物種で次々と複製開始制御因子が同定されました。

CMG 複合体：真核生物における複製ヘリカーゼ

MCM 複合体の役割は、複製フォークにおいてヘリカーゼとして二本鎖 DNA を巻き戻すことであることが分かりました。しかし、MCM 単独では活性がなく、S 期に Cdc45 および GINS と結合して CMG (Cdc45-MCM-GINS) 複合体を形成して始めて活性型ヘリカーゼとなります。そのためには S 期 CDK 活性と幾つかの媒介因子が必要ですが、出芽酵母では 2000 年代前半までに全ての複製必須因子が同定されており、2015 年にディフリーが 16 種の精製タンパク質 (遺伝子数 42 個) を用いて DNA 複製開始反応全体を試験管内で再現することに成功しています。大腸菌での成功から約 30 年が経っていました。複製ライセンス因子仮説に当てはめると、G1 期核は MCM が染色体に結合してライセンス化状態となり、S 期で MCM が活性化されて CMG 複合体へと変化し、複製フォーク進行を推し進めた後で染色体から解離するため、G2 期核は非ライセンス化状態となります。

最後の複製開始因子 DONSON、高等真核生物での複製必須因子の全リスト完成へ

複製分野では長年「酵母に存在する因子は脊椎動物にも存在する」というスタンスで研究が行われてきており、実際に真核生物間では配列相同性からオルソログ (共通祖先に由来する相同遺伝子) であることが明白な因子がほとんどです。ところが、CMG 複合体形成に必要な幾つかの媒介因子については、アミノ酸配列がほとんど保存されておらず、高等真核生物での同定には長い年月がかかりました。筆者が今回の研究を始めた 2019 年頃には、酵母 Sld2 に対応する因子のみ存在が不明という状態でした。小頭症の一種であるマイヤー・ゴーリン症候群は、ORC や MCM などの複製開始因子の部分的欠損によって起こります。2017 年に DONSON が原因遺伝子の一つとして同定されましたが、その時点では複製開始に必要などうかは不明でした。DONSON 遺伝子は高等真核生物にのみ存在します。筆者はツメガエル卵の実験系を使い、

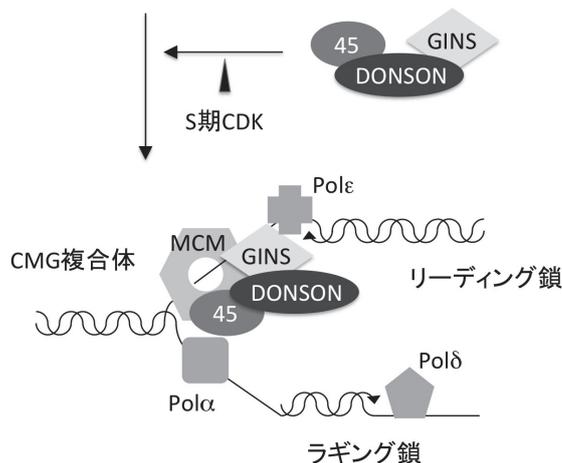
複製開始領域にはORCが結合している



G1期にMCMが結合して複製ライセンス化される



S期CDK活性依存的にDONSONがCdc45とGIN5を複製開始領域へ運び込み、CMG複合体が形成される



真核生物では、Polα(プライマー鎖)、Polδ(ラギング鎖)、Polε(リーディング鎖)の3種が主なDNA合成酵素である

図1 高等真核生物におけるDNA複製開始機構

DONSONがCdc45およびGIN5と結合して複製開始領域へとリクルートする役割があること、さらにCMG複合体形成に必須であることを明らかにしました(図1)。DONSONと酵母Sld2のアミノ酸配列は全く異なりますが、その役割はよく似ています。同じ頃、複数の海外グループも同様の発見をしていましたが、幸いにも筆者の論文が一番早くに公開されました(Hashimoto et al, *EMBO J*, e114131, 2023)。正式には再構成系による証明が必要となりますが、複製開始因子としてのDONSONの同定により、高等真核生物における複製必須因子は全て発見されたものと考えられます。

おわりに

筆者は、今回の成果を2023年9月の米国コールド・スプリング・ハーバー研究所主催のDNA複製ミーティングで発表しました。海外勢と合わせて同一セッション内で4演題がDONSONに関する報告となり、久々の新規因子の発見・報告に会場はお祭り状態となりました。近年の複製分野では、精製タンパク質を用いて再構成したCMGを含む複製装置全体の構造解析、次世代シーケンサーによるゲノムスケールでの複製ダイナミクス解析、複製ストレス(DNA合成阻害剤など)存在下でのゲノム安定性維持機構の解析などが研究の主流となっています。本研究は、(旧)細胞制御医科学研究室で実施しました。自由に研究させて頂いた田中弘文名誉教授、研究に参加してくれた学生の皆様に感謝します。