

ヒト細胞における染色体複製開始因子、
ORC1 の機能解析

巽 康年

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 動物分子遺伝学講座
(加藤 順也 教授)

平成16年1月30日提出

所属 (主指導教 官)	動物分子遺伝学講座 (加藤順也 教授)		
氏名	異 康年	提出	平成 16 年 1 月 8 日
題目	ヒト細胞における染色体複製開始因子、ORC1 の機能解析		
出芽酵母で見いだされた ORC (Origin Recognition Complex)は複製開始点に結合し、これを足場として CDC6、CDT1、MCM が集合することで複製開始に必要な複製前複合体 (Pre-RC) が形成される。ORC は ORC1-6 のサブユニットからなる複合体で、出芽酵母では細胞周期を通じて安定に複製開始点に結合している。これに対し、哺乳動物細胞では ORC1 が E2F による転写制御およびユビキチン化による制御を受け、この変動が ORC の機能制御に重要な役割を果たすことが提唱され始めているが未だ十分な解析がなされていない。そこで本論文では、ヒト ORC1 の細胞内動態制御の解析を行い、ヒト細胞において ORC の機能がどのように制御され、それがどのような機構で染色体複製開始を制御しているのかについて考察することを目的とした。 まず、ヒト ORC1 の細胞内動態の解析に必要なウサギポリクローナル抗体を得た。この抗体はヒト細胞内の ORC1 をウエスタンブロッティングおよび細胞染色によって特異的に検出でき、さらに ORC2-5 と複合体を形成した ORC1 を効率よく沈降する活性を有した。ORC1 の細胞内局在を知るために、293 細胞について染色を行ったところ、抗体に反応するシグナルは核内に観察された。さらにこのシグナルは DNase I 処理を行った後に染色した場合においても同様に観察され、ORC1 は核内、特に核構造中に局在していることが示唆された。この結果は、ウエスタンブロッティングでも確認された。そこで ORC1 の核局在に必要な領域の同定を試みた。系統的な欠失変異体発現系を作成しヒト細胞で一過的に発現させて ORC1 の分子構造とその細胞内挙動の関係について解析を行ったところ、ORC1 の核局在には N 末端から 324 アミノ酸が必要であるが、NTP 結合モチーフを含む C 末領域は必要ないことが示された。また、ORC1 が他のサブユニットと複合体を形成するためには核局在と同様に N 末端側の 324 アミノ酸が必要であった。一方、ORC 複合体形成には NTP 結合モチーフを含む C 末端側の 351 アミノ酸も必要なが示された。よって ORC 複合体形成には、ORC1 の正常な核局在と同時に NTP 結合モチーフを介した何らかの活性が必要であることが示唆された。 ヒト ORC1 の細胞周期での量的変動を調べたところ、G1 後期から G1/S 期に蓄積し S 期以降は減少することがわかった。この量的変動が、ORC1 の E2F を介した発現レベルでの制御によるものか、その分解によるものかを検討するために、FLAG タグを付加した ORC1 (FLAG-ORC1) をサイトメガロウイルスのプロモーターによって発現する 293 細胞株を作成し、その挙動を調べた。その結果 FLAG-ORC1 は恒常的に転写されているにも関わら			

ず、タンパクレベルでは内在性の ORC1 と同じく細胞周期依存的な変動を示した。このことにより、ヒト細胞における ORC1 タンパク質量の細胞周期制御は主にタンパク分解系によって制御されることが考えられた。また欠失変異 ORC1 発現細胞株を用いた解析から、ORC1 の分解には少なくとも N 末側 324 アミノ酸および C 末側 351 アミノ酸の領域は関与しないことが明らかとなった。このヒト細胞の ORC1 に見られる細胞周期依存的な量的変動は、ORC サブユニットの分子集合、核内局在、さらには複製開始制御に中心的な役割を持つと考えられ、ORC1 サイクルと呼ぶこととした。実際、共同研究者である太田らの解析から、ヒト ORC 複合体が ORC1 を足場として G1/S 期に一過的に形成されることが示された。

この ORC1 の量的な変動と細胞内挙動の関係を明らかにするため、非同調の細胞を抗 ORC1 抗体で染色した。その結果、核内の抗体特異的なシグナルは全体の約 30%の細胞で観察され、細胞毎のシグナル強度にも差が見られた。また、各細胞での ORC1 の染色パターンと BrdU の取り込みを比較すると、抗 ORC1 抗体による核染色は BrdU が取り込まれる前の G1 期の細胞で見られ、BrdU が取り込まれた S 期の細胞ではほとんど検出されなくなることが示され、ウェスタンブロッティングで観察された ORC1 サイクルと一致した。さらに詳しく解析すると、ORC1 のシグナルは G1 後期の核では 500 個以上のドットとして観察された。一方 S 期初期の細胞では ORC1 のドット数は 100 個程度に減少し、これらは BrdU とは共局在しなかった。さらに S 期後期の細胞では ORC1 のドット自体ほとんど検出されなくなった。したがって G1 期にドット状に局在した ORC1 は DNA 複製開始時には分解されている可能性が考えられた。

以上の結果は、厳密な ORC1 量の制御が DNA 複製開始制御に重要であることを示唆している。そこで、FLAG-ORC1 を内在する ORC1 の等倍から 12 倍の間で過剰発現する 293 細胞株を用いて、ORC1 サイクルと細胞周期の進行について検討した。まず ORC1 の過剰発現は、その程度に関係なく細胞の増殖速度に影響しなかった。しかし FACS 解析から得られる細胞周期分布では ORC1 の発現量に応じて G1 期が長くなり S 期が短くなることが明らかとなった。また ORC1 の過剰発現細胞をチミジン存在下で培養して S 期停止を誘導したところ、その発現量に応じて S 期停止が阻害された。これは、ORC1 を過剰発現する細胞では活性化される複製開始点の数が増加するため、複製フォークの停止に依存した S 期停止が阻害されたためであると考えられる。実際、正常な 293 細胞では 20%程度の ORC2 が DNase I 不溶性であるのに対して、ORC1 を内在性の 12 倍発現する細胞株では大部分の ORC2 が DNase I 不溶画分に存在し、また DNase I 不溶画分に分画される MCM3 の量も約 3 倍に増加した。これらは、高レベルに存在する ORC1 によりそれと複合体を形成する ORC2 や MCM3 が DNase I 耐性の核構造中に移行したことを示している。

本研究により明らかとなったヒト ORC1 サイクルは、ヒト細胞における再複製の防止機構の一つであると考えられる。さらに、ヒト ORC1 サイクルは Pre-RC 形成を厳密に制御することによって DNA 複製開始のみならず正常な S 期チェックポイント応答を誘導する上でも重要であることが示唆された。

博士論文番号：

ヒト細胞における染色体複製開始因子、
ORC1 の機能解析

巽 康年

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 動物分子遺伝学講座
(加藤 順也 教授)

平成16年1月30日提出

目次

第 1 章	序論	4-5
第 2 章	ヒト ORC1 特異的ポリクローナル抗体の作成	
2-1	序	6
2-2	材料と方法	6-9
2-3	結果	10-13
2-4	考察	14
第 3 章	ヒト細胞内における ORC1 蛋白質の存在様式とその機能領域の解析	
3-1	序	15
3-2	材料と方法	15-17
3-3	結果	17-24
3-4	考察	25-26
第 4 章	ヒト ORC1 蛋白質の細胞周期依存的な量的制御の解析	
4-1	序	27
4-2	材料と方法	27-28
4-3	結果	28-40
4-4	考察	41-44
第 5 章	ヒト ORC1 過剰発現細胞株の解析	
5-1	序	45
5-2	材料と方法	45
5-3	結果	45-52
5-4	考察	53-54
第 6 章	まとめ	55-57
	謝辞	58
	参考文献	59-67

資料

Yasutoshi Tatsumi, Satoshi Ohta, Hiroshi Kimura, Toshiki Tsurimoto, Chikashi Obuse (2003) The ORC1 cycle in human cells: I. Cell cycle regulated oscillation of human ORC1. *J Biol Chem.* **278**, 41528-41534.

Satoshi Ohta, Yasutoshi Tatsumi, Masatoshi Fujita, Toshiki Tsurimoto, Chikashi Obuse (2003) The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle *J Biol Chem.* **278**, 41535-41540.

Yasutoshi Tatsumi, Toshiki Tsurimoto, Katsuhiko Shirahige, Hiroshi Yoshikawa, Chikashi Obuse (2000) Association of human origin recognition complex 1 with chromatin DNA and nuclease-resistant nuclear structures. *J Biol Chem.* **275**, 5904-5910.

第 1 章

序論

遺伝情報を正確に伝えるために真核生物の DNA 複製は、一回の細胞周期において完全にかつ一度だけ行われるよう厳密に制御されており、その破綻は異常増殖や細胞死につながる。出芽酵母をモデルとした真核生物の複製開始研究から、各複製開始点(replication origin)は細胞周期で一度だけ複製が始まること、複製開始のタイミングは複製開始点毎に決まっていることが明らかとなった (Yamashita et al, 1997、Poloumienko et al., 2001)。またその複製開始点には、ORC (Origin Recognition Complex) 蛋白質複合体が結合することが示され、DNA 複製開始制御の中心的な役割を担っていると考えられている (Bell and Stillman, 1992、Diffley and Cocker, 1992、Li and Herskowitz, 1993)。G1 期にこの ORC を足場として CDC6、CDT1、MCM が複製開始点に集合することにより、DNA 複製開始に必要な複製前複合体 (Pre-RC) が形成されることが、出芽酵母やアフリカツメガエルの卵抽出液を用いた研究から示されている (Gavin et al., 1995、Bell and Dutta, 2002、DePamphilis, 2003)。この内 MCM は MCM2-7 からなる六量体で複製開始の DNA ヘリカーゼと考えられている (Ishimi, 1997、Lee and Hurwiz, 2000、Labib et al., 2000)。そして ORC/CDC6/CDT1 依存的に複製前のクロマチンに結合し (Donovans and Diffley, 1996、Donovans et al, 1997、Romanowski et al., 1996、Fujita et al., 1998)、複製が終了するとクロマチンから解離する特性を持つ (Aparicio et al., 1997、Tanaka et al., 1997、Tadokoro et al., 2002)。この MCM が中心となる Pre-RC の形成と崩壊は、複製開始点が一細胞周期に一度だけ使用されることを保証するライセンス機構であり、その制御は CDK キナーゼが担うと考えられている (Tanaka et al., 1997、Nguyen et al., 2001、DePamphilis, 2003)。実際に CDK は複数の機構によってライセンス制御を行っている。その一つとして CDC6 のリン酸化があり、リン酸化された CDC6 は酵母ではタンパク分解に (Drury et al., 1997、Elsasser et al., 1999)、動物細胞では核外輸送に (Petersen et al., 1999) 導かれて機能抑制される。また、MCM も CDK によるリン酸化制御を受けていると考えられている (Hendrickson et al., 1996、Mahbubani et al., 1997)。これらに加えて、ORC 自身も CDK による制御を受けることが提唱されている。例えば出芽酵母では ORC1、ORC2、ORC6 は CDK によるリン酸化サイトを持ち、これらの S 期から M 期にかけての高リン酸化状態は G1 期初期の Pre-RC が 形成される時期と一致して低リン酸化状態に転換されることから、MCM のクロマチンへの結合は ORC サブユニットのリン酸化によっても制御されると考えられている (Nguyen et al., 2001)。同様の ORC サブユニットのリン酸化は、分裂酵母およびアフリカツメガエルの卵抽出系でも報告されており、リン酸化による ORC の機能制御は真核生物で普遍的であると考えら

れる (Romanowski et al., 2000、Tugai et al., 1998)。ショウジョウバエにおいて ORC の最大のサブユニットである ORC1 は、リン酸化に加えて M 期から G1 期への移行時に anaphase-promoting complex (APC) によってユビキチン化されて分解されることが報告された (Araki et al., 2003)。ヒト細胞においても、ORC1 は CDK によるリン酸化に依存して SCF^{skp2} ユビキチンリガーゼ複合体によってポリユビキチン化された後、26S プロテアソームによって分解される可能性が考えられている (Mendez et al., 2002、Fujita et al., 2002)。一方、チャイニーズハムスター ORC1 の場合も細胞周期依存的にユビキチン化されるが、モノユビキチン化されるだけで細胞周期を通じてタンパク量も変わらないことから、タンパク分解系を介さないユビキチン化による制御が示唆されている (Natale et al., 2000、Li and DePamphilis, 2002)。したがって動物細胞のユビキチン化を介した ORC1 の制御には多様性がある。さらに動物細胞の ORC1 遺伝子のプロモーター領域には E2F 結合サイトがあり E2F による転写制御が ORC 活性の制御に関与していることも示唆されている。実際、ショウジョウバエの embryo や imaginal disc において E2F 依存的な転写により ORC1 が G1 後期に増加すること (Asano and Wharton, 1999)、哺乳動物細胞の ORC1 遺伝子が E2F 依存的に転写促進されることが報告されている (Ohtani et al., 1996)。このように哺乳動物細胞では ORC1 の細胞周期依存的な翻訳後修飾に加えて、その分解および転写による厳密な量的制御が ORC1 の機能制御に重要な役割を果たしていることが予想される。しかしその詳細に関してはなお多くが不明である。

本研究ではヒト細胞における ORC の機能制御機構を明らかにする目的で、その制御への関与が示唆される ORC1 に対する特異的抗体を作成し、それを用いて ORC1 の細胞内局在の空間的制御および細胞周期依存的なタンパク量の制御について調べた。さらに、ORC1 の過剰発現細胞株を作成し、その過剰発現が細胞周期に与える影響を解析した。また ORC1 の機能領域を明らかにするため ORC1 欠失変異体をヒト培養細胞で発現させて解析を行った。

第 2 章

ヒト ORC1 特異的ポリクローナル抗体の作成

2-1 序

ヒト ORC1 は、出芽酵母 ORC 最大のサブユニットのヒトホモログとして塩基配列の相同性から同定された (Gavin et al., 1995)。続いて、ヒト ORC の他のサブユニットについても同様に同定された (Quintana et al., 1997、Ishiai et al., 1998、Quintana et al., 1998、Dhar and Dutta, 2000)。しかし、ヒトを含めた哺乳動物細胞の ORC の機能およびサブユニット間の相互作用は多くは不明であった。そこで我々は、ORC の機能を明らかにするため、ヒト ORC1 に対するマウスモノクローナル抗体 (3A2A) を作成した (Tatsumi et al., 2000)。3A2A は、大腸菌で発現した組換えヒト ORC1 タンパク質を認識するとともに、ヒト細胞抽出液からは ORC1 の予想される分子量 100 kDa 付近のタンパク質を特異的に認識した。3A2A を用いた解析から、3A2A に反応するタンパク質はクロマチン DNA および DNaseI 耐性の核構造の両方と相互作用すること、M 期には核膜の消滅とともに核構造との相互作用がなくなること、また細胞内に 1×10^6 個存在し、細胞周期でタンパク量は変動しないことを明らかにした。しかし 3A2A による免疫沈降産物の質量分析装置を用いた解析の結果、免疫沈降物の大部分は、ORC1 ではなく Polypyrimidine tract binding protein-associated splicing factor (PSF) であることが明らかとなった。そこで本研究では ORC1 の細胞内挙動を再検討するため、まずヒト ORC1 のみを特異的に認識する抗体を新たに作成するところから始めた。

2-2 材料と方法

2-2-1 緩衝液

0.1 % TX-mCSK 緩衝液：10 mM PIPES pH 7.0、300 mM sucrose、1 mM MgCl_2 、1 mM EGTA、0.1 mM PMSF、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、0.1 % Triton X-100 (Triton)

SDS 泳動緩衝液：25 mM Tris、200 mM glycine、0.1 % SDS

ウエスタンブロッティング用転写緩衝液：25 mM Tris、192 mM glycine、10 % Methanol

TBS-T 緩衝液：30 mM Tris-HCl pH 7.4、200 mM NaCl、0.1 % Tween 20

SDS サンプル緩衝液：50 mM Tris-HCl pH 6.8、100 mM DTT、2 % SDS、0.05 % bromophenol blue、10 % glycerol (Laemmli, 1970)

500 mM リン酸緩衝液：465 mM Na₂HPO₄、35 mM NaH₂PO₄ pH 8.0

リン酸緩衝塩溶液：137 mM NaCl、2.68 mM KCl、8.10 mM Na₂HPO₄、1.47 mM KH₂PO₄、

2-2-2 SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

タンパク質試料を等量の 2 X SDS サンプルバッファー緩衝液に懸濁し、95℃で 5 分間熱変性を加えた後、12.5 %または 10 %のポリアクリルアミドゲルを用いて SDS 泳動緩衝液中で電気泳動した。

2-2-3 ウェスタンブロッティング

タンパク質試料を SDS-PAGE により分離した後、PVDF 膜 (Hybond-P、Amersham Biosciences) にウェット式ブロッティング装置を用いてウェスタンブロッティング用転写緩衝液中で 4 時間、20 V の条件で転写を行った。PVDF 膜は 10 %ドライミルク (雪印) を含む TBS-T 中で 1 時間ブロッキングした後、10 % FBS を含む TBS-T 中で一次抗体反応を 1 時間行った。次に TBS-T で 10 分間、3 回洗浄後、10 % FBS を含む TBS-T 中でペルオキシダーゼ標識された二次抗体を 1 時間反応させた。最後に PVDF 膜を TBS-T で 10 分間、3 回洗浄後、抗体と反応したタンパク質を ECL システム (Amersham Biosciences) を用いて検出した。バンドの定量は、Image Gauge V3.1 (FUJIFILM) によって行った。

2-2-4 ORC サブユニット ORC1 の大腸菌での発現と精製

6 X His タグを ORC1 (1-698 アミノ酸) の N 末側に付加した 6 X His-ORC1 (1-698 アミノ酸) は、pET 28 (+) ORC1N (1-698 アミノ酸) のプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) に導入し、IPTG (終濃度 0.2 mg/ml) で発現誘導して得た。発現誘導は OD 600 が 0.3 の時点で行い、さらに 30℃で 6 時間培養後、遠心により菌体を回収した。1 l 培養由来の菌体を 10 ml の lysis バッファー (20 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM EDTA、10 % sucrose、7 mM 2-Mercaptoethanol、2 mg/ml leupeptin、0.1 mM PMSF) 中で超音波破碎し、70Ti ローター (Beckman) で 25000 rpm で 30 分間遠心した。沈殿を 4 M 尿素を含む lysis バッファー 10 ml に超音波破碎によって溶解し、同様に遠心した。その沈殿は 8 M 尿素を含む lysis バッファー 10 ml に超音波破碎によって溶解し、同様に遠心操作を行った。得られた上清は、大腸菌組換えタンパク質抽出液とした。次に、タンパク質抽出液を SDS-PAGE によって分離後、CBB 染色により検出した目的のバンドを切り出した。エレクトロエリ्यूター (BIO-RAD) を用いてゲルからタンパ

ク質を溶出後、PBS 中で透析し、凍結乾燥により濃縮したものを抗体作成用の抗原とした。

2-2-5 抗 ORC1 抗体の作成

抗 ORC1 ウサギポリクローナル抗体は、6 X His-ORC1N (1-698 アミノ酸) 1.2 mg を抗原として用い、二羽のウサギに対しそれぞれ、初回は 0.2 mg ずつ、その後 2 週間おきに 0.1 mg ずつ 4 回免疫を行った。免疫操作は、SIGMA GENOSYS に委託し、二種類の抗血清#144 および#209 を得た。

2-2-6 抗 ORC1 ウサギポリクローナル抗体の抗原カラムを用いた精製。

抗原タンパク質は、ゲルからの切り出しによって精製した後、500 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) で透析したものをを用いた。担体は CNBr-activated Sepharose (SIGMA) を使用し、100 倍量の 2 mM HCl で活性化させた後、500 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) で中和した。抗原 0.25 mg と 500 ml のビーズを混合し、室温で 15 時間クロスリンクを行った。続いて、上清を除去後に 1 M モノエタノールアミン (pH 8.0) 2 ml を加え、室温で 2 時間インキュベートした。ビーズはカラムに充填し、1 M NaCl、1 % Triton を含む PBS、3 ml で洗浄した後、0.1 % Triton を含む PBS、5 ml で洗浄した。

抗体の精製は、室温で行った。0.1 % Triton を添加した血清 500 ml を抗原カラムに加えた後、0.1 % Triton を含む PBS、5 ml で洗浄した。溶出は 2 ml の 0.2 M グリシン pH 2.3 で行い、抗体を含む画分は中和後にプールした。

2-2-7 その他の抗体

抗 ORC2 抗体は MBL のマウスモノクローナル抗体 (3B7) を用いた。抗 CDC6 ウサギポリクローナル抗体 (H-304) および抗 Lamin ヤギポリクローナル抗体 (C-20) は Santa Cruz Biotechnology より購入した。ヤギ抗ウサギ IgG 抗体およびヤギ抗マウス IgG 抗体は BIO-RAD から購入したものをを用いた。

2-2-8 細胞培養

培養細胞は、293 細胞 (アデノウイルス 5 型の癌遺伝子 E1 で形質転換したヒト胎児腎臓細胞株、Stillman and Gluzman, 1985) と HeLa S3 細胞 (ヒト子宮頸癌由来細胞株) を用いた。各々の細胞は 10 % FBS (Fetal Bovine Serum、GIBCO BRL) と 1 % Penicillin-Streptomycin (GIBCO BRL) を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium、SIGMA) を使用して 37°C、5 % CO₂ 条件下で培養した。

2-2-9 Triton X-100 による細胞分画

10 cm dish 中で培養した細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄後、 1×10^4 cells/ml となるように 100 mM NaCl を含む氷冷 0.1 % TX-mCSK (0.1 % TX-100mCSK) 緩衝液を加えた

後、細胞を Cell Lifter (Costar) でかきとってエッペンチューブに回収した。細胞懸濁液は氷上で 10 分間インキュベート後、500 X g、4°C、3 分間遠心して可溶画分 (sup) と不溶画分に分画した。不溶画分は、抽出時と等量の氷冷 0.1 % TX-100mCSK 緩衝液に再懸濁後、氷上で 5 分間インキュベートし、続いて 500 X g、4°C、3 分間遠心して可溶画分と不溶画分 (ppt) に分画した。

2-2-10 タンパク質の NaCl による抽出

HeLa 細胞から調製した 0.1 % TX-100mCSK 緩衝液不溶性の ppt (3 X 10⁷ cells 相当) を 300 mM の NaCl を含む 0.1 % TX-100mCSK 緩衝液 500 mL に再懸濁後、氷上で 30 分間インキュベートし、続いて 180 X g、4°C、3 分間遠心して可溶画分と不溶画分に分画した。得られた可溶画分は NaCl 抽出液として免疫沈降実験に用いた。

2-2-11 免疫沈降

抗 ORC1 ウサギポリクローナル抗体 (#209、#144)、マウスモノクローナル抗体 (3A2A) を用いた免疫沈降は以下の方法で行った。HeLa 細胞から調製した塩抽出液 500 mL と各精製抗体 10 mg 相当量を混合し 4°C で 2 時間攪拌した。次に、それぞれ 20 mL のプロテイン A ビーズを添加後、4°C で 1 時間攪拌した。ビーズを TBS-T 緩衝液で 2 回洗浄後、40 mL の 0.1 M グリシン pH 2.0 で結合タンパク質を溶出した。

2-2-12 siRNA を用いたタンパク質のノックダウン

ORC1 の siRNA オリゴ (ORC1+73a:5'-CUGCACUACCAAACCUAUATT-3'、ORC1b:5'-UAUAGGUUUGGUAGUGCAGTT-3')、CDC6 の siRNA オリゴ (CDC6+82a:5'-CUCCAGCGAUGCCAAACUATT-3'、CDC6+82b:5'-UAGUUUGGCATCACUGGAG TT)、および Luciferase の siRNA オリゴは日本バイオサービスに委託して作成した。3 X 10⁵ 個の 293 細胞を 6 cm dish にまき、2 mL の 10 % FBS を含む DMEM 中で 37°C、5 % CO₂ の条件下で 24 時間培養した。細胞へのオリゴの導入は以下の手順で行った。4 mL の oligofectAMINE (Invitrogen) と 32 mL の Opti-MEM 培地 (GIBCOBRL) を混合した後、室温で 10 分間インキュベートした。この混合液に、アニーリングさせた 20 mM のオリゴを 340 mL の Opti-MEM で希釈した溶液を添加、混合した後、室温で 20 分間インキュベートした。混合液は細胞に滴下し軽く混合した後、37°C、5 % CO₂ の条件下で 60 時間培養した。

2-3 結果

2-3-1 抗体の特異性 I (ORC1 の検出)

アフィニティー精製により得られた抗体標品についていくつかの希釈系を作成し、抗原タンパク質 (50, 10, 2, 0.4, 0.1 ng) をニトロセルロース膜 (Amersham Biosciences) にスポットしたものと反応させたところ、#144 は 1/100 希釈で 0.4 ng の ORC1 を、#209 は 1/500 希釈で 0.1 ng の ORC1 を検出した (結果不掲載)。さらに HeLa 細胞抽出液に対して各抗体を用いたウエスタンブロッティングを行ったところ、#144 および #209 は共に ORC1 の分子量に相当する 100 kDa 付近のタンパク質と反応した (図 2-1)。また #144 で検出された 70 kDa のバンドはこの抗体に特異的なものであることから、これは ORC1 以外のタンパク質との交叉反応によると考えられる。

2-3-2 抗体の特異性 II (免疫沈降物の解析)

免疫沈降により作成した抗体の ORC1 に対する特異性をさらに検討した。HeLa 細胞の 0.3 M NaCl 抽出液から、#144 および #209 を用いて免疫沈降を行った。その後、各抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った (図 2-2)。まず #209 による免疫沈降物を、#144 および #209 でウエスタンブロッティングを行ったところ 100 kDa のバンドが検出された。さらに当研究室で行った、#209 の沈降標品の質量分析装置を用いた解析から、100 kDa に ORC1 を検出すると共に ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 の共沈降も確認された (Ohta et al., 2003)。#144 による免疫沈降では、#144 および #209 に反応するバンドいずれも検出できなかった。これらの His-hORC1N に対する検出感度から考えると、#144 は標的タンパク質を沈降する活性がないと考えられる。

2-3-3 抗体の特異性 III (siRNA を用いた解析)

#209 を用いると、ヒト細胞抽出液からウエスタンブロッティングによって、100 kDa のバンドが検出されるとともに免疫沈降により ORC1 が他の ORC サブユニットと共沈降することが示された。そこで、ウエスタンブロッティングで検出されるバンドが ORC1 に特異的であることを確認するため、ORC1 に対する siRNA を導入したヒト細胞でこのバンドの挙動を解析した。まず ORC1、CDC6 さらに対照実験としてルシフェラーゼに対する siRNA を 293 細胞にトランスフェクションし、60 時間後に細胞を回収して細胞抽出液のウエスタンブロッティングを行った (図 2-3)。CDC6 に特異的な siRNA で処理した細胞では、CDC6 のバンドの強度のみが 90% 減少した。さらに ORC1 に特異的な siRNA を導入したところ、#209 によって検出される 100 kDa のバンド強度が 90% 減少した。これに対してルシフェラーゼに対する siRNA で処理した場合、何れのタンパク質の減少も見られなかった。

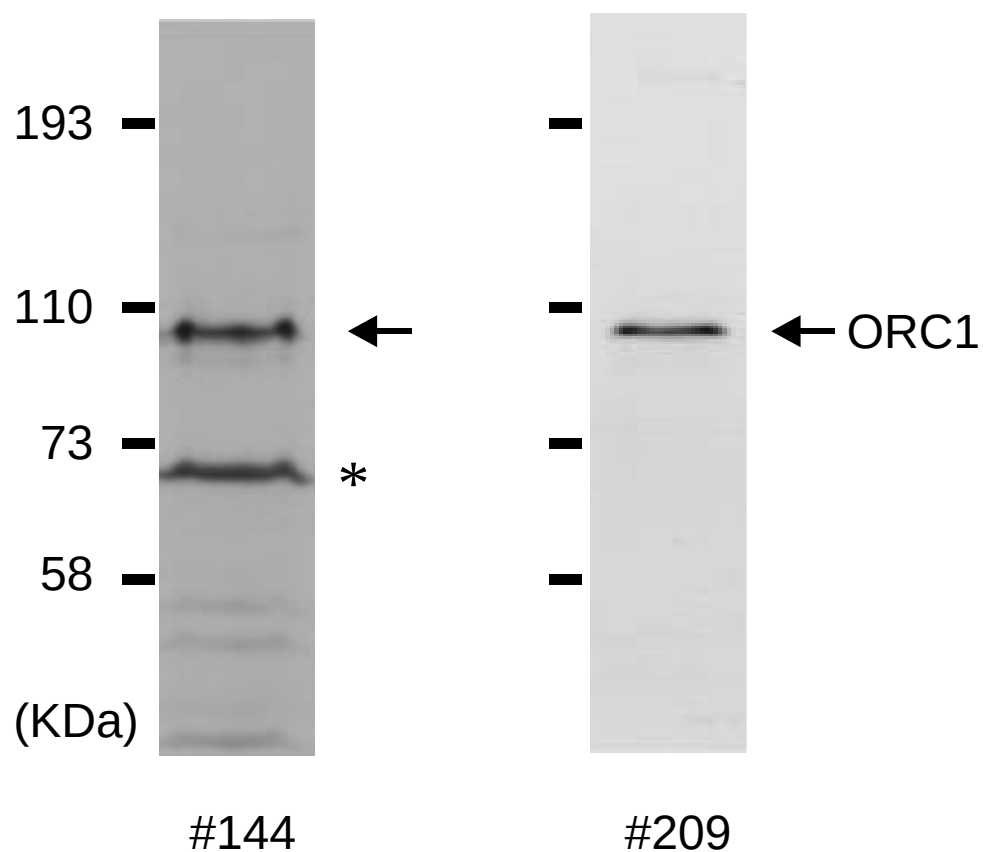


図2-1 抗ヒトORC1抗体#144と#209を用いたウエスタンブロッティングによるヒト細胞抽出液からのORC1の検出
非同調293細胞 1×10^5 個から調製した全細胞抽出液について、12.5 %のSDSポリアクリルゲルで分離後、#144および#209を用いたウエスタンブロッティングを行った。矢印で示した100 kDaのバンドがヒトORC1に相当する。（*）で示したバンドは非特異的なものと考えられる。

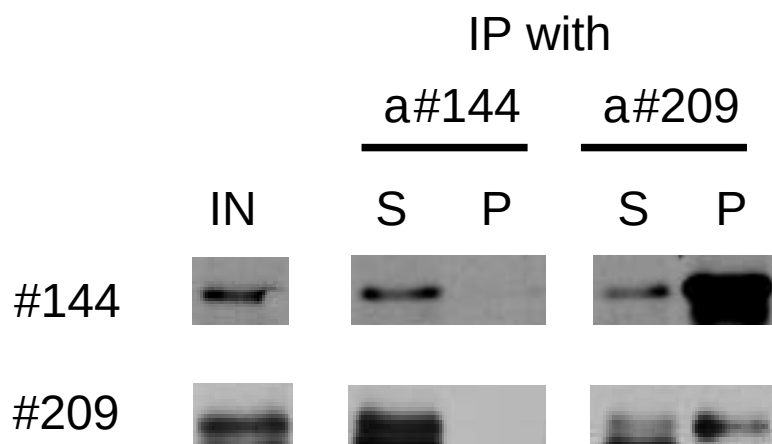


図2-2 各種抗体を用いたヒトORC1の免疫沈降およびその検出

非同調HeLa細胞の300 mM NaCl抽出液から#144および#209を用いて免疫沈降を行った。

それぞれの抽出液（IN）と免疫沈降の上清画分（S）、免疫沈降の沈殿画分（P）について#144、#209を用いたウエスタンブロッティングを行った。沈殿画分は抽出液および上清画分に対して10倍量を用いた。

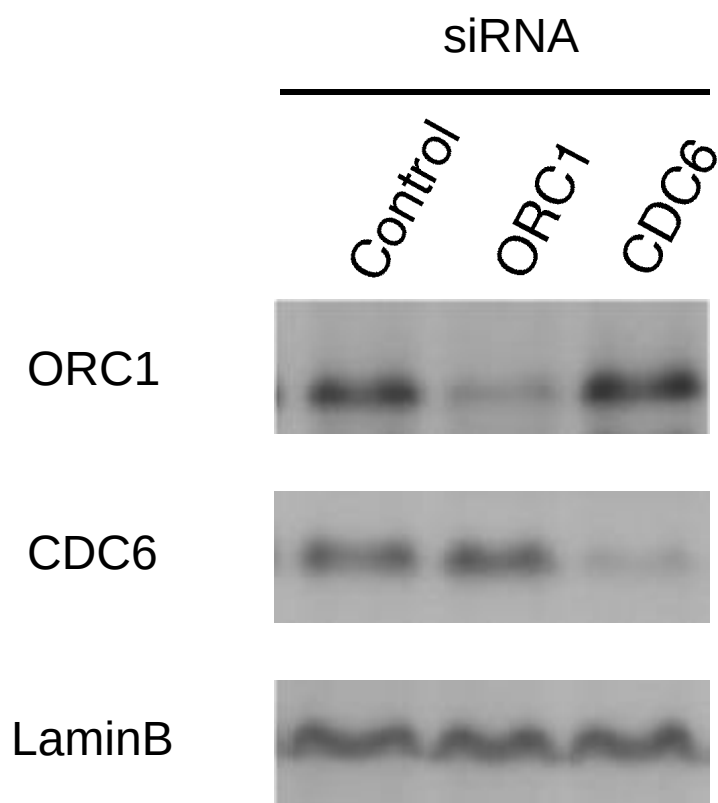


図2-3 siRNA処理によるヒトORC1の発現抑制の検出

ORC1、CDC6およびLuciferase（Control）に対するsiRNAを293細胞にトランスフェクション後、60時間後に細胞を回収して、全細胞抽出液について#209（ORC1）およびCDC6、Lamin Bに対する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。

2-4 考察

以前作成したヒト ORC1 に対するマウスモノクローナル抗体 3A2A の免疫沈降産物について質量分析装置を用いて解析を行った結果、3A2A は RNA のスプライシングに関わる 100 kDa のタンパク質 PSF とその複合体を優先的に沈降することが明らかとなった（結果不掲載）。抗体が PSF に交叉反応したのは、抗原として用いたペプチド中の配列 STPHR が、PSF 中にも STP および PHR として存在し、抗体はこの何れかの配列を認識した為ではないかと考えられた。また、3A2A を用いて HeLa 細胞一個あたりの反応するタンパク質の分子数を計算した結果、細胞あたり 1.6×10^6 個存在することが示唆された（Tatsumi et al., 2000）。しかしこれは結果的に、期待された ORC1 の分子数ではなく、優先的に濃縮された PSF の量に相当すると考えられる。実際、出芽酵母の ORC は複製開始点とほぼ同数存在すること（Rowley et al., 1995）、HeLa 細胞の ORC2 および CHO 細胞の ORC1 と ORC2 は、予想される動物細胞の複製開始点とほぼ同数すなわち約 10^4 個存在することが報告されている（Kreiz et al., 2001、Natale et al., 2000）。このことからヒト ORC1 も約 10^4 個存在することが予想されるのに対し、3A2A の沈降産物から推定された ORC1 量はこれよりも 2 桁も多かったが（Tatsumi et al., 2000）、この矛盾は 3A2A 抗体の PSF に対する交叉反応性で説明される。

3A2A は His-hORC1N を検出するのに 100 ng が必要であったのに対して、得られた抗体#209 は 0.1 ng の His-hORC1N を検出可能であった（結果不掲載）。このようにヒト ORC1 に高い反応性を示す#209 を用いることで、ヒト細胞抽出液からのウェスタンブロッティングにより ORC1 を 100 kDa のバンドとして特異的に検出することができた。このバンドが細胞内の ORC1 に由来することは、ORC1 に特異的な siRNA を用いた実験から証明されている。またバンド強度から、HeLa 細胞一個あたりの分子数は 1.5×10^4 個と計算された（Ohta et al., 2003）。これは他のグループの報告とも一致する。実際に免疫沈降では、#209 により濃縮された 100 kDa のタンパク質は質量分析から ORC1 と同定でき（Ohta et al., 2003）、この抗体が ORC1 を特異的に沈降する活性を有することが明らかになった。同じ#209 による免疫沈降では ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 の共沈降が確認され（Ohta et al., 2003）、#209 は ORC 複合体とも反応すること、さらにヒト細胞内においてはかなりの割合の ORC1 が ORC2-5 と複合体として存在することが明らかになった。以下の実験ではこのような抗体の特性を基に、特異的抗 ORC1 抗体#209 を用いたヒト細胞中の ORC1 の解析を行った。

第3章

ヒト細胞内における

ORC1 蛋白質の存在様式とその機能領域の解析

3-1 序

最近の組換えタンパクを用いたヒト ORC 複合体の再構築の研究から、ヒト細胞においても ORC が ORC1-6 の複合体を形成する可能性が示された (Vashee et al., 2001)。またヒト ORC サブユニットの細胞内挙動に関してもいくつかのグループから報告されたが (Ohtani et al., 1996, Quintana et al., 1997, Quintana et al., 1998, Saha et al., 1998, Dhar and Dutta, 2000, Thome et al., 2000)、その詳細については依然として多くが不明であった。したがって細胞内における ORC1 の存在様式を明らかにすることは、ヒト ORC の機能を考える上で重要な手がかりとなる。そこで生化学的細胞分画法と前章で記述した抗 ORC1 抗体を用いたウェスタンブロッティングおよび免疫染色とを組み合わせて用い、ヒト ORC1 の細胞内局在について解析した。さらに、ORC1 の分子構造とその細胞内挙動の関係についての解析も行った。例えば ORC1 の N 末側には BAH (Bromo-adjacent homology) ドメイン (Callebaut et al., 1999)、C 末側には NTP 結合モチーフが存在する (Gavin et al., 1995)。これらは出芽酵母からヒトまで保存されている。BAH ドメインは、DNA (cytosine-5) methyltransferase 等の転写制御に関わる因子にみられるが、その機能は不明である。一方、NTP 結合モチーフは Walker A と Walker B モチーフを含み CDC6 や RFC (Replication factor C) などの AAA+ ATPase ファミリーに共通のもので、ATP の結合および加水分解に関与する。そこで BAH ドメインを含む N 末および NTP 結合モチーフを含む C 末に着目し、これらを中心とした ORC1 の系統的な欠失変異体発現系を作成し、ヒト細胞での一過的発現実験から、局在および ORC 複合体形成能への要求性について解析を行った。

3-2 材料と方法

3-2-1 抗体

抗 ORC5 抗体は、GST-ORC5 (全長) を抗原として用い、SIGMA GENOSYS に委託して作成したウサギポリクローナル抗体 (#241) を使用した。抗 ORC3 抗体および抗 ORC4 抗体は Anindya Dutta 博士 (ハーバード大学) より譲与されたウサギポリクローナル抗体を用いた (Quintana et al., 1997, Pinto et al., 1999)。

3-2-2 DNase I による細胞分画

ヒト培養細胞からの 0.1 % TX-100mCSK 緩衝液不溶性分画の調製は前章に記した様に行った。調製した 0.1 % TX-100mCSK 緩衝液不溶性の ppt は、 1×10^4 cells/ml 相当になるよう氷令した 0.1 % TX-100mCSK 緩衝液に再懸濁した。終濃度 1mM となるように ATP を、また終濃度 1000 units/ml となるように DNase I (Roch Molecular Biochemicals) を添加後、25°C で 40 分間インキュベートし、続いて 500 X g、4°C、3 分間遠心して DNase I 可溶画分と不溶画分に分画した。

3-2-3 免疫染色

ORC1 の免疫染色は、一次抗体として精製した抗 ORC1 抗体 (#209) を、二次抗体として Cy3 で蛍光標識された抗ウサギ抗体 (MBL) を使用した。

表面に細胞を生育させたカバーガラスを 12 穴プレートに回収し 1 ml の PBS で 3 回洗浄後、1 %ホルマリンを 1 ml 加えて室温で 15 分間インキュベートして細胞を固定した。DNase I 処理を行う場合は、前記の様に DNase I 存在下 25°C で 40 分間インキュベートした後にホルマリン固定を行った。次に 1 ml の PBS でカバーガラスを 3 回洗浄後、1 ml の 0.1 % の Triton を含む TBS (TX-TBS) 緩衝液を加えた後、室温で 10 分間インキュベートした。TX-TBS 緩衝液を吸引し、1 ml の TBS-T 緩衝液でカバーガラスを 3 回洗浄した。一次抗体処理は 10 % FBS を含む TBS-T 中、4°C、O/N で行った。次に 1 ml の TBS-T でカバーガラスを 3 回洗浄後、二次抗体処理は 10 % FBS を含む TBS-T 中で室温、2 時間行った。1 ml の TBS-T でカバーガラスを 3 回洗浄後、核を染色するために DAPI を 1 ml 加え、室温で 15 分間処理した。1 ml の PBS でカバーガラスを 3 回洗浄後、スライドガラスにマウントして蛍光顕微鏡 (Leica) 下で観察した。

3-2-4 全長および欠失変異 FLAG-ORC1 発現系の構築

過剰発現させた ORC1 を、内在性の ORC1 と区別するために C 末側に 3 X FLAG 配列 (5'-GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATGATGACATCGATTACAA GGATGACGATGACAAGATC-3') を付加した。また、N 末側には Kozac 配列と ATG 配列 (5'-GCCGCCGCCATG-3') を付加した。以下に示す欠失変異 FLAG-ORC1 は、大谷博士 (東京医科歯科大学) より譲与された pBSK (-) ORC1 をもとに作成した。3 X FLAG 配列は、全長 (1-861)、DNL (45-861)、DNM (209-861)、DNS (325-861)、DNLS (1-208、325-861) では HhaI – NotI サイトに、DC (1-510)、DCNS (325-510) では、EcoRI – NotI サイトに挿入した。Kozak と ATG 配列は、全長、DNLS および DC では SalI – NcoI サイトに、DNL では SalI – BsaBI サイトに、DNM では SalI – BalI サイトに、DNS および DNLS では SalI – NspV サイトに挿入した。欠失変異 FLAG-ORC1 をヒト細胞で発現させるために、pRevTRE (CLONTECH) および pcDNA3.1/Zeo (Invitrogen) のベクターを使用した。pRevTRE FLAG-ORC1 は、pBSK (-) から SalI –

NotI で切り出した欠失変異 ORC1 の配列を pRevTRE の SalI - SphI サイトに挿入することにより作成した。また、pcDNA3.1/Zeo FLAG-ORC1 は、pBSK (-) から SalI - NotI で切り出した配列を、pcDNA3.1/Zeo の PstI - NotI サイトに挿入することで作成した。

3-2-5 293 細胞における FLAG-ORC1 の一過的な過剰発現

3 X 10⁵ 個の 293 細胞を 6 well プレートにまき、10 % FBS を含む DMEM 2 ml 中、37°C、5 % CO₂ の条件下で 12 時間培養した。細胞へのプラスミド DNA の導入は以下の手順で行った。DMEM 94 ml を 1.5 ml エッペンチューブに取り、6 ml の Eugene 6 (Roche Molecular Biochemical) を添加後、穏やかに混合した。室温にて 10 分間インキュベートした後、2 mg の DNA を加え、穏やかに混合してから室温にて 30 分間インキュベートした。10 % FBS を含む DMEM を 2 ml ずつ加えた well に全量滴下し、37°C、5 % CO₂ の条件下で 72 時間培養後、解析に用いた。

3-3 結果

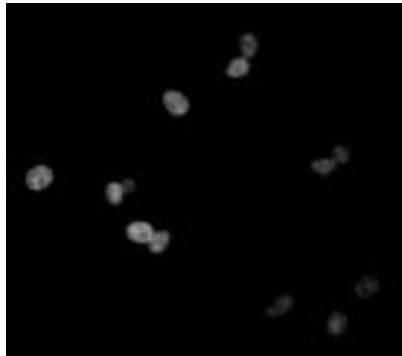
3-3-1 ORC1 の存在様式の解析

#209 を用いた細胞染色法によって ORC1 の局在を調べた。非同調の 293 細胞について Triton による抽出操作を行わずに染色を行ったところ、抗体に反応するシグナルは DAPI で染色される核内のみに観察された (図 3-1 A)。しかしこのシグナルはすべての細胞で同様に見られるわけではなく、核全体にシグナルが観察された細胞は約 30% であった。さらに高倍率のレンズを用いて検出したところ、抗体特異的なシグナルは核内にドット状に分布することおよびドットの数細胞によって異なることが明らかとなった (図 3-1 B)。この量的変動については以下 4 章で詳細に述べる。

次に、#209 によって検出されるシグナルが ORC1 であることを確認するために、FLAG-ORC1 を内在性の ORC1 と等量発現する 293 細胞株 (クローン 1A5、作成法等は第 5 章参照) について、#209 および抗 FLAG 抗体を用いて二重染色を行った (図 3-2 A)。抗 ORC1 抗体は Cy3 で標識した二次抗体で、抗 FLAG 抗体は FITC で標識した二次抗体で検出した。非同調の 1A5 株について抽出操作を行わずに染色を行ったところ、FLAG 抗体に反応するシグナルは DAPI で染色される核内のみに観察された。またこのシグナル強度は細胞毎に異なり、約 40 % の細胞で核全体にシグナルが認められた。一方、#209 に反応するシグナルも抗 FLAG 抗体による染色結果と同様のパターンを示した。さらに高倍率のレンズを用いて各シグナルを検出したところ、#209 および抗 FLAG 抗体によるシグナルは共に核内でドットとして検出された。これらの画像を Iplab Spectrum P 3.1.2c (Scanalytics Inc., USA) を用いて重ね合わせたところ (図 3-2 B)、大部分が黄色くなり重複していることが明らかになった。したがって

A

DAPI



ORC1



B

DAPI (blue)/ORC1 (red)

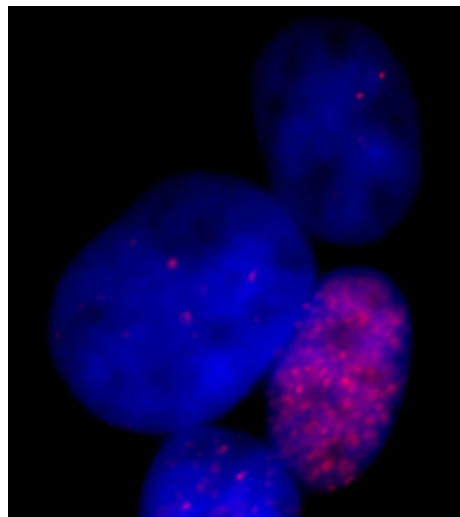
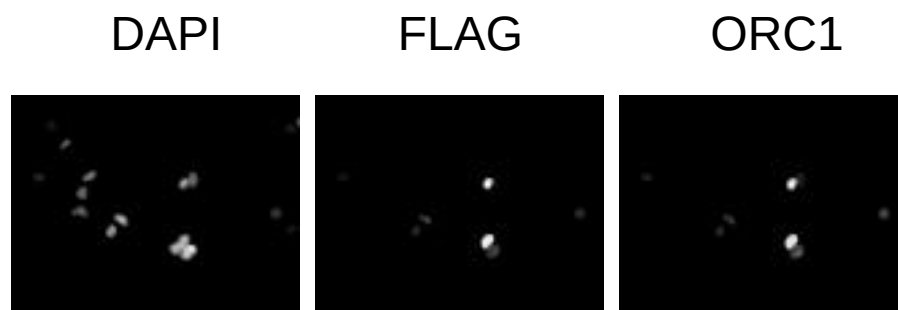


図3-1 293細胞における抗ヒトORC1抗体による免疫染色

A：非同調のヒト293細胞について固定した後、抗ヒトORC1抗体（#209）およびDAPI（核）で染色した。

B：高倍率のレンズで撮影し、ORC1（#209、red）とDAPI（blue）の染色像を重ね合わせた。

A



B

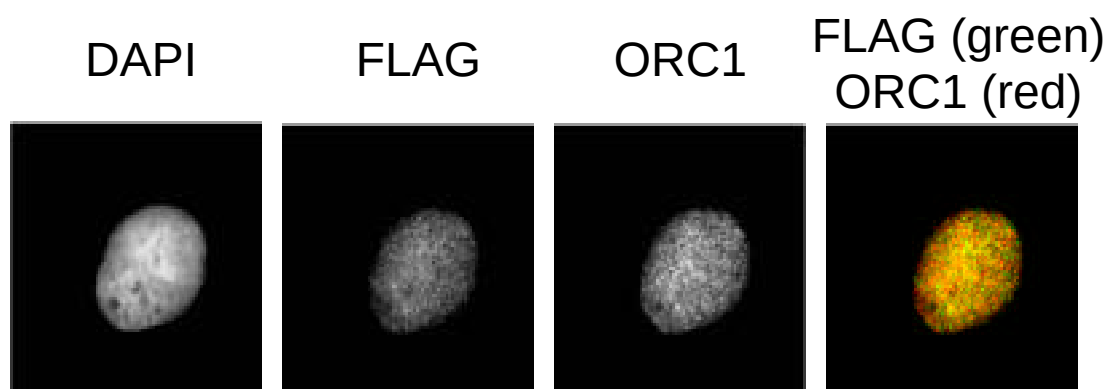


図3-2 FLAG-ORC1発現293細胞株における、抗FLAG抗体と抗ヒトORC1抗体による共染色

A：非同調のFLAG-ORC1発現293細胞株（1A5）について固定した後、抗FLAG抗体、抗ヒトORC1抗体（#209）およびDAPI（核）で染色した。

B：シグナルが検出される細胞について高倍率のレンズで撮影し、抗FLAG抗体（green）と#209（red）の染色像を重ね合わせた。

#209 により細胞内の ORC1 を検出可能なこと、さらにこのシグナルは核内にドット状に現れることが示された。

3-3-2 ORC1 の核構造との相互作用の解析

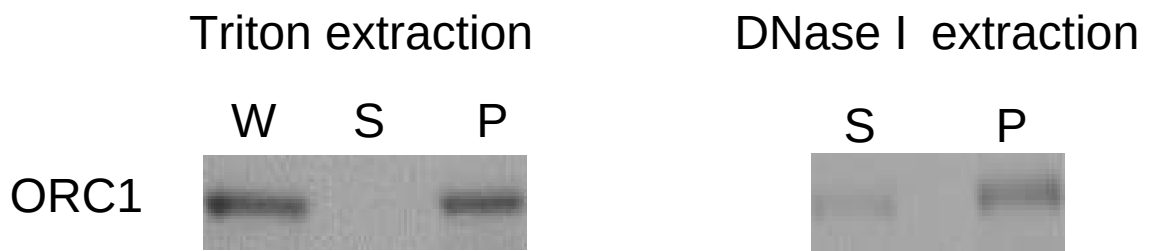
ヒト ORC1 の細胞内局在をさらに詳細に調べるため、非同調 HeLa 細胞を用いて Triton と DNase I による生化学的分画を行った。Triton 不溶性画分には、染色体/核マトリックスと結合しているタンパク質が含まれると考えられる。この Triton 抽出核を DNase I で処理するとクロマチン結合タンパクは可溶化し、その不溶性画分には核構造および特殊な染色体 DNA と結合しているタンパク質が含まれると考えられる (Fujita et al., 1999)。全細胞抽出液および Triton 分画について、ウエスタンブロッティングにより ORC1 を検出したところ、大部分の ORC1 は Triton 不溶性であった (図 3-3 A)。さらに DNase I 分画についても調べたところ、大部分の ORC1 は DNase I 処理に対しても不溶性であった (図 3-3 A)。さらに、抗 ORC1 抗体を用いた細胞染色法によって ORC1 の局在を調べた。抽出操作を行わずに染色した HeLa 細胞では、ORC1 のシグナルは図 3-1 と同様に一部の細胞の核内において観察されるが (図 3-3 B)、同様の像は DNase I 処理を行った後に染色した場合においても観察された (図 3-3 B)。これらの結果より、ORC1 は核内、特に DNase I 耐性の核構造中に局在していることが示された。

3-3-3 ORC1 の細胞内局在に関わるドメインの解析

このようにヒト ORC1 は、染色体 DNA および DNase I 耐性の核構造に局在する。これに加えて、ORC2-5 とともに複合体を形成する (Ohta et al., 2003)。そこで、ORC1 のこれらの機能と ORC1 上の機能ドメインの関係について解析を行った。C 末端に FLAG タグを付加した全長 ORC1、N 末の 45 アミノ酸を欠失した DNL、BAH ドメインを含む N 末を欠失した DNM、BAH ドメインおよび CDC6 の NLS (Nuclear localizing signal) と相同性があることから (Delmolino et al., 2001) NLS ではないかと予想された配列を含む N 末を欠失した DNS、NLS 様の配列を含む領域を欠失した DNLS、NTP 結合モチーフを含む C 末 351 アミノ酸を欠失した DC、BAH ドメインおよび NLS 様の配列を含む N 末と NTP 結合モチーフを含む C 末を欠失した DCNS を、それぞれヒト細胞内で一過的に発現させた。この発現系では、欠失変異 ORC1 はそれぞれ内在性の 5-10 倍程度発現した。

欠失変異 ORC1 発現細胞を Triton で分画し、ORC1 の染色体 DNA/核マトリックスへの局在について調べた (図 3-4)。抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出したところ、全長の FLAG-ORC1 は内在性の ORC1 同様に Triton 不溶性であった。N 末について調べた結果、BAH ドメインまで欠失させた DNM は Triton 不溶性であったのに対し、BAH ドメインおよび NLS 様の配列を欠失させた DNS は約半量が Triton 可溶性になるという局在の変化がみられた。しかし、NLS 様の配列

A



B

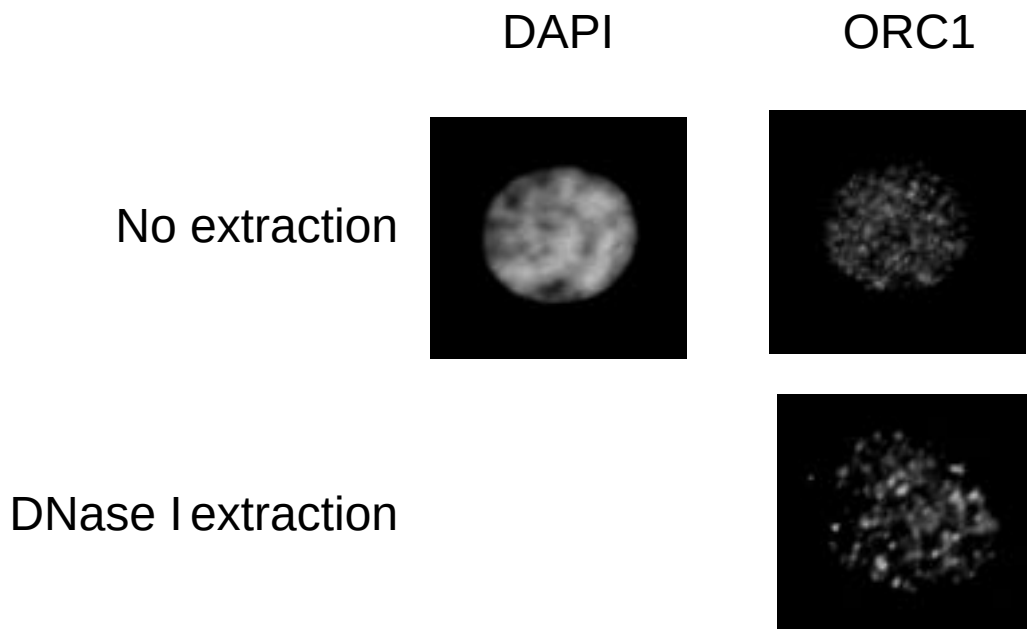


図3-3 ヒトORC1の局在（ウエスタンブロッティングと細胞染色を組み合わせた解析）

- A：非同調のHeLa細胞を100 mM NaClを含む0.1 % TX-CSK緩衝液により可溶画分と不溶画分に分画した（Triton extraction）。Triton不溶画分についてDNase Iを含む0.1 % TX-CSK緩衝液により可溶画分と不溶画分に分画した（DNase I extraction）。全細胞抽出液（W）およびそれぞれの分画の可溶画分（S）と不溶画分（P）について抗ヒトORC1抗体（#209）を用いたウエスタンブロッティングを行った。
- B：非同調のHeLa細胞について固定した後、抗ヒトORC1抗体（#209）およびDAPI（核）で染色した（No extraction）。DNase I抽出を行った後に抗ヒトORC1抗体（#209）で染色した（DNase I extraction）。いずれの場合も、抗体特異的なシグナルが観察された細胞について掲載した。

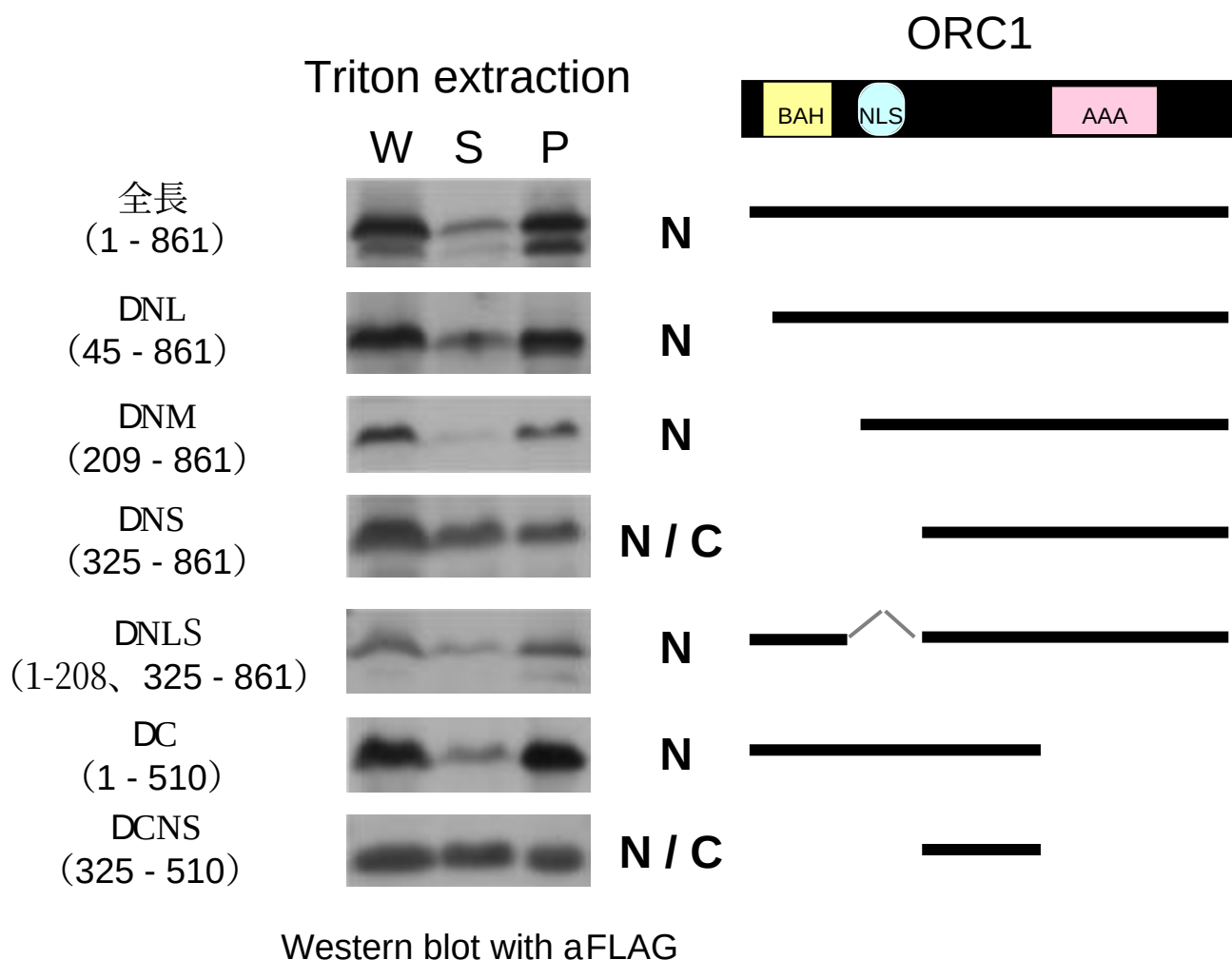


図3-4 ヒトORC1の局在に関与する領域の解析

系統的に欠失変異を導入したORC1蛋白質をヒト293細胞内で一過的に発現させ、局在に関与するドメインの解析を行った。トランスフェクション60時間後に100 mM NaClを含む0.1 % TX-CSK緩衝液により可溶画分 (S) および不溶画分 (P) に分画した後、全細胞抽出液 (W) と共に抗FLAG抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。

(N) はTriton抽出により不溶性画分に分画されることを、(N / C) は不溶画分および可溶画分に分画されることを示す。

BAH . . . Bromo-adjacent homology domain

NLS . . . Nuclear localization signal like sequence

AAA . . . AAA+ ATPase domain

を含む領域のみを欠失したDNLSはTriton不溶性であった。C末について調べた結果、NTP結合モチーフを含むC末を欠失したDCはTriton不溶性であった。N末とC末を欠失させたDCNSは、DNS同様に約半量がTriton可溶性となった。したがってORC1の染色体DNA/核マトリックスへの局在には、N末端から324アミノ酸の領域が必要であること、NTP結合モチーフを含むC末領域は必要ないことが示された。

3-3-4 ORC1のORC複合体形成に関わるドメインの解析

欠失変異ORC1発現細胞の300 mM NaCl抽出液から抗FLAG抗体を用いて免疫沈降を行い、FLAG-ORC1と内在性のORC2、ORC3、ORC4、ORC5が共沈降するかについて検討した(図3-5)。免疫沈降画分を抗FLAG抗体および抗ORC2-5抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出したところ、全長のFLAG-ORC1は内在性のORC1同様にORC2-5と共沈降した。N末欠失変異について調べたところ、BAHドメインまで欠失させたDNMはORCの他のサブユニットが共沈降したのに対し、BAHドメインおよびNLS様の配列を欠失させたDNSでは他のサブユニットの共沈降は見られなくなった。一方でNTP結合モチーフを含むC末を欠失したDCおよびN末とC末を欠失させたDCNSでも、他のサブユニットの共沈降は見られなかった。したがってORC1がORCの他のサブユニットと複合体形成するためには、BAHドメインおよびNLS様の配列を含むN末から324アミノ酸の領域とNTP結合モチーフを含むC末から351アミノ酸の領域の両方が必要であることが示された。またORC1とORC2-5の共沈降が起きる時はこの4つのサブユニットが全て沈降することから、ORC2からORC5はORC2-5サブ複合体として存在し、これにORC1が結合するという形で構成されることが示された。

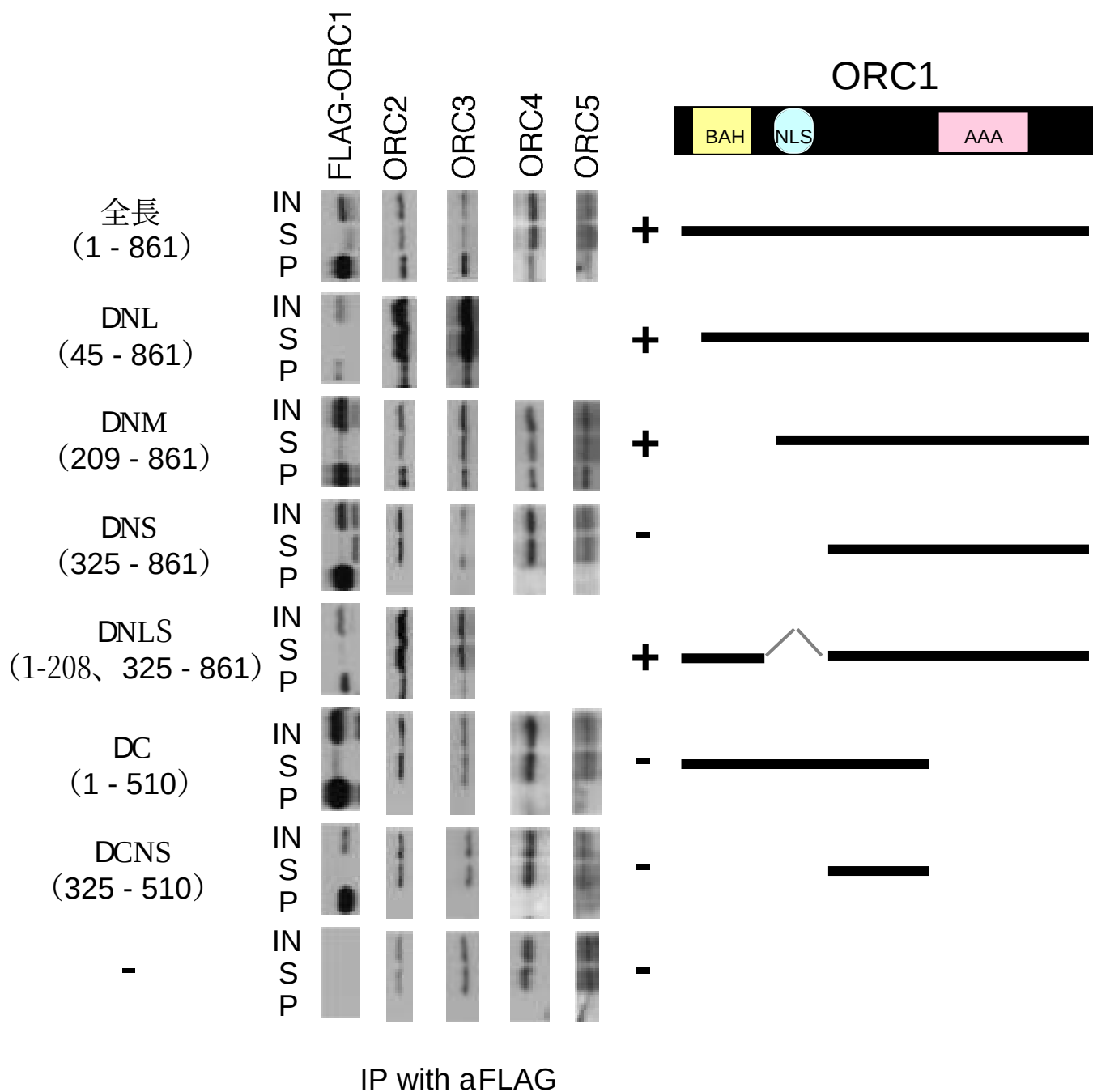


図3-5 ヒトORC1のORC複合体形成に関与する領域の解析

欠失変異体FLAG-ORC1蛋白質をヒト293細胞内で一過的に発現させ、ORC複合体形成に関与するドメインの解析を行った。トランスフェクト60時間後の細胞の300 mM NaCl抽出液から抗FLAG抗体を用いて免疫沈降を行なった。

それぞれの抽出液 (IN) および免疫沈降の上清画分 (S)、免疫沈降の沈殿画分 (P) についてFLAG、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。(+)はORCの他のサブユニットがFLAG-ORC1と共沈降すること、(-)は共沈降しないことを示す。

3-4 考察

3-4-1 ヒト ORC1 の発現

#209 を用いて非同調のヒト培養細胞を染色したところ、抗体特異的なシグナル強度および核内でドット状に観察されるシグナルの数は細胞毎に異なった。さらに、構成的発現プロモーターで転写される FLAG-ORC1 を発現する単クローン由来細胞として樹立した 293 細胞株（クローン 1A5）においても、細胞によって抗 FLAG 抗体特異的なシグナル強度に差が見られた。これは第 4 章で詳しく述べるように細胞周期に依存した細胞内の ORC1 の量的変動によるものである。

3-4-2 ヒト ORC1 の核局在

出芽酵母の ORC1-6 複合体は細胞周期を通じて複製開始点に結合し、DNA 複製開始に必須である（Micklem et al., 1993、Bell et al., 1995、Loo et al., 1995）。同様に、アフリカツメガエルやショウジョウバエの ORC に関しても染色体 DNA に結合して複製開始に必須であることが報告されており（Carpenter et al., 1996、Rowles et al., 1996、Romanowski et al., 1996、Pinto et al., 1999、Loupard et al., 2000、Chesnokov et al., 2001）、このような ORC の局在および機能は真核生物全般で保存されていることが予想された。本研究で作成した抗ヒト ORC1 抗体#209 を用いた細胞内局在の解析から、ORC1 は核内にドット状のシグナルとして局在し DNase I 耐性のクロマチン/核構造と相互作用していることが示された。さらに ORC2-5 の一部も ORC1 に依存して DNase I 耐性の核構造と相互作用することが細胞分画により明らかとなっており（Ohta et al., 2003）、ORC1 は ORC2-5 と複合体を形成して DNase I 耐性の核構造中で機能することが予想された。この ORC1-5 の核構造との関係はどのような意味があるのだろうか。近年、哺乳動物細胞において DNA 複製開始点と核構造や ORC との関係が明らかとなりつつある。実際、動物細胞の DNA 複製開始点は、matrix attachment region（MAR）と呼ばれる核構造と相互作用する DNA 領域の近傍に存在することが、チャイニーズハムスターおよびヒトの dihydrofolate reductase（DHFR）遺伝子領域の ori-b の解析から示されている（Pelizon et al., 1996、Ortega and DePamphilis, 1998）。また Chromatin Immunoprecipitation（ChIP）法を用いた解析から、ヒト ORC サブユニットが Epstein-Barr virus（EBV）の複製開始点として知られる oriP に結合することが示されている（Schepers et al., 2001、Chaudhuri et al., 2001）。このようにヒト細胞においても ORC は複製開始点に結合して DNA 複製開始に関わることが考えられる。したがってここで観察された DNase I 耐性の核構造中での ORC1 のドット状の局在は、ORC1 が複製開始点の決定に重要な役割を担うことに対応すると思われる。

3-4-3 ヒト ORC1 の N 末領域の機能

ORC1 の N 末領域は真核生物の種間での相同性は低いが、BAH ドメインは出芽酵

母からヒトまで保存されている (Callebaut et al., 1999)。出芽酵母 ORC1 の BAH ドメインを含む N 末領域は、セントロメア、silent mating-type (HM) loci およびテロメア領域でのヘテロクロマチン形成に関わる SIR1 との相互作用に必須であることが示されている (Triolo and Sternglanz, 1996)。興味深いことに組換えタンパクを用いた実験から、ショウジョウバエの ORC1 の N 末が SIR1 のパラログである heterochromatin protein 1 (HPI) と相互作用することが報告されている (Pak et al., 1997)。したがって生物種に関わらず ORC1 の N 末はヘテロクロマチン形成に係る因子との相互作用に関与することが予想される。実際にヒト ORC1 のクロマチン/核マトリックス結合には BAH ドメインを含む領域(1-208)および NLS 様の配列を含む領域(209-324)が必要であることが明らかとなった。また同じ領域は ORC2-5 との複合体形成にも必要であった。他の生物種においては ORC1 の N 末が ORC 複合体形成に関与するという報告がないことから (Bell, 2002)、ヒト ORC1 の場合は N 末を介したクロマチン/核マトリックスへの局在が ORC2-5 との相互作用に必要である可能性が考えられる。このヒト ORC1 の核局在の詳細な分子機構についてはさらなる検討が必要である。

3-4-4 ヒト ORC1 の C 末領域の機能

ヒト ORC1 の C 末は核構造との結合には必要ないが ORC 複合体形成に必須であることが示された。ORC1 の C 末領域は NTP 結合モチーフを含み、生物種を越えて高度に保存されている。例えばヒトとチャイニーズハムスターとマウスの ORC1 を比較した場合、全長の相同性が 81 %であるのに対して C 末のみの相同性は 93 %となる (Bogan et al., 2000)。また出芽酵母とショウジョウバエにおいて、ORC1 が C 末領域にある NTP 結合モチーフを介して ATP と結合すると ORC と DNA との相互作用が強固になることが報告されている (Klemm et al., 1997、Chesnokov et al., 2001)。さらに出芽酵母では ORC1 への ATP の結合はその配列特異的な DNA 結合に必要である (Bell, 2002)。ここで観察されたヒト ORC1 の C 末領域の ORC 複合体形成への関与は、NTP 結合モチーフを介したものであるのか、C 末の他の領域によるものであるのかを明らかにするためにはさらに詳細な解析が必要である。もし NTP 結合モチーフを介したものであるならば、出芽酵母 ORC に見られるように ORC1 の ATP 結合や DNA 結合活性と ORC 複合体形成能の間に密接な連携があるという興味深い機構を示唆することになる。

第 4 章

ヒト ORC1 蛋白質の

細胞周期依存的な量的制御の解析

4-1 序

出芽酵母 ORC は、細胞周期を通じて六量体で複製開始点に結合する (Diffley et al., 1994、Liang and Stillman, 1997、Fujita et al., 1998)。前記のようにヒト ORC も他の真核生物と同様に、細胞内で複合体を形成して染色体上に存在することが明らかとなった (第三章、Ohta et al., 2003)。しかし、細胞染色の結果から ORC1 は細胞周期で量的制御を受ける可能性が考えられた。ORC は MCM を複製開始複合体に集合させる活性が知られているが (Romanowski et al., 1996、Donovans and Diffley, 1996)、近年の研究から高等動物では ORC の活性制御を ORC1 が担っている可能性が示唆されている (DePamphilis, 2003)。実際、ORC1 は ORC サブユニット中で唯一 E2F によって制御される遺伝子である (Ohtani et al., 1996)。またヒト ORC1 は細胞周期依存的にユビキチン化され量的制御を受ける可能性が近年報告された (Mendez et al., 2002、Fujita et al., 2002)。そこで、細胞周期依存的な ORC1 の量的の変動についてさらに詳細に検討した。実際には同調培養したヒト細胞を用い、#209 によるウエスタンブロッティングと細胞染色を組み合わせで調べた。

4-2 材料と方法

4-2-1 抗体

抗 MCM3 抗体は木村博士 (東京医科歯科大学) より譲与されたウサギポリクローナル抗体を用いた (Kimura et al., 1994)。抗 cyclin E 抗体 (HE111) および抗 cyclin A 抗体 (H-432) は、Santa Cruz Biotechnology より購入した。

4-2-2 ヒト培養細胞の M 期同調

M 期に同調した細胞集団は、以下の方法で得た。1 X 10⁶ 個の細胞を 10 cm dish に継代し、10 % FBS、1 % PS を含む DMEM 10 ml 中で 12 時間培養した。培地を 2.5 mM チミジン (SIGMA)、10 % FBS、1 % PS を含む DMEM 10 ml に置換後、24 時間培養した。続いてチミジンを除去後、微小管重合阻害剤の 3-(1-Anilinoethylidene)-24dione (TN16) を 150 ng/ml、10 % FBS、1 % PS を含む DMEM 10 ml 中で 12 時間培養した。

同調した細胞のリリースは、細胞を PBS で 2 回洗浄後、10 % FBS および 1 % PS

を含む DMEM 10 ml 中に蒔き直して行った。

4-2-3 フローサイトメーターを用いた細胞周期の解析

1 X 10⁶ 個の細胞はトリプシンにより 1.5 ml のエッペンドルフチューブに回収後、200 ml のサンプルバッファー (0.1 % sodium citrate、0.1 % Triton X-100、50 mg/ml propidium iodide) に懸濁し、室温、遮光条件下で 10 分間インキュベートした。RNase A を 1 mg/ml になるように加え、室温、遮光条件下で 10 分間インキュベートした。細胞集団の DNA 含量は、propidium iodide の蛍光強度を FACScan (Becton Dickinson) を用いて解析することにより測定した。

4-2-4 ブロモデオキシウリジン (BrdU) による細胞のパルスラベルと抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色

カバーガラス上で G1/S 期および M 期に同調培養した後リリースし、サンプリングの 10 分前に培地中に BrdU (終濃度 10 mM) を加えてさらに培養後、カバーガラスを回収し PBS で 2 回洗浄した。細胞への BrdU の取り込みは 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I (Roche) により検出した。BrdU の染色像は蛍光顕微鏡 (Leica) により、BrdU と ORC1 の共染色像は共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus) により解析した。

4-2-5 全長および欠失変異体 FLAG-ORC1 過剰発現 293 細胞株の作成

3 X 10⁵ 個の 293 細胞を 6 well プレートにまき、10 % FBS を含む DMEM 2 ml 中、37°C、5 % CO₂ の条件下で 12 時間培養した。細胞へのプラスミド DNA の導入は以下の手順で行った。DMEM 94 ml を 1.5 ml エッペンチューブに取り、6 ml の Eugene 6 (Roche Molecular Biochemical) を添加後、穏やかに混合した。室温にて 10 分間インキュベートした後、2 mg の pcDNA3.1/Zeo FLAG-ORC1 プラスミド DNA を加え、穏やかに混合してから室温にて 30 分間インキュベートした。10 % FBS を含む DMEM を 2 ml ずつ加えた well に全量滴下し、37°C、5 % CO₂ の条件下で 60 時間培養した。さらに終濃度 300 mg/mL の Zeocin と 10 % FBS を含む DMEM 中で 20 日間選択培養後、形成したコロニーをクローニングシリンジを用いて単離した。

4-3 結果

4-3-1 ORC1 タンパク質量の細胞周期における変動

ヒト細胞における細胞周期を通じた ORC 各サブユニットの存在量の変動をウエスタンブロッティングにより調べた。293 細胞を TN16 で M 期に同調後リリースした細胞集団について、図に示した各時間に細胞を回収した (図 4-1)。各時間における

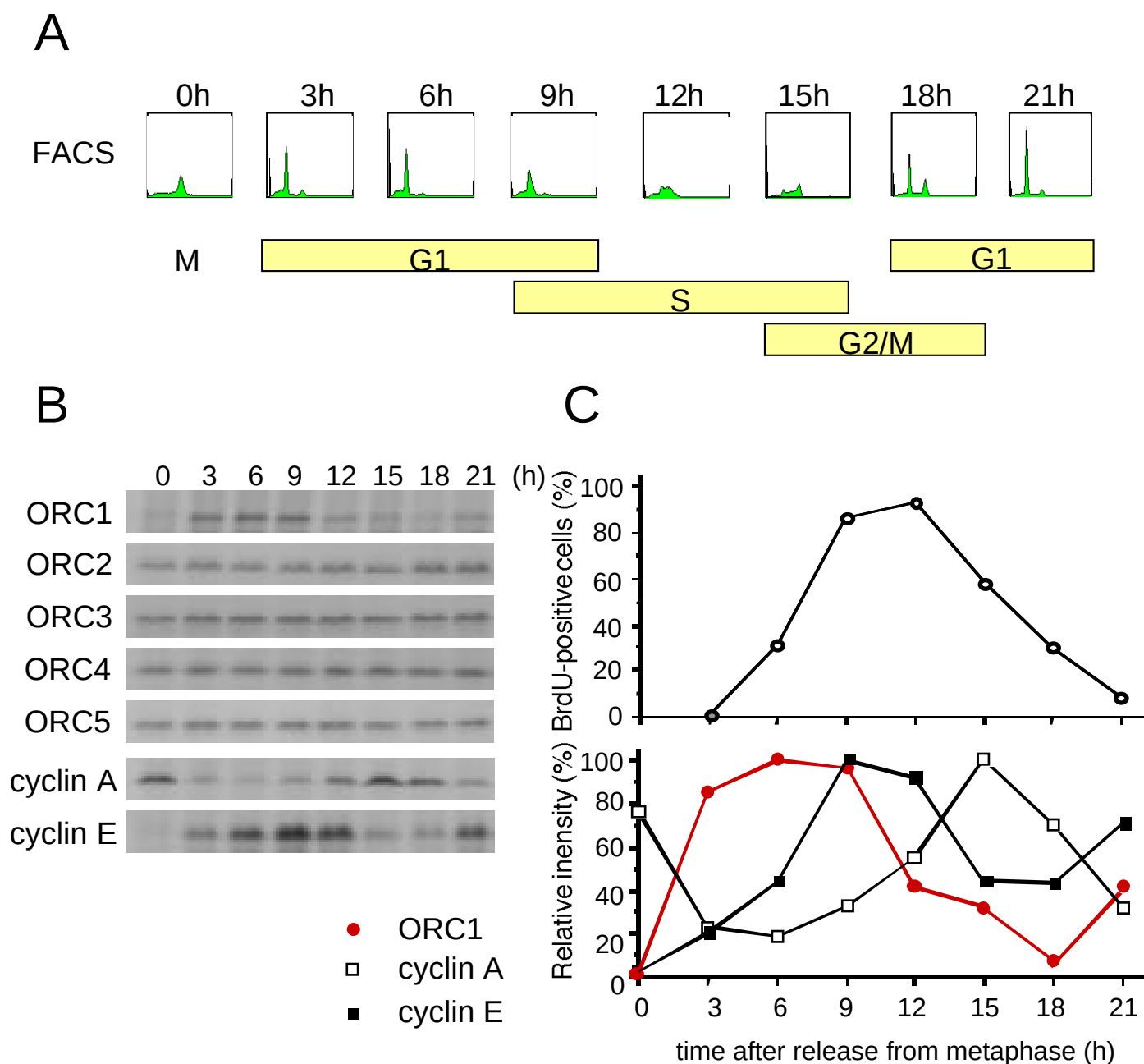


図4-1 細胞周期依存的なヒトORC1タンパク質量の変動

A：微小管重合阻害剤（TN16）によりM期に同調後、リリースした293細胞のFACSパターン。

B：各時間に回収した全細胞抽出液について#209（ORC1）およびORC2-5に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。また、細胞周期の指標としてcyclin Aおよびcyclin Eに対する抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

C：(上) S期の指標として、BrdUの取り込みが検出された細胞の割合を示した。

(下) Bに示したORC1、cyclin A、cyclin Eのシグナル強度を定量し、ピークの値を100%とした相対値でグラフに示した。

FACS および BrdU の取り込みから、3 時間から 9 時間が G1 期、9 時間から 15 時間が S 期、15 時間から 18 時間が G2/M 期に相当することが示された。全細胞抽出液について ORC1、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 に対する抗体を用いて検出し、これらの細胞内含量を解析した。同時に、G1/S 期に発現量が増加する cyclin E、および S 期から G2 期にかけて発現量が増加する cyclin A についても同様に調べた (Dulic et al., 1992)。その結果、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 は細胞周期を通じて一定量存在した。それに対して ORC1 量はリリース後 3 時間から 9 時間にかけて増加し、それ以降は減少した。したがって 293 細胞において ORC1 量は G1 期に増加し、cyclin E の発現量が最大になり BrdU の取り込みが増加する G1/S 期を境に速やかに減少すること、その増減の幅は約 10 倍程度であることが示された。

これまでに動物細胞の ORC1 は非常に不安定で細胞を抽出する過程で分解を受けやすいという報告があり (Okuno et al., 2001、Li and DePamphilis, 2002)、上記の細胞周期依存的な ORC1 量の変動が細胞の回収時に生じた可能性もある。前述のウエスタンブロッティングでは、細胞を Triton を含む CSK バッファーを用いて回収した後 SDS サンプルバッファーに懸濁して全細胞抽出液を作成した。この CSK バッファー懸濁の段階のプロテアーゼによるタンパクの分解を最小限にするため、SDS サンプルバッファーで直接回収する方法、および細胞を TCA で固定した後 SDS サンプルバッファーで回収する方法で全細胞抽出液を調製した。非同調およびチミジンにより S 期に同調した 293 細胞について、上記の 3 種類の方法で全細胞抽出液を調製した後ウエスタンブロッティングを行い ORC1 量を比較した (図 4-2)。その結果、非同調細胞中の ORC1 量は抽出法に関わらずほぼ同量検出された。また、S 期停止細胞における ORC1 量の減少についても抽出法に関わらず同程度観察された。したがって図 4-1 に示した結果に及ぼす細胞抽出液調製時の ORC1 の分解の影響は、例えばあったとしても無視できる程度であると考えられる。

4-3-2 構成的発現プロモーターによって発現する FLAG-ORC1 量の細胞周期依存的な変動

ORC1 はプロモーター領域に E2F 結合領域を持ち、E2F による転写制御を受けていると考えられる (Ohtani et al., 1996)。そこでその転写制御の ORC1 量変動への貢献度を明らかにするため、FLAG タグを付加した全長のヒト ORC1 を、構成的なサイトメガロウイルス (CMV) のプロモーターから安定発現する 293 細胞株 (クローン 1A5) を使用した。その発現量は内在性の ORC1 とほぼ等量である。ORC1 タンパク量が転写制御を中心に調節されているのであれば、この細胞株では CMV プロモーターから発現する FLAG-ORC1 の存在量は細胞周期を通じて一定であることが予想された。そこで、1A5 を TN16 で M 期に同調後リリースした細胞集団について、図に示した各時間に細胞を回収した (図 4-3)。各時間における細胞周期分布を FACS、BrdU の取り込みによって調べた結果、3 時間から 9 時間が G1 期、9 時間から 15 時

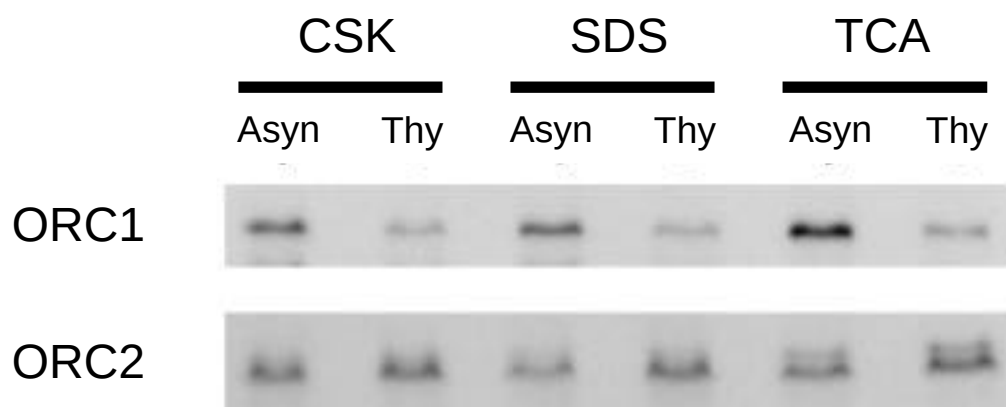


図4-2 S期のORC1量の減少は細胞回収時に生じたタンパク分解によるものではない
非同調の293細胞 (Asyn) およびチミジンで24時間処理した細胞 (Thy) について、
0.1 % TX-CSK緩衝液で回収した後にSDSバッファーに懸濁する方法 (CSK)、直接
SDSバッファーで回収する方法 (SDS)、TCAで細胞を固定した後にSDSバッファー
で回収する方法 (TCA) を用いて全細胞抽出液を調製した。各細胞抽出液について
#209 (ORC1) およびORC2に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行っ
た。

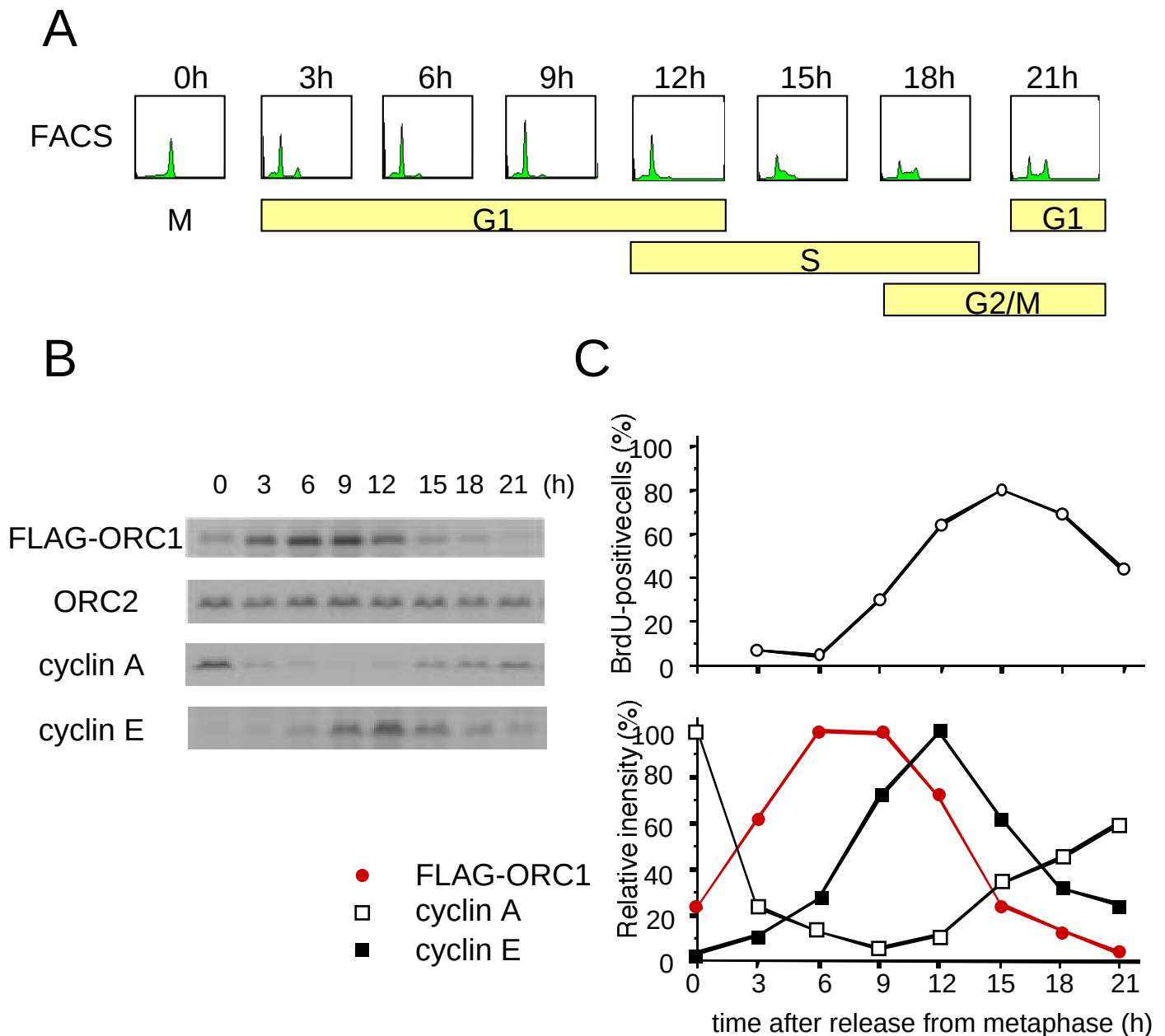


図4-3 恒常的プロモーターにより発現するFLAG-ORC1の細胞周期依存的な量の変動
 A：FLAG タグを付加した全長のヒトORC1蛋白質（FLAG-ORC1）を、恒常的プロモーターによって発現する293細胞株（1A5）について、微小管重合阻害剤によりM期に同調後、リリースした細胞集団についてのFACSパターン。
 B：各時間に回収した全細胞抽出液についてFLAGおよび、ORC2、cyclin A、cyclin Eに対する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。
 C：(上) S期の指標として、BrdUの取り込みが検出された細胞の割合を示した。
 (下) Bに示したFLAG-ORC1およびcyclin A、cyclin Eのシグナル強度を定量し、相対値で表した。

間が S 期、15 時間から 18 時間が G2/M 期に相当することが示された。全細胞抽出液について FLAG-ORC1 および ORC2、cyclin E、cyclin A の量をウエスタンブロッティングで定量した。その結果、FLAG-ORC1 発現細胞株においても ORC2 は細胞周期を通じて一定量存在するのに対して、FLAG-ORC1 はリリース後 3 時間から 9 時間にかけて増加し、それ以降は減少することが示された。したがって構成的なプロモーターによって発現する FLAG-ORC1 でも、内在性の ORC1 と同様の細胞周期依存的な減少を示すことが明らかとなった。

4-3-3 細胞染色による細胞周期依存的な ORC1 の増減の検出

これまでに非同調の 293 細胞や HeLa 細胞では、#209 による染色の結果、核が強く染色される細胞とほとんど染色されない細胞が存在することを見いだしていた（図 3-1）。またウエスタンブロッティングの結果から、ORC1 は G1 後期から G1/S 期に増加し DNA 複製が始まる S 期以降は減少することが示された。そこで、細胞間で見られた染色強度の違いと細胞周期依存的な ORC1 含量の増減の関係を調べた。HeLa 細胞を TN16 で M 期に同調後リリースした細胞集団についてスライドガラス上で各培養時間後、10 分間の BrdU パルスラベルを行い、その後#209 による ORC1 の染色と抗 BrdU 抗体による取り込まれた BrdU の検出を行った。FACS および BrdU の取り込みの蛍光顕微鏡観察から（図 4-4）、3 時間から 9 時間が G1 期に 9 時間から 15 時間が S 期に 15 時間から 18 時間が G2/M 期に相当することが示された。#209 による染色の結果、ORC1 のシグナルが検出された細胞はリリース後 9 時間には 80 % 近くに達し 15 時間以降の細胞ではほとんど検出されなくなることがわかった。同時に行ったウエスタンブロッティングによる ORC1 と ORC2 の定量からも、ORC2 は細胞周期を通じて一定量存在したのに対して、ORC1 量はリリース後 9 時間にピークとなり、大部分の細胞が S 期となる 12 時間以降には減少することがわかった。このように#209 を用いた細胞染色による ORC1 ポジティブの細胞の割合の増減とウエスタンブロッティングの ORC1 量の増減が一致したことから、細胞集団の抽出液内の ORC1 量は ORC1 を蓄積している細胞集団の割合を反映していると考えられる。

4-3-4 各細胞における ORC1 の増減と DNA 合成との関係

上記の実験系を用いて、各細胞内の ORC1 が増減する時期と DNA 複製開始との関係についてさらに詳細に調べた。ORC1 の染色強度と BrdU の取り込みについて各細胞を比較したところ、G1 から S 期にかけての観察では ORC1 陽性の細胞は BrdU の取り込みが始まる前の細胞と一致し、また BrdU 陽性の細胞は BrdU 陰性の細胞よりも ORC1 のシグナルは弱かった（図 4-5）。したがって ORC1 は BrdU の取り込みよりも前に出現し、DNA 複製開始時には細胞核より減少することが考えられた。共焦点レーザー顕微鏡の 40 倍の対物レンズで G1 後期の核を詳しく観察すると、ORC1 のシグナルは大小の 500 個以上のドットとして観察された（図 4-6 G1）。次に BrdU

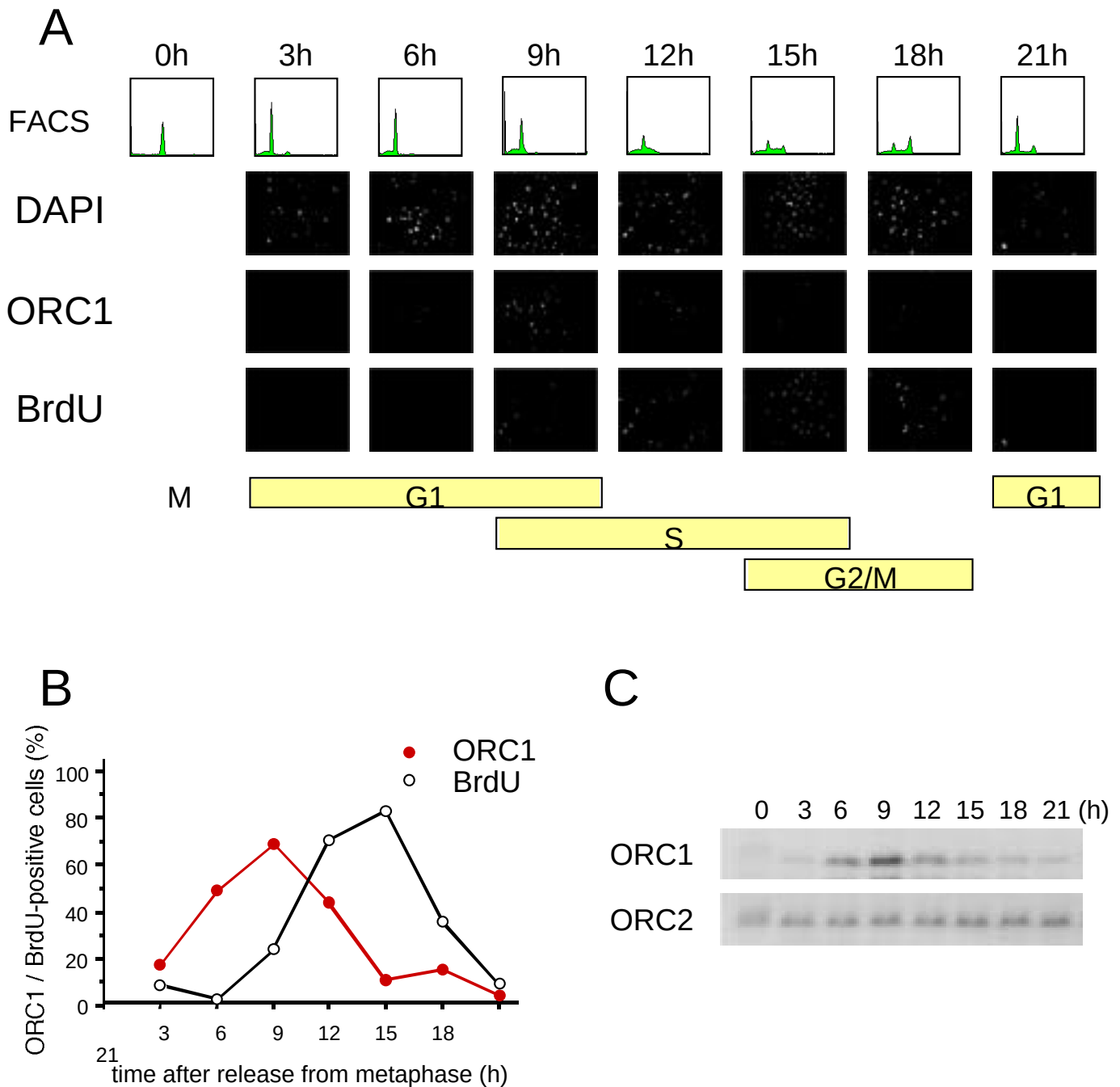


図4-4 細胞染色とウエスタンブロッティングによる、細胞周期依存的なORC1量の変動の検出

- A：微小管重合阻害剤によりHeLa細胞をM期に同調後、リリースした細胞集団についてのFACSパターン（一段目）とDAPIによる核染色（二段目）、#209によるヒトORC1の免疫染色（三段目）および抗BrdU抗体によるBrdUを取り込んだ細胞の検出（四段目）。
- B：各回収時間における、#209で染色された細胞の割合およびBrdUを取り込んだ細胞の割合をグラフで示した。
- C：各回収時間の同調培養細胞から調製した全細胞抽出液について、#209（ORC1）およびORC2に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。

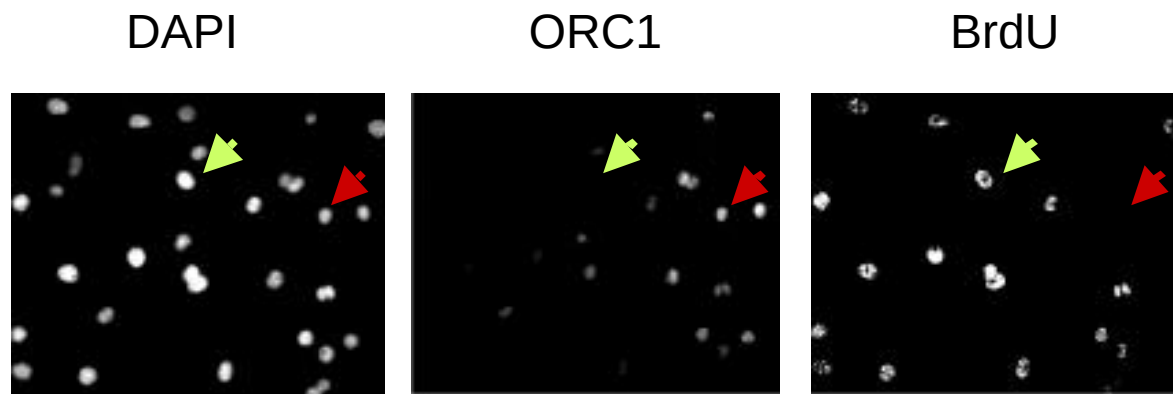


図4-5 M期からリリース後のHeLa細胞におけるORC1の染色とBrdUの取り込みの関係
 図4-4に示したM期同調からリリース後12時間目の細胞集団についてDAPIによる核染色、
 #209によるヒトORC1の免疫染色、抗BrdU抗体によるBrdUの取り込みの検出を行った。
 赤色矢印はORC1のシグナルは観察されるがBrdUの取り込みが見られない細胞を、黄色
 矢印はORC1のシグナルは検出されずにBrdUの取り込みが観察される細胞を示す。

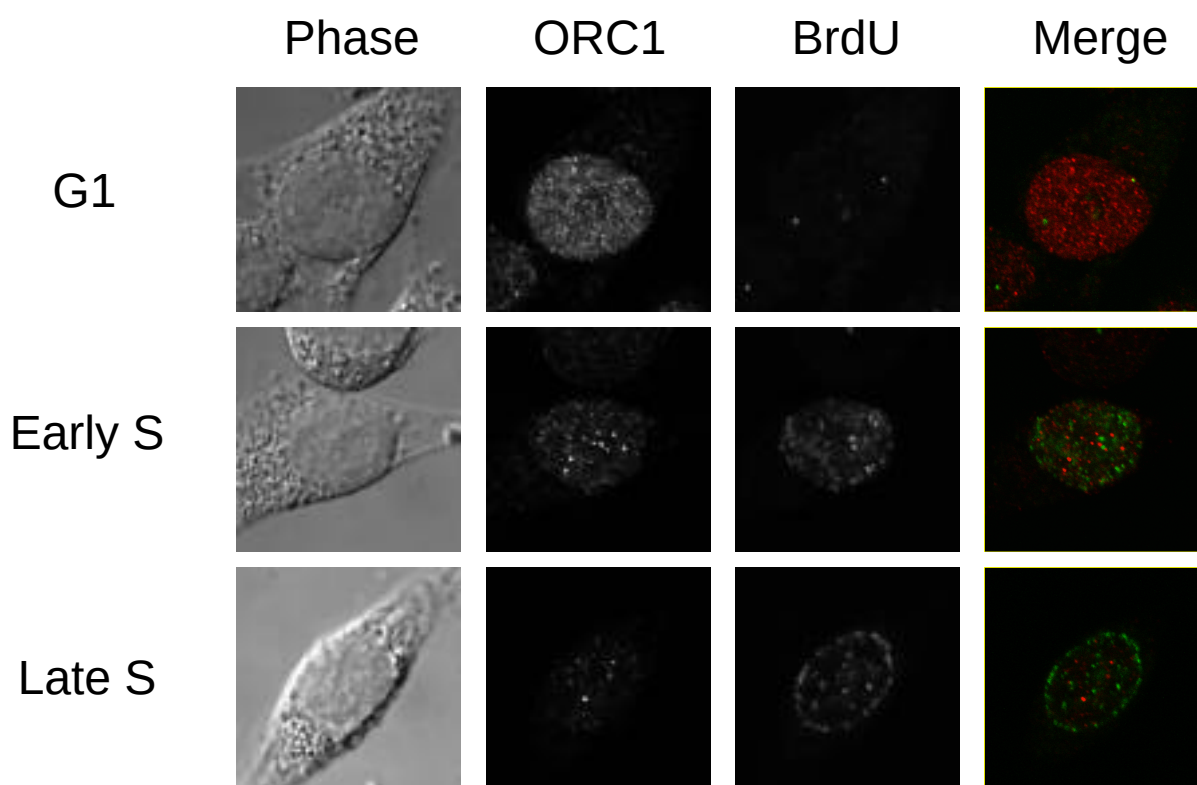


図4-6 共焦点レーザー顕微鏡を用いたORC1とBrdUのシグナルの観察

BrdUをパルスラベル後に回収したHeLa細胞について、#209（ORC1）およびBrdUに対する抗体を用いて染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いてフェーズコントラスト（Phase）、#209による染色像（ORC1）、BrdUの取り込み像（BrdU）を検出した。さらに#209の染色像（red）とBrdUの取り込みパターン（green）を重ね合わせた。BrdUの取り込みパターンから各細胞の細胞周期を同定し、G1期の細胞（G1）S期初期の細胞（Early S）S期後期の細胞（Late S）について代表的なものを示した。

の取り込みが見られる S 期の細胞について調べた。S 期初期の BrdU 染色像を示す細胞では ORC1 のシグナルは、数十個の大きなドットを除いて大部分のドットでシグナル強度の低下が見られた。また、ここで強いシグナルとして観察された ORC1 のドットは BrdU の取り込みパターンとは重ならなかった (図 4-6 Early S)。一方、S 期後期の BrdU 染色像を示す細胞では ORC1 のシグナル強度は、数個の大きなドットを除く大部分のドットにおいてシグナル強度のさらなる低下が見られ、核内に観察されるドット数も G1 期や S 期初期の細胞と比べてさらに減少していた。また S 期後期においても、これらのドットは BrdU の取り込みパターンとは重ならなかった (図 4-6 Late S)。

4-3-5 G1 期における ORC1 蓄積と MCM のクロマチン結合の関係

HeLa 細胞を TN16 で M 期に同調後、さらに S 期初期に同調するため 2.5 mM の HU 存在下でリリースした。リリース後の細胞集団について図に示した各時間に回収した (図 4-7)。細胞周期分布を FACS によって解析したところ、M 期から G1 期への進行はリリース後 6 時間までに起き、その後リリース 21 時間目の細胞は HU により S 期初期に停止していることが示された。これらの細胞から Triton 不溶画分を調製し、クロマチン/核マトリックスに結合する ORC1 および MCM3、ORC2 量の変動をウエスタンブロッティングにより解析した。その結果、ORC2 量は一定であったのに対して ORC1 はリリース後 6 時間から 15 時間にかけて増加し、それ以降は減少することがわかった。したがってクロマチン/核マトリックス結合分画においても、G1 期に増加した ORC1 は S 期に進行する直前あるいは S 期初期に減少した。一方 MCM3 は ORC1 の発現と並行してクロマチンへの結合が見られたが、15 時間以降は ORC1 量が減少してもクロマチンに結合したままであった。

4-3-6 ORC1 のタンパク分解に関わるドメインの解析

第 3 章に記した、各 FLAG タグを付加した欠失変異 ORC1 遺伝子を導入した pcDNA3.1/Zeo ベクターを 293 細胞にトランスフェクション後、Zeocin 存在下で選択した。出現したコロニーはクローニングシリンジを用いて単クローン化し、欠失 ORC1 安定発現細胞株を作成した。得られた全長 (クローン 1C2、作成方法等は第 5 章参照) 株および DN1 (209-861) 株、DC (1-510) 株、DCNS (325-510) 株はそれぞれ欠失変異 ORC1 を内在性の 4 倍、5 倍、5 倍、10 倍発現した。これらの細胞株を用いてタンパク分解に必要な領域について調べた。

ヒト培養細胞を S 期に停止させると ORC1 タンパク質量は減少する。各細胞株について 2.5 mM の HU 存在下で 24 時間培養後に回収し、欠失変異 ORC1 が減少するかについて抗 FLAG 抗体を用いたウエスタンブロッティングにより調べた (図 4-8 A)。また ORC2 のウエスタンブロッティングをローディングコントロールとした。非同調細胞と HU 処理した細胞中の FLAG-ORC1 量を比較したところ、全長および N 末

側 208 アミノ酸を欠失したDNM、C 末側 351 アミノ酸を欠失したDC、N 末側 324 アミノ酸と C 末側 351 アミノ酸を同時に欠失したDCNS すべてにおいて HU 処理によるタンパク量の減少が見られた。したがって、今回欠失させた ORC1 の N 末側 324 アミノ酸および C 末側 351 アミノ酸の領域はタンパク分解制御には関与しないことが示された。

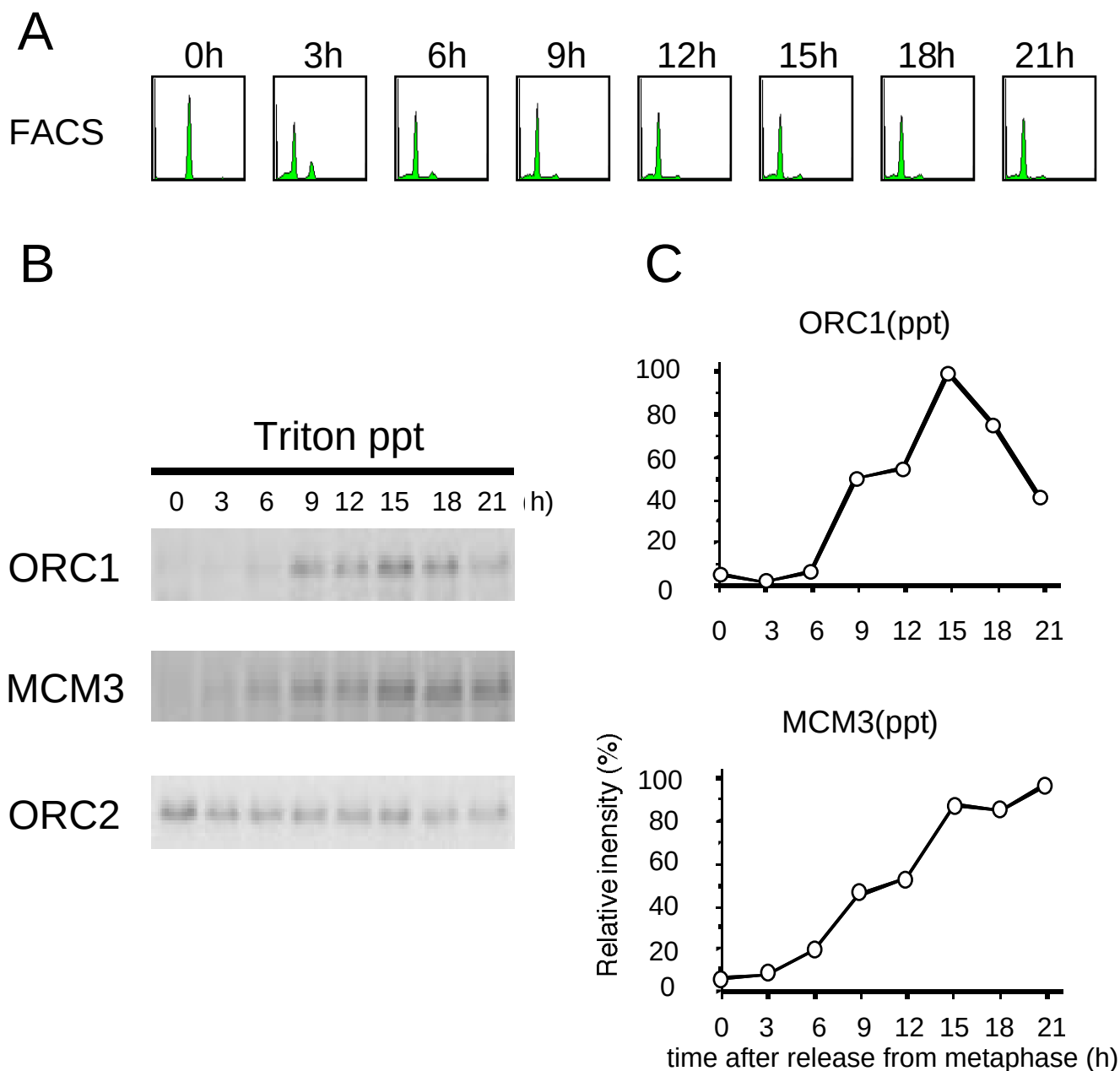


図4-7 G1期におけるORC1の蓄積とMCM3のクロマチン結合についての解析

A：微小管重合阻害剤によりM期に同調後、HU存在下の培地にリリースしたHeLa細胞のFACSパターン。

B：細胞を各時間に回収し、100 mM NaClを含む0.1 % TX-CSK緩衝液により分画した後、不溶画分（Triton ppt）について#209（ORC1）およびMCM3とORC2に対する抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

C：(上) Bに示した#209のシグナル強度を定量し、ピークの値を100 %とした相対値でグラフに示した。

(下) Bに示したMCM3のシグナル強度を定量し、ピークの値を100 %とした相対値でグラフに示した。

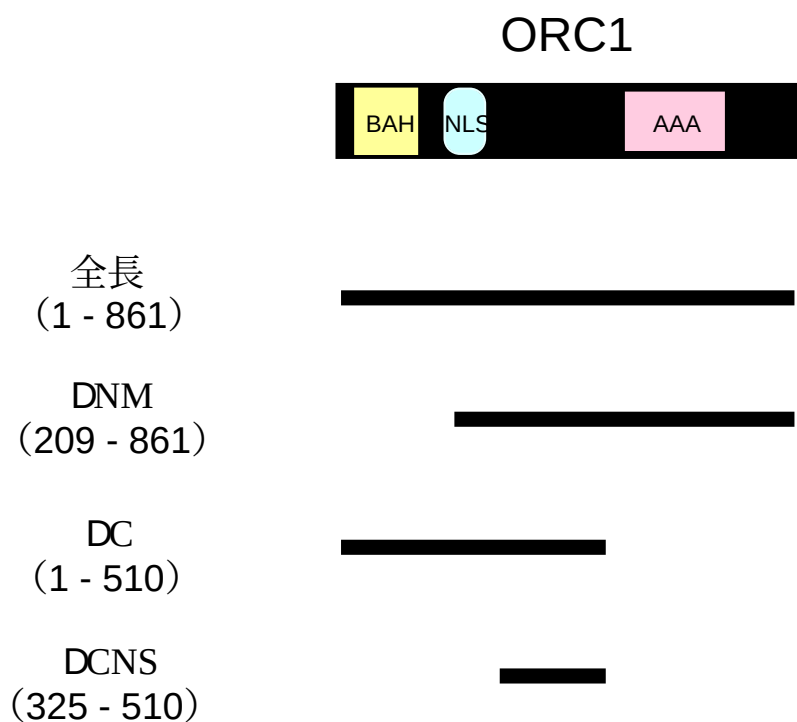
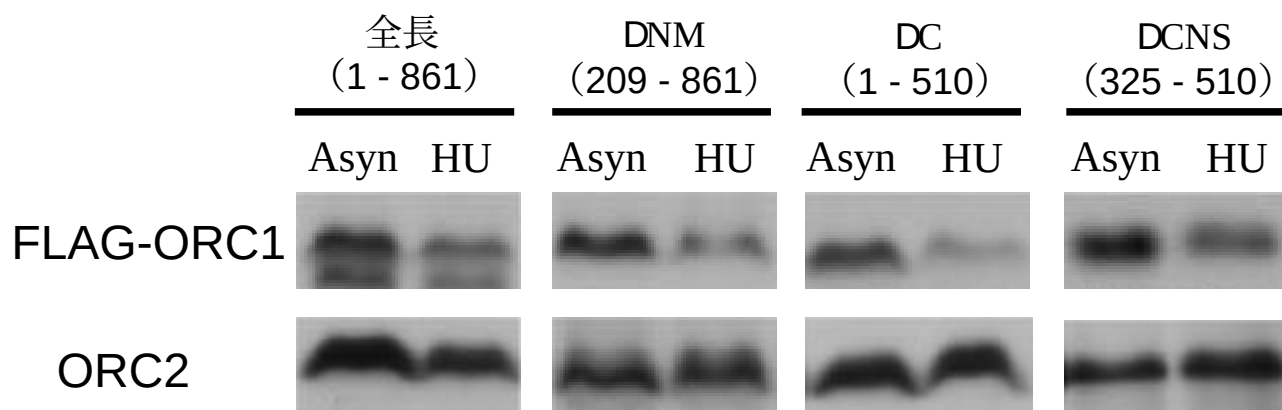


図4-8 ヒトORC1タンパク質の分解制御に関与する領域の解析

全長および欠失変異体FLAG-ORC1蛋白質を発現する293細胞株を作成し、解析に用いた。

非同調（Asyn）およびHUで24時間処理した（HU）各細胞株の全細胞抽出液について#209（FLAG-ORC1）およびORC2に対する抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。

4-4 考察

4-4-1 ORC1 サイクル

真核生物の複製開始因子である ORC は、多くの生物種において細胞周期を通じて一定量がクロマチンに結合することが報告されている (Diffley et al., 1994, Liang and Stillman, 1997, Fujita et al., 1998, Lygerou and Nurse, 1999, Kong and DePamphilis, 2001, Okuno et al., 2001, Tadokoro et al., 2002)。しかしいくつかの同調法で同調培養した 293 細胞や HeLa 細胞では、ウェスタンブロッティングによる定量的結果、ORC2-5 は細胞周期を通じて一定量存在したのに対して、ORC1 量は G1 期に増加し G1/S 期にピークとなり S 期に入ると減少することが明らかとなった。同様の結果は、HeLa および Raji 細胞を用いた他のグループの解析からも示されており (Mendez et al., 2002)、ヒト ORC1 は細胞周期依存的な量的制御を受けると結論付け、この制御系を ORC1 サイクルと呼ぶことにした。以前、ヒト ORC1 は細胞周期で一定量存在することが我々等によって報告されていたが (Tatsumi et al., 2000, Saha et al., 1998)、我々の報告に関しては、上述したように使用した抗 ORC1 抗体が同じ分子量の他のタンパク質とも交叉反応し、その蛋白質が構成的に存在したためであると考えられる。

4-4-2 ORC1 サイクルの制御

最近 Stillman らのグループが、ヒト ORC1 は SCF^{skp2} ユビキチンリガーゼ複合体によってポリユビキチン化された後、26S プロテアソームによって分解されることを示している (Mendez et al., 2002)。我々の検討でもチミジンブロックにより S 期に停止させた HeLa 細胞を、プロテアソーム阻害剤の MG132 で処理すると ORC1 の減少が部分的に抑制されたことから (Tatsumi et al., 2003)、ORC1 の分解は 26S プロテアソーム依存的であることが示唆された。さらに本研究により FLAG-ORC1 を構成的なプロモーターにより発現する 293 細胞でも細胞周期依存的な ORC1 の増減が観察されることがわかった。したがって少なくとも増殖中のヒト細胞において ORC1 サイクルは主にタンパクの分解系によって制御されることが明らかとなった。ORC1 量は E2F によって制御されるという報告もあるが (Ohtani et al., 1996)、増殖サイクルにある哺乳動物細胞では E2F 活性は G1 後期以降も持続的に高く、増殖細胞では E2F を介した転写制御は機能していないことが予想される。これに対して、血清飢餓によって G0 期に同調したヒト細胞においても ORC1 量の著しい減少が見られた (Tatsumi et al., 2003)。この ORC1 量の低下は、タンパク分解による制御と E2F による転写レベルでの制御の両方によって維持されていることが予想され、細胞が休止状態を保つために重要であると思われる。実際ショウジョウバエにおいて、休止期の細胞に ORC1 を発現させると増殖サイクルに入ることが報告されている (Asano and Wharton, 1999)。またヒト細胞でも、休止期の細胞では ORC1 の mRNA の発現が無

いこと、血清添加または E2F の過剰発現によって ORC1 の mRNA の発現が促進されることが示されており (Ohtani et al., 1996)、我々の実験でも血清添加による ORC1 タンパク量の増加が見られている (Tatsumi et al., 2003)。したがって E2F による ORC1 の積極的な発現制御は、休止期の細胞が増殖サイクルに速やかに移行する際に必要であると考えられる。一方で ORC1 の分解制御に関しては、これが SCF^{skp2} ユビキチンリガーゼ複合体依存的であるならば、基質となる ORC1 がこの複合体に認識されるためにはそのリン酸化が必須であると予想される。本研究では S 期における ORC1 の明確なリン酸化は検出できなかった。しかし ORC1 が蓄積する時期は G1 期で cyclin A の発現が無くなり cyclin E が蓄積する前であること、また cyclin E および cyclin A の蓄積が見られる G1/S 期以降に速やかに分解されることから、ORC1 サイクルは cyclin E/CDK2、cyclin A/CDK2 あるいは cyclin A/CDC2 によるリン酸化によって制御される可能性が強く示唆された。

4-4-3 ORC1 サイクルの多様性

ORC1 サイクルを進化のどの段階で獲得したのかという点も重要な問題の一つである。しかし、我々が作成した抗体#209 は真核生物の ORC1 の中でも保存性の低いヒト ORC1 の N 末を抗原として用いたため、ヒト ORC1 は特異的に認識するものの他の生物種の ORC1 には反応しなかった。したがって他の生物種についての ORC1 サイクルについては解析を行えなかった。ORC1 サイクルは酵母およびアフリカツメガエルには存在しないが (Diffley et al., 1994、Liang and Stillman, 1997、Kong and DePamphilis, 2001、Sun et al, 2002)、ショウジョウバエおよびいくつかの哺乳動物細胞で報告されている。ショウジョウバエの ORC1 は、M 期から G1 期へ移行時に APC によってユビキチン化されて分解される (Araki et al., 2003)。チャイニーズハムスターの ORC1 は、細胞周期で一定量存在するものの S 期にモノユビキチン化されクロマチンから遊離する (Li and DePamphilis, 2002)。この挙動は S 期にクロマチン上から除去されるという点ではヒト ORC1 の制御と類似しているが、S 期の分解は受けない。このヒトとチャイニーズハムスターの ORC1 サイクルの違いは、後者がモノユビキチン化しかされないのに対して前者がポリユビキチン化されることに起因すると予想される。

4-4-4 ORC1 サイクルに必要な ORC1 の機能領域

ショウジョウバエの ORC1 の N 末は、M 期に APC (anaphase promoting complex) に依存して分解されるために必須であることが報告されている (Araki et al., 2003)。しかし N 末 324 アミノ酸を欠失させたヒト ORC1 は、全長の ORC1 と比較してヒト細胞内において特に安定化するということは見られなかった。これに対して、N 末側 387 アミノ酸を欠失したヒト ORC1 は、Skp2 依存的なタンパク分解を受けないことが示された (Mendez et al., 2002)。これは、ヒト ORC1 の N 末側領域がタンパク分

解に関与することを示している。本研究結果と考え併せると ORC1 の分解制御に必要な領域は、325-386 番目の 61 アミノ酸からなる領域であることが予想される。しかし、この領域は他の生物種の ORC1 とはほとんど相同性が見られない。また APC によるタンパク分解には基質タンパク質に存在する destruction box (D-box) と呼ばれる RXXL の配列が必須であるのに対して (Petersen et al., 2000)、SCF 依存的なタンパク分解に必須な配列は特定されていない。今後、325-386 番目のアミノ酸を欠失変異させた ORC1 を作成して分解制御に関わる機能ドメインを限定する必要がある。また、ヒトとショウジョウバエの ORC1 はそれぞれ SCF および APC を介して分解されること、その他の真核生物の ORC1 は分解による制御を受けないことから、保存性の低い N 末領域は生物種に特異的な ORC1 の機能制御を担うことが考えられる。

4-4-5 ORC1 サイクルと細胞周期制御

ヒト培養細胞をアフィディコリン、HU、チミジンによって S 期に停止させると ORC1 の発現量は著しく低下した。さらに細胞を同調からリリースしたところ、細胞内の ORC1 量は再び増加しなかったにも関わらず DNA 複製の再開がみられた。したがって ORC1 の MCM ロダーとしての機能は G1 期に終了し、その後の DNA 複製の進行には関与しないことが考えられた。同様の結果は、チャイニーズハムスターの G1 期の核とアフリカツメガエルの卵抽出液を用いた *in vitro* の実験からも示されている (Sun et al., 2002)。また、クロマチンに結合したアフリカツメガエル ORC1 は、Pre-RC がクロマチン上に形成されると速やかにクロマチンより離れることから、Pre-RC が一旦形成されれば ORC1 は S 期の進行には不要であることが示唆されている (Hua and Newport, 1998, Sun et al., 2002)。以上の知見から複製開始は少量の ORC1 で十分であるという考え方もできるが、我々はむしろ ORC1 は G1 期に増加することにより Pre-RC 形成を一時的に誘導するが、一旦 Pre-RC を形成するとその後の複製開始反応には直接関与しないのではないかと考えている。免疫染色で ORC1 のシグナルと BrdU の取り込みが重ならないことを示したが、これは我々の考えを強く支持するものである。さらに ORC1 が分解あるいは解離といった方法で Pre-RC から除かれることは、その後の複製反応の進行に必須となるような積極的な機能を持つことも考えられる。

ORC1 量は DNA 傷害を受けた細胞においても減少するという報告がある (Mendez et al., 2002)。これは DNA 損傷で複製フォークの進行が阻害された細胞ではチェックポイント応答制御下で ORC1 の減少が誘導されるようにも解釈できる。実際、我々の解析でも HU 処理により S 期に停止した細胞内の ORC1 量は複製が進行していないにも関わらず減少した。しかし HU と同時に ATR/ATM の阻害剤であるカフェインを細胞に加えた場合でも、細胞集団が S 期に進行するのに伴って ORC1 量の減少が観察された (結果不掲載)。したがって ORC1 量は ATR/ATM の制御下にあるというよりはむしろそれとは独立した細胞周期の制御下にあると考えられる。前者の報告で

は adriamycin による double-strand break の結果 ATM 経路のチェックポイントが活性化した HeLa 細胞でも ORC1 が減少することが示されている (Mendez et al., 2002)。HeLa 細胞はパピローマウイルスの E6 によって p53 が不活化されており、DNA 傷害を受けた細胞は G1 停止が出来ず結果として S 期および G2/M で停止する。実際に彼らのデータも adriamycin 処理により S 期および G2/M の細胞の割合が劇的に増加しており、ORC1 の減少は細胞周期の分布を反映したものであると解釈できる。この考えと我々の結果を総合するとヒト細胞での ORC1 サイクルは複製反応の進行と連動しているというよりはむしろ細胞周期進行と連動した制御下にあると考えることができる。

今後、DNA 複製開始の前に誘導されるヒト ORC1 の分解を制御するシグナル経路の同定と、Pre-RC の形成と崩壊の過程での ORC1 の生化学的役割についてさらなる解析が必要である。

第 5 章

ヒト ORC1 過剰発現細胞株の解析

5-1 序

これまでの解析結果より、ヒト ORC1 は G1 期に一過的に蓄積して ORC2-5 と複合体を形成すると共に、DNA ヘリカーゼと考えられる MCM をクロマチンに結合させて Pre-RC 形成を誘導する役割があることが明らかになってきた (Ohta et al., 2003)。また各種のヒト細胞において ORC1 の発現量を細胞周期で厳密に制御する ORC1 サイクルが存在しており、それは ORC 複合体形成とそれに続く複製開始複合体形成の制御に深く関与することが予想された。さらにヒト ORC1 を分解して Pre-RC から除くことは、細胞周期が S 期へと進行するために必須であるとともに再複製の防止という重要な役割を担っている可能性が考えられた。そこで過剰発現によりヒト ORC1 の細胞周期依存的な量的制御を乱した 293 細胞株を作成し、ORC1 サイクルと細胞周期の進行および DNA 複製チェックポイント応答に及ぼす影響について検討した。

5-2 材料と方法

5-3 結果

5-3-1 ORC1 の過剰発現と細胞増殖

CMV プロモーターより FLAG-ORC1 を発現するように設計したプラスミド DNA (pcDNA3.1/Zeo FLAG-ORC1) 293 細胞に導入し、FLAG-ORC を内在性 ORC1 と等量発現するクローン 1A5、4 倍発現するクローン 1C2、12 倍発現するクローン 1A4 を得た (図 5-1 A)。これら ORC1 を過剰発現する細胞の増殖について、293 細胞およびベクターのみを導入した 293 細胞 (pcDNA3.1) と比較した (図 5-1 B)。4 日毎に細胞数を測定して増殖曲線を作成したところ、細胞間の増殖速度はほぼ同じで ORC1 の過剰発現は細胞の増殖速度には影響を与えないことが示された。

次に、ORC1 過剰発現細胞の細胞周期分布について検討した。非同調の各細胞について FACS 解析を行った後、細胞周期分布解析ソフトの Modifit (Becton Dickinson) により G1 期、S 期、G2/M 期の細胞の割合を測定した (図 5-2)。その結果、G1 期 /

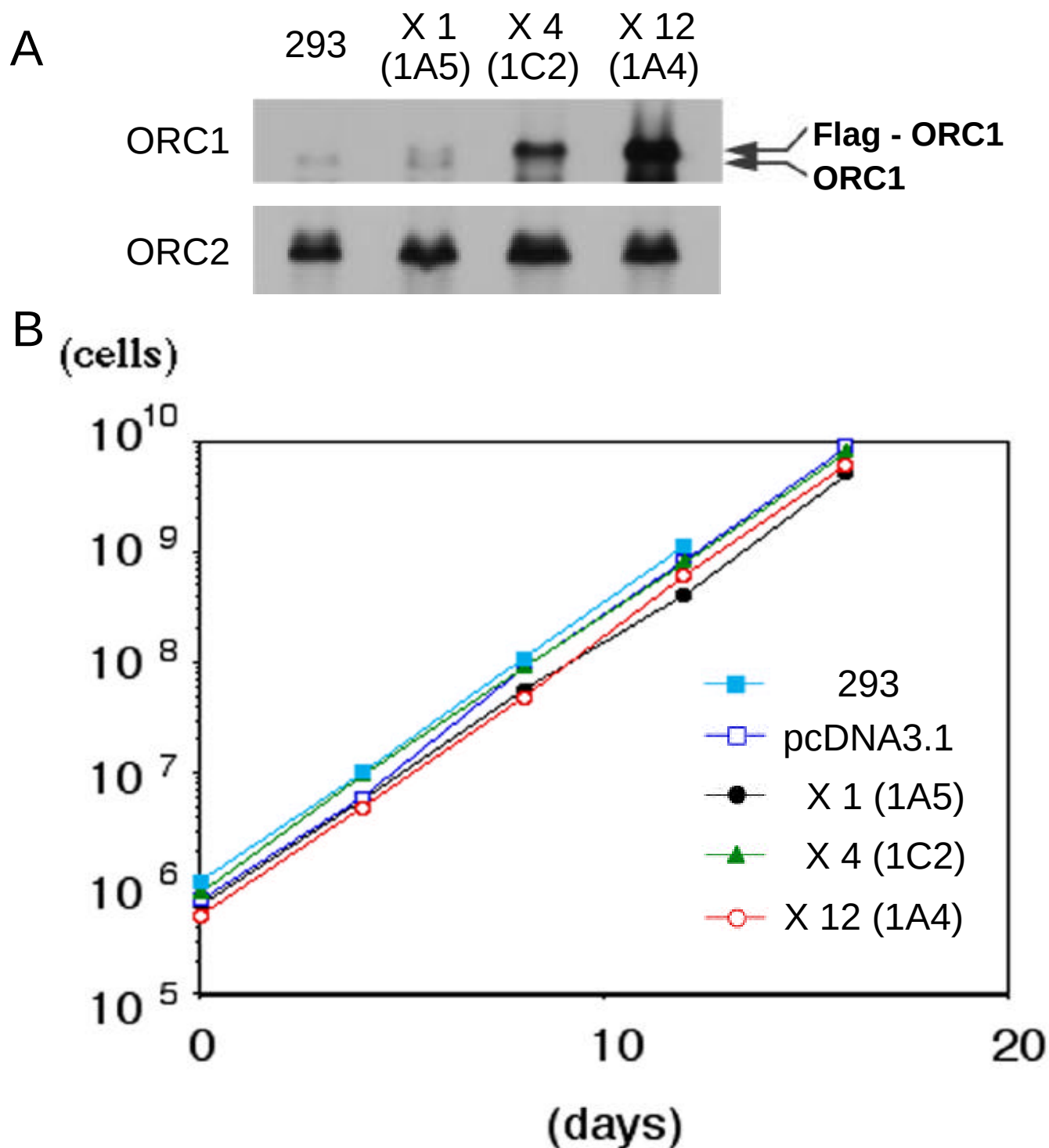
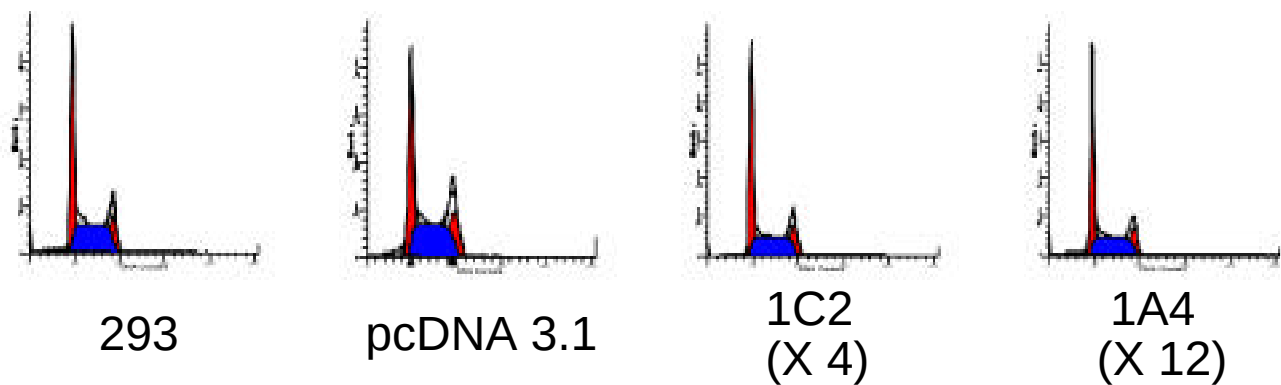


図5-1 FLAG-ORC1過剰発現293細胞株の作成およびそれらの増殖速度

A：FLAG タグを付加した全長のヒトORC1蛋白質（FLAG-ORC1）を、内在性の1倍（X 1、1A5）、4倍（X 4、1C2）、12倍（X 12、1A4）発現する293細胞株を樹立した。全細胞抽出液について#209を用いてウェスタンブロッティングを行い、内在性のORC1とFLAG-ORC1を検出した。

B：Aに示した各細胞株およびベクターのみを導入した細胞株(pcDNA 3.1)の増殖曲線を示した。

A



B

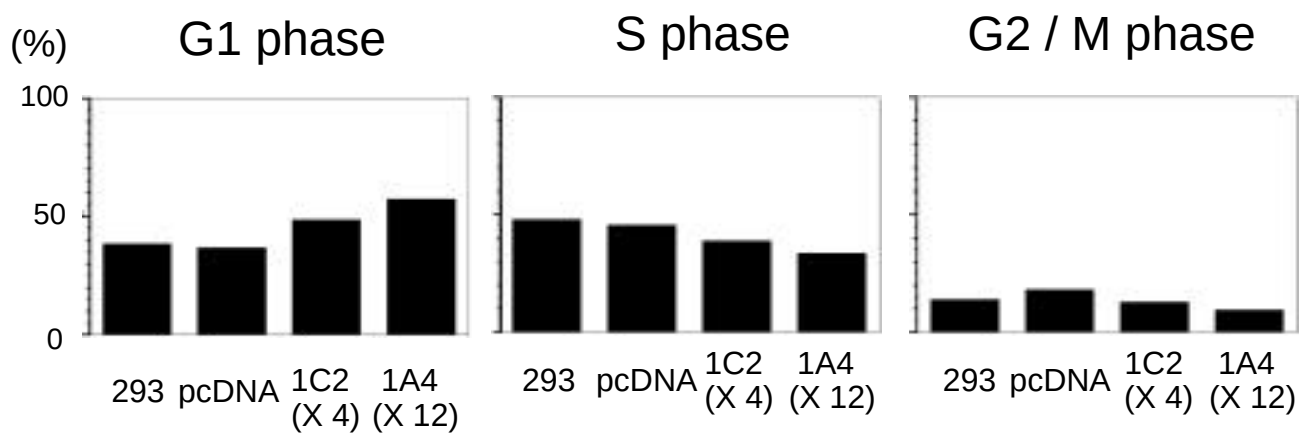


図5-2 ヒトORC1過剰発現細胞の細胞周期分布

A：非同調の293細胞、pcDNA3.1細胞株、1C2細胞（X 4）、1A4細胞（X 12）についてFACS解析後、G1期、S期、G2/M期の割合を定量した。

B：Aの定量結果を基に細胞周期分布をグラフに表した。

S 期 / G2/M 期の割合はそれぞれ 293 細胞が 38 % / 48 % / 14 % で pcDNA3.1 が 37 % / 45 % / 18 %、1C2 細胞が 48 % / 39 % / 13 %、1A4 細胞が 57 % / 34 % / 9 % であった。これらの細胞の増殖速度はほぼ同じであったことから、ORC1 の発現量に応じて G1 期が長くなり S 期が短くなる傾向があることが示された。

5-3-2 ORC1 の過剰発現と ORC2 および MCM3 の核内局在への影響

ORC1 タンパク量は G1 期に増加すると ORC の他のサブユニットと複合体を形成し、MCM をクロマチンに結合させると考えられる (Ohta et al., 2003)。図 5-2 で示したように ORC1 の過剰発現により細胞周期の進行に影響が見えたことから、このような細胞では過剰な ORC1 が ORC の他のサブユニットおよび MCM の局在に影響を与えることが予想された。そこで非同調の、1A4 細胞とベクターのみを導入した 293 細胞 (pcDNA3.1) について DNase I により分画後、抗 ORC2 抗体および抗 MCM3 抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った (図 5-3)。その結果、ORC1 を内在性の 12 倍発現する 1A4 細胞では大部分の ORC2 が DNase I 不溶画分に存在すること、また DNase I 不溶画分に分画される MCM3 の量も約 3 倍に増加することが判明した。これらは、高レベルに存在する外来性 ORC1 によりそれと複合体を形成した ORC2 や MCM3 が DNase I 耐性の核構造中に移行したことを示唆している。この結果は、ORC1 が ORC2 や MCM3 等の Pre-RC 構成因子を核構造や染色体上に集合させる足場として働いているというこれまでの考え方と一致する。

5-3-3 ORC1 の過剰発現と DNA 複製チェックポイント停止の関係

293 細胞および FLAG-ORC1 を過剰発現する 1C2 と 1A4 細胞について各濃度のチミジン存在下で 24 時間培養することにより S 期停止を誘導した (図 5-4)。細胞を回収して FACS 解析を行ったところ、0.3 mM と 0.8 mM の低濃度のチミジン存在下では、293 細胞と比べて 1C2 および 1A4 細胞は S 期の細胞の蓄積が起りにくかった。特に 0.3 mM のチミジンで処理した場合、293 細胞では大部分の細胞が S 期であったのに対して 1C2 細胞では S 期の細胞は 50% 程度となり、さらに 1A4 細胞では細胞周期分布はチミジン非存在時 (Asyn) と変わらず S 期の細胞の蓄積は認められなかった。しかし 2.5 mM と 7.5 mM といった高濃度のチミジンで処理した場合は ORC1 の発現量に関係なく各細胞は同様に S 期細胞の蓄積が見られた。したがって、ORC1 を過剰発現すると発現量に応じて DNA 複製チェックポイントによる S 期停止が働きにくくなることが考えられた。

動物細胞はチミジン等の存在下で長時間培養すると、一旦 S 期に停止した後再び細胞周期が動き出す。そこで、293 細胞および FLAG-ORC1 を内在性 ORC1 の 4 倍発現する 1C2 細胞、内在性の 12 倍発現する 1A4 細胞について 2.5 mM のチミジン存在下で長時間培養した (図 5-5)。培養開始 24、48、72、120 時間後の細胞について FACS 解析を行ったところ、24 時間目にはいずれの細胞も S 期に停止していたの

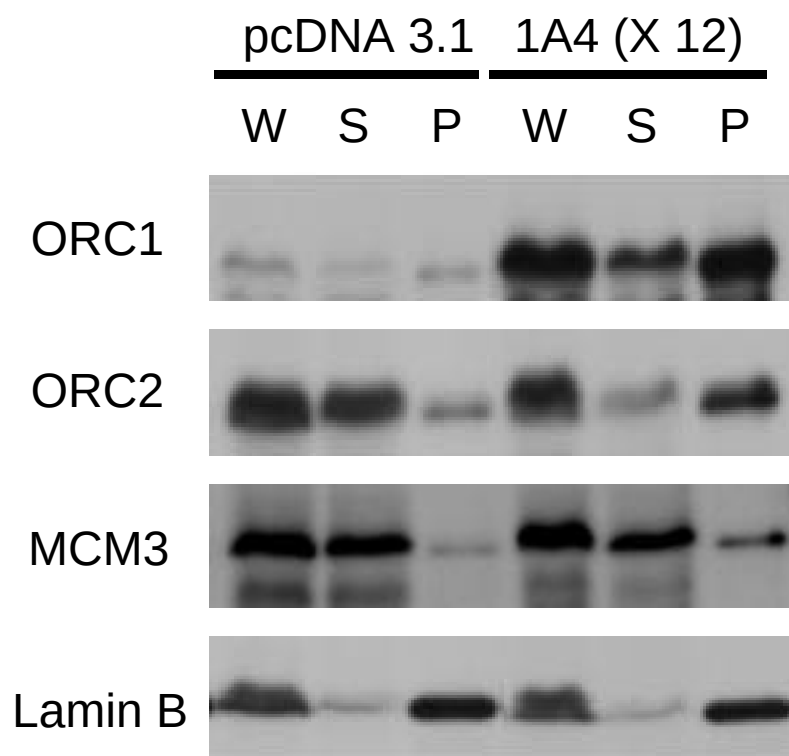


図5-3 ORC1過剰発現ヒト293細胞株のDNase I抽出

非同調のpcDNA3.1細胞および1A4細胞（X 12）をDNase Iを含む0.1 % TX-CSK緩衝液により可溶画分と不溶画分に分画した。全細胞抽出液（W）、可溶画分（S）、不溶画分（P）について#209（ORC1）およびORC2、MCM3、Lamin Bに対する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。

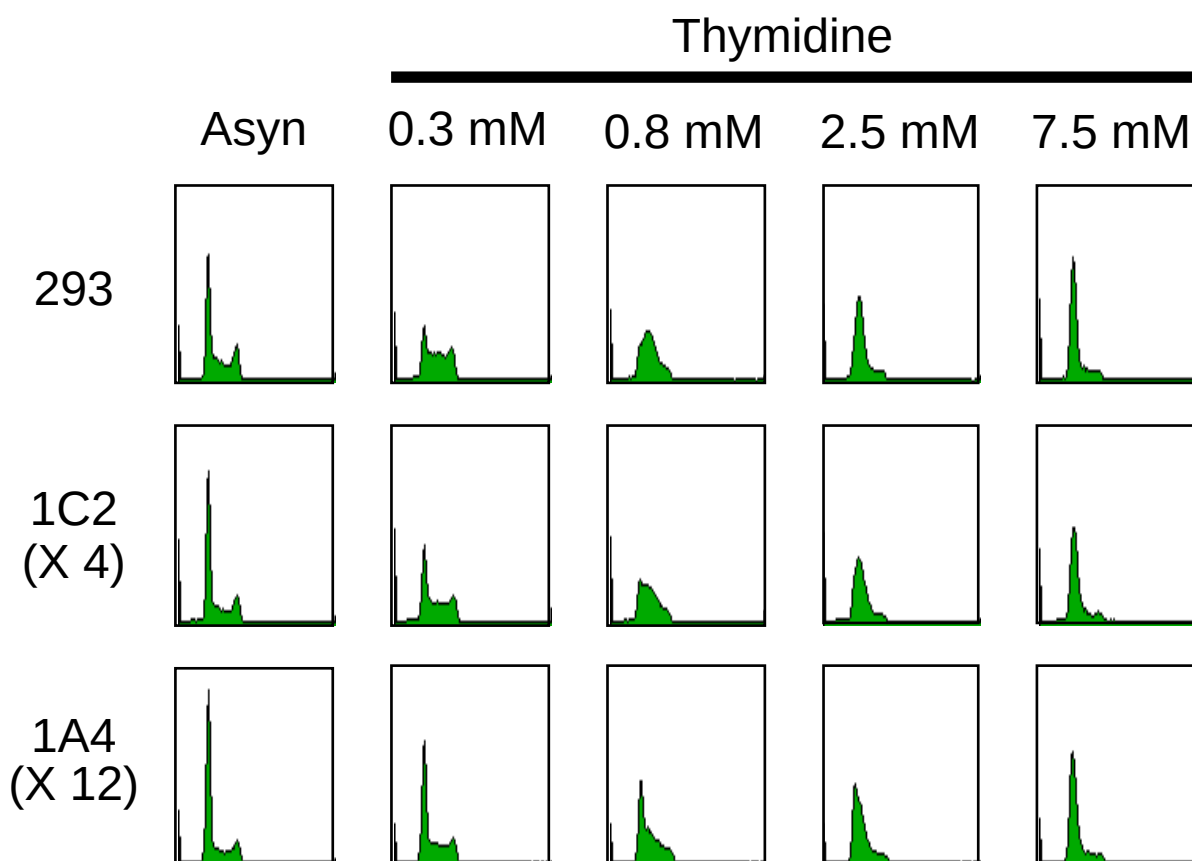


図5-4 ORC1の過剰発現とチミジンブロックによるS期停止
ヒト293細胞および、1C2細胞 (X 4)、1A4細胞 (X 12) について、0 mM、0.3 mM、0.8 mM、2.5 mM、7.5 mMのチミジン存在下で24時間培養後、FACS解析を行った。

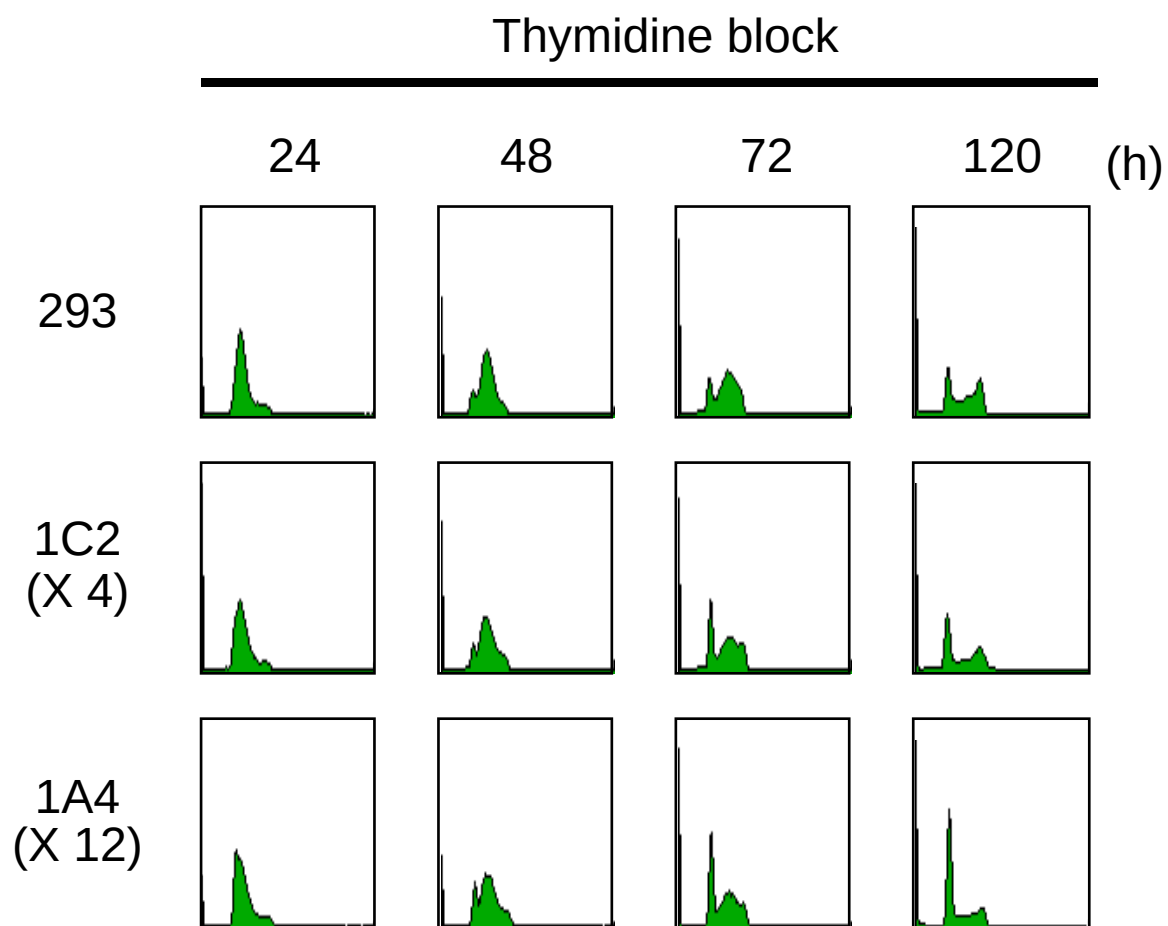


図5-5 ORC1の過剰発現とチミジンブロックによるS期停止からの回復
ヒト293細胞および、1C2細胞 (X 4)、1A4細胞 (X 12) について、2.5 mMのチミジン存在下で24、48、72、120時間培養後、FACS解析を行った。

に対して 48 時間以降ではいずれにおいても次の G1 期のピークが見え始め、S 期停止からのリリースが観察された。さらに G1 期が出現する時間は、ORC1 の発現量に比例して早くなり、特に 1A4 細胞では 120 時間後には非同調と変わらない細胞周期分布を示した。したがって ORC1 が過剰発現すると発現量に応じて DNA 複製チェックポイント活性化による複製停止からの回復が早くなることが明らかとなった。以上の結果より、ヒト ORC1 は複製開始に正に働き、それが過剰に存在するとチェックポイント応答が誘導されても S 期停止が起こりにくくなることが示された。言い換えれば、S 期のチェックポイント応答時には細胞内の ORC1 量は一定レベル以下に抑えられていなければ正常な応答が働かないことが示唆された。

5-4 考察

5-4-1 ORC1 過剰発現と DNA 複製制御

本研究等からヒト ORC1 は G1 期に蓄積して複製開始点の目印として働き、ORC2-5 と核構造中で複合体を形成して MCM をクロマチンに結合させることが明らかとなった (Ohta et al., 2003)。このことから ORC1 の過剰発現は DNA 複製を促進し、過剰複製につながるということが予想された。実際、ORC1 を 12 倍過剰発現する細胞では ORC2 の大部分が ORC1 と共に核構造に局在しており、細胞内の ORC2-5 の大部分が ORC1 と複合体を形成して MCM ローディングを促進していることが考えられた。しかし ORC1 の過剰発現だけでは MCM のクロマチンへの結合が劇的には増加せず過剰複製も見られなかった。実際、酵母や線虫においては CDT1 や CDC6 の過剰発現が MCM のクロマチン結合を促進して過剰複製を起こし得るという報告があるが (Nishitani et al., 2000、Zhong et al., 2003、Nishitani and Nurse, 1995)、動物細胞では特定の複製開始因子の過剰発現だけで過剰複製するという報告は無い。これは CDK や、CDT1 の活性阻害因子の *geminin* (Wohlschlegel et al., 2000、Tada et al., 2001、Madine and Laskey, 2001) が複数の経路を通じて再複製を抑制している為であると思われる。

一方で、分裂酵母にヒト ORC1 を過剰発現すると過剰複製するという報告がある。しかしこの場合ヒト ORC1 は分裂酵母の温度感受性変異を機能的に相補できないことから、過剰発現したヒト ORC1 が過剰複製活性を持つというよりはむしろ、ヒト ORC1 が酵母の CDK 活性を titrate した結果であると考えられている (Wolf et al., 1996)。同様の CDK 活性の低下が過剰複製につながる例は他の生物種でも報告されている。ショウジョウバエの培養細胞で cyclin A を欠損させると過剰複製が起こること (Mihaylov et al., 2002)、動物細胞においても CDK1 の活性を抑えるだけで過剰複製することが知られ (Itzhaki et al., 1997、Fujita et al., 1998)、再複製の防止における S 期 CDK 活性の重要性が示唆されている。さらに種々の真核生物において MCM ローダーである ORC サブユニットや CDC6、CDT1 は、共に CDK の基質となることが明らかとなっている (Mendez et al., 2002、Jallepalli et al., 1997、Li et al., 2003)。したがって CDC6 や CDT1 を過剰発現した場合に観察される過剰複製は、これらの因子が単に再複製の防止に必要な CDK 活性を奪った結果であるという考え方もできる。ヒト ORC1 も細胞内で cyclin A/CDK と結合することから (Mendez et al., 2002)、過剰発現により同様の効果が期待できた。しかし 293 細胞や HeLa 細胞で ORC1 を最高 12 倍過剰発現しても過剰複製は見られなかった。したがって細胞内の CDK 活性を titrate するためには ORC1 がこれ以上に過剰発現する必要があるのかもしれない。しかし過剰発現株を単離するという実験手法では、過剰複製が起きた場合には細胞株として樹立するのが困難となることが考えられ、この発現レベルが実験手法上の上限であった可能性もある。

5-4-3 ORC1 量の制御と複製開始

哺乳動物細胞では細胞あたり約 10^4 個の複製開始点が存在するといわれており (Walton et al., 1992)、出芽酵母と同様に、動物細胞でも複製開始点とほぼ同じ分子数(約 10^4 個)の ORC サブユニットが存在することが報告されている (Natale et al., 2000, Kreitz et al., 2001, Ohta et al., 2003)。ORC2-5 は G1 期に一過的に蓄積した ORC1 と複合体を形成して核構造へと局在を変えるが、HeLa 細胞では ORC1 量が最大となる G1 後期に ORC2 の核構造への局在も最大となり、約半数の ORC2 が核構造へ局在する (Ohta et al., 2003)。つまりヒト細胞では G1 期に増加した ORC1 と ORC2 の約半数が Pre-RC を形成し、それが結合した DNA が複製開始点として活性化することが考えられる。したがって ORC1 を 12 倍過剰発現する細胞株では ORC2 の大部分が DNase I 耐性の核構造と相互作用したことから、この細胞株ではより多くの複製開始点が活性化される可能性が考えられた。またこれらの細胞株の解析から、ORC1 の過剰発現による S 期の短縮および G1 期の伸長という表現型が現れることが示された。前者は複製開始点の増加を反映した可能性が考えられ、後者は ORC1 の減少が複製開始誘導につながるという前章の考えを取り入れると、ORC1 の過剰発現によりその G1/S 期での分解が遅れ、S 期誘導が遅延して G1 期が長くなることで説明できる。

5-4-4 ORC1 量の制御と S 期チェックポイント

前章で、細胞内 ORC1 タンパク質の S 期での分解は S 期チェックポイントと無関係であることを示した。また ORC1 過剰発現してもチェックポイントは活性化しないことも明らかにしている (結果不掲載)。したがって、ヒト ORC1 はチェックポイントシグナルの上流にも下流にも位置しないことが考えられた。その一方で ORC1 が過剰に発現すると S 期チェックポイントによる細胞周期の停止が起りにくくなることが明らかとなった。これは ORC1 を過剰発現する細胞において活性化される複製開始点の数が増加することによって説明できる。S 期チェックポイントによって DNA 複製が阻害されると、停止した複製フォークが安定化されると同時に複製を開始していない後期複製開始点の活性化は抑制される (Shirahige et al., 1998, Lopes et al., 2001, Tercero and Diffley, 2001)。しかし ORC1 が過剰発現した細胞では、複製開始点の数が増加することにより、この S 期チェックポイントによる抑制がかかりにくくなっているのかもしれない。このように DNA 損傷等で S 期チェックポイント制御が発動した場合に、その制御を乗り越えることは染色体の安定性維持に重大な問題を生じる。この観点からヒト ORC1 の量的制御は、チェックポイントシグナルの上流に位置し、細胞が正常な S 期チェックポイント応答を誘導する上で重要な要素であると考えられる。

第 6 章

まとめ

ヒト ORC1 タンパク質は G1 初期から G1 後期にかけて核内に蓄積し、大小 500 個以上のドットとして局在する。さらに、DNA 複製を開始した細胞では複製の進行とともに大部分のドットのシグナル強度は低下する。また、S 期の細胞において ORC1 のシグナルは BrdU のシグナルとは重ならないこと、細胞周期依存的な ORC1 量の減少は DNA 複製時に生じる MCM のクロマチンからの解離を伴わなくても観察されることから、ORC1 の分解は DNA 複製開始と共役しているが複製開始反応には必須でない可能性が考えられる。このような細胞周期依存的な ORC1 量の変動は構成的に発現させた ORC1 でも見られたことから、主にタンパク分解系により制御されていると考えられる。以上の、ヒト細胞の ORC1 に見られる細胞周期依存的な量的変動は、ORC サブユニットの分子集合、核内局在、さらには複製開始制御の中心的な役割を持つと考えられ、「ORC1 サイクル」と名付けた (図 6-1)。その機構として S 期 CDK が ORC1 をリン酸化し、それによりタンパク分解に導かれることが最近提唱されており、この考えは上記の我々の所見と一致するものの、結論に至るには更なる検討が必要である。

本研究の結果および共同研究者の太田らの結果等を考え併せると、ヒト ORC1 は染色体に結合し ORC2-5 や MCM などの複製開始因子を集合させるための足場として働くと考えられる。ORC1 は DNase I 耐性の核構造中でドット状の局在性を示したことから、複製開始因子の集合により形成される Pre-RC は DNase I 耐性の核構造中に形成されることが考えられ、非常に興味深い。逆に言えば、S 期に ORC1 が分解されることは Pre-RC の再形成が防止されるということであり、結果としてヒト細胞における再複製の防止機構の一つとして機能することが考えられる。

ウエスタンブロッティングによる解析から、ORC1 タンパク質は S 期以降速やかに分解され G1 後期の ORC1 量の 1/10 程度にまで減少することが示された。一方で細胞染色の結果、S 期後期の細胞においても依然として核内に数個のドットの存在が認められた。このように分解されずに残った一部の ORC1 は S 期以降には DNA 複製開始以外の機能を持つ可能性が考えられる。近年ヒト ORC1 は、ヒストンアセチル化酵素活性を持つ Histone acetyltransferase Binding to ORC1 (HBO1) (Iizuka and Stillman, 1999) やヘテロクロマチンの構築に関与する HP1 と相互作用することが報告されており、クロマチン構造への関与が示唆されている。したがってヒト ORC1 は、複製開始点に結合して Pre-RC の形成を制御するだけでなく遺伝子発現制御やクロマチン構造維持等、染色体上で起こる様々な機能制御の足場としても働く可能性が考えられる。実際、ヒト ORC6 はセントロメア領域に局在し、動原体の機能に関

与することが報告されている (Prasanth et al., 2002)。しかし、組み換えタンパク質を用いた ORC 複合体の再構成実験から ORC1-5 と ORC6 との相互作用は非常に弱いことが報告されており (Vashee et al., 2001)、また我々の解析から、ヒト細胞抽出液中では ORC1-6 を含む安定な複合体の存在は示されなかった (Ohta et al., 2003)。現在のところ、ORC6 を含むヒト ORC 複合体は、複製開始を正に制御するというよりはむしろ M 期が完了するまで Pre-RC の再形成を阻害する働きを持つのではないかと考えられているが (Prasanth et al., 2002)、ORC1-6 複合体の存在およびその機能については依然として不明な点が多く、G2/M 期における ORC の機能を明らかにする上で非常に重要であると考えられる。

ORC1 の過剰発現により、G1 期が伸び S 期が短縮される傾向が認められたものの、細胞増殖および細胞周期に大きな影響は認められなかった。これは、CDK が複数の経路で DNA 複製の細胞周期制御を行う為、その一つの経路の欠損だけでは大きな影響がないと考えられる。しかし、ORC1 の過剰発現により、複製チェックポイント活性化による S 期停止の誘導が阻害されることから、ORC1 の分解は S 期チェックポイント応答にも重要な役割を持つと思われる。その分子機構を解明するためには今後の更なる検討が必要であるが、これらの結果は ORC1 サイクルの破綻が染色体不安定性さらには細胞のがん化に結びつく可能性を示唆しており、その研究はきわめて重要であると考えられる。

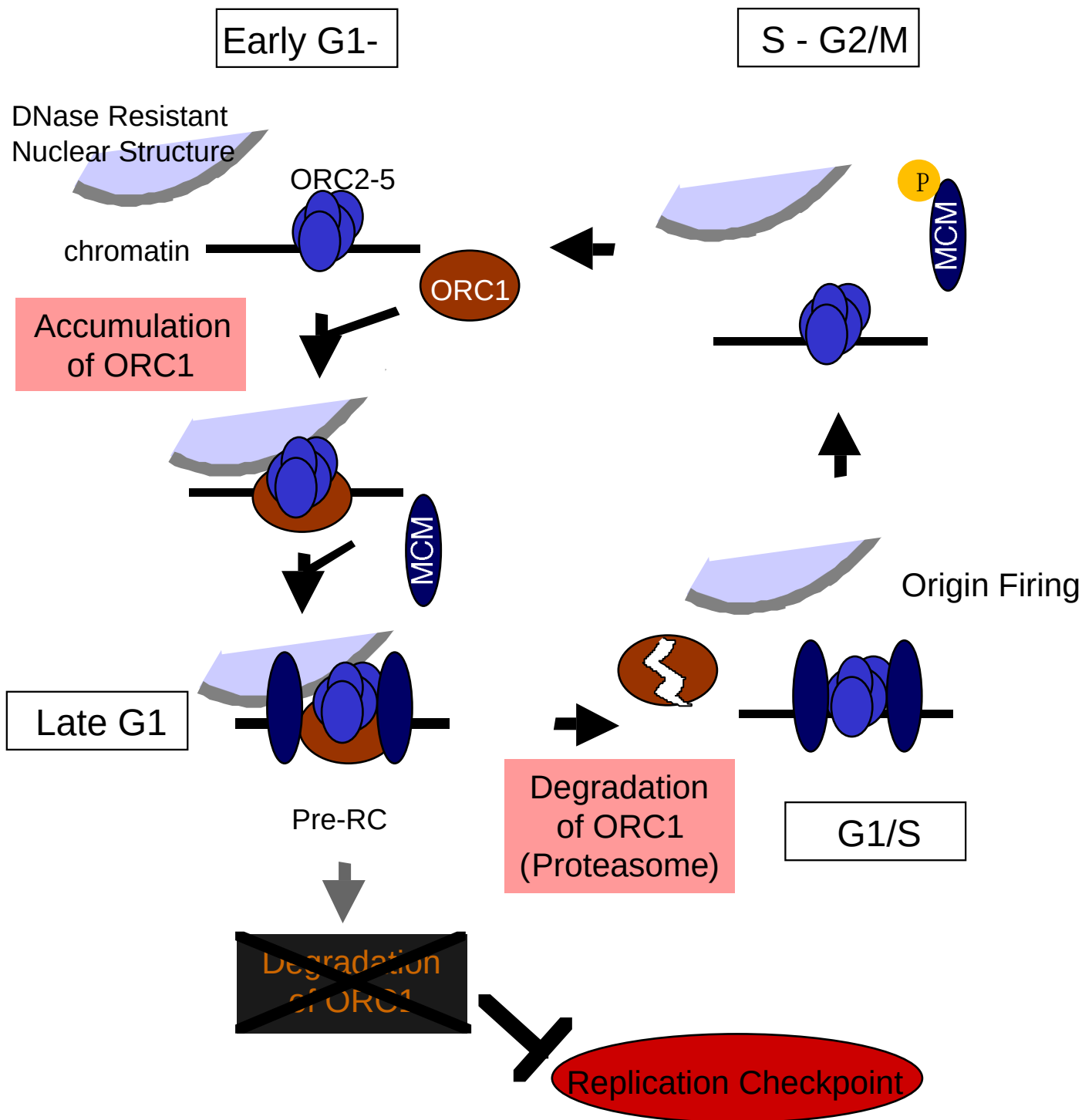


図6-1 ヒトORC1サイクル

ORC2-5は細胞周期を通じて染色体DNA (chromatin) に結合している。G1期初期 (Early G1) から後期 (Late G1) にかけて発現したORC1は、DNase I耐性の核構造 (DNase Resistant Nuclear Structure) に局在すると共にORC2-5と複合体を形成する。その結果、ORC1-5複合体がDNase I耐性の核構造上に形成される。続いてMCMがORC依存的にクロマチン上に移行する。G1/S期以降、ORC1は複製開始 (Origin Firing) に伴って、26Sプロテアソーム経路により分解され、ORC2-5複合体は核構造上から離れる。続いて、MCMも複製の進行とともにリン酸化されてクロマチンから解離する (S-G2/M)。

一方で、S期にORC1が分解されないとDNA複製チェックポイント (Replication Checkpoint) によるS期停止が阻害される。

謝辞

本研究を行うにあたり、数々のご助言を賜りました加藤順也教授に深く感謝いたします。

また、様々なご指導をいただきました白髭克彦助手、加藤規子助手に感謝いたします。

さらに、抗体を譲与していただいたハーバード大学の Anindya Dutta 博士、抗体の譲与および共焦点顕微鏡のご指導をいただいた京都大学の木村宏博士、そして有益なご助言をいただいた国立がんセンター研究所の藤田雅俊博士と清野透博士に感謝いたします。

そして、本研究のため直接ご指導をいただき多大なご助力をいただきました吉川寛名誉教授、釣本敏樹・現九州大学教授、特に 6 年の間多岐にわたりサポートしていただいた小布施力史・現京都大学助教授に心から感謝の意を表します。

最後に、いろいろお世話になった動物分子遺伝学講座の皆様、特にマイナスからの再出発だった本研究を遂行し論文としてまとめるまでの過程において様々な面で多大なる協力をいただいた共同研究者の太田聡博士（現 Dept. Molecular Pharmacology, St. Jude Children's Research Hospital）に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- Asano, M., Wharton, R. P.: E2F mediates developmental and cell cycle regulation of ORC1 in *Drosophila*. (1999) *EMBO J.* **18**, 2435-2448.
- Aparicio, O. M., Weinstein, D. M., Bell, S. P.: Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. (1997) *Cell* **91**, 59-69.
- Araki, M., Wharton, R. P., Tang, Z., Yu, H., Asano, M.: Degradation of origin recognition complex large subunit by the anaphase-promoting complex in *Drosophila*. (2003) *EMBO J.* **22**, 6115-6126.
- Bell, S. P., and Stillman, B.: ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. (1992) *Nature* **357**, 128-134.
- Bell, S. P., Mitchell, J., Leber, J., Kobayashi, R., Stillman, B.: The multidomain structure of Orc1p reveals similarity to regulators of DNA replication and transcriptional silencing. (1995) *Cell* **83**, 563-568.
- Bell, S. P.: The origin recognition complex: from simple origins to complex functions. (2002) *Genes Dev.* **16**, 659-672.
- Bell, S. P., Dutta, A.: DNA replication in eukaryotic cells. (2002) *Annu Rev Biochem.* **71**, 333-374.
- Bogan, J. A., Natale, D. A., Depamphilis, M. L.: Initiation of eukaryotic DNA replication: conservative or liberal? (2000) *J. Cell Physiol.* **184**, 139-150.
- Callebaut, I., Courvalin, J. C., Mornon, J. P.: The BAH (bromo-adjacent homology) domain: a link between DNA methylation, replication and transcriptional regulation. (1999) *FEBS Lett.* **446**, 189-193.
- Carpenter, P. B., Mueller, P. R., Dunphy, W. G.: Role for a *Xenopus* Orc2-related protein in controlling DNA replication. (1996) *Nature* **379**, 357-360.

Chaudhuri, B., Xu, H., Todorov, I., Dutta, A., Yates, J. L.: Human DNA replication initiation factors, ORC and MCM, associate with oriP of Epstein-Barr virus. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 10085-10089.

Chesnokov, I., Remus, D., Botchan, M.: Functional analysis of mutant and wild-type *Drosophila* origin recognition complex. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11997-12002.

Delmolino, L. M., Saha, P., Dutta, A.: Multiple mechanisms regulate subcellular localization of human CDC6. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 26947-26954.

Depamphilis, M. L.: The “ORC Cycle”: A novel pathway for regulating eukaryotic DNA replication. (2003) *Gene* **22**, 1-15.

Dhar, S. K., Dutta, A.: Identification and characterization of the human ORC6 homolog. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34983-34988.

Dhar, S. K., Delmolino, L., Dutta, A.: Architecture of the human origin recognition complex. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 29067-29071.

Diffley, J. F., and Cocker, J. H.: Protein-DNA interactions at a yeast replication origin. (1992) *Nature* **357**, 169-172.

Diffley, J. F., Cocker, J. H., Dowell, S. J., Rowley, A.: Two steps in the assembly of complexes at yeast replication origins in vivo. (1994) *Cell* **78**, 303-316.

Donovan, S., Diffley, J. F.: Replication origins in eukaryotes. (1996) *Curr. Opin. Genet. Dev.* **6**, 203-207.

Donovan, S., Harwood, J., Drury, L. S., Diffley, J. F.: Cdc6p-dependent loading of Mcm proteins onto pre-replicative chromatin in budding yeast. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5611-5616.

Drury, L. S., Perkins, G., Diffley, J. F.: The Cdc4/34/53 pathway targets Cdc6p for proteolysis in budding yeast. (1997) *EMBO J.* **16**, 5966-5976.

Dulic, V., Lees, E., Reed, S. I.: Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase

protein kinase. (1992) *Science* **257**, 1958-1961.

Elsasser, S., Chi, Y., Yang, P., Campbell, J. L.: Phosphorylation controls timing of Cdc6p destruction: A biochemical analysis. (1999) *Mol. Biol. Cell* **10**, 3263-3277.

Fujita, M., Hori, Y., Shirahige, K., Tsurimoto, T., Yoshikawa, H., Obuse, C.: Cell cycle dependent topological changes of chromosomal replication origins in *Saccharomyces cerevisiae*. (1998) *Genes Cells* **3**, 737-749.

Fujita, M., Yamada, C., Tsurumi, T., Hanaoka, F., Matsuzawa, K., Inagaki, M.: Cell cycle- and chromatin binding state-dependent phosphorylation of human MCM heterohexameric complexes. A role for cdc2 kinase. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 17095-17101.

Fujita, M., Yamada, C., Goto, H., Yokoyama, N., Kuzushima, K., Inagaki, M., Tsurumi, T.: Cell cycle regulation of human CDC6 protein. Intracellular localization, interaction with the human mcm complex, and CDC2 kinase-mediated hyperphosphorylation. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25927-25932.

Fujita, M., Ishimi, Y., Nakamura, H., Kiyono, T., Tsurumi, T.: Nuclear organization of DNA replication initiation proteins in mammalian cells. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 10354-10361.

Gavin, K. A., Hidaka, M., Stillman, B.: Conserved initiator proteins in eukaryotes. (1995) *Science* **270**, 1667-1671.

Hendrickson, M., Madine, M., Dalton, S., Gautier, J.: Phosphorylation of MCM4 by cdc2 protein kinase inhibits the activity of the minichromosome maintenance complex. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**, 12223-12228.

Hua, X. H., Newport, J.: Identification of a preinitiation step in DNA replication that is independent of origin recognition complex and cdc6, but dependent on cdk2. (1998) *J. Cell Biol.* **140**, 271-281

Ishiai, M., Dean, F. B., Okumura, K., Abe, M., Moon, K. Y., Amin, A. A., Kagotani, K., Taguchi, H., Murakami, Y., Hanaoka, F., O'Donnell, M., Hurwitz, J., Eki, T.: Isolation of human and fission yeast homologues of the budding yeast origin recognition complex subunit ORC5: human homologue (ORC5L) maps to 7q22. (1997) *Genomics* **46**, 294-298.

Ishimi, Y.: A DNA helicase activity is associated with an MCM4, -6, and -7 protein complex. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 24508-24513.

Itzhaki, J. E., Gilbert, C. S., Porter, A. C.: Construction by gene targeting in human cells of a "conditional" CDC2 mutant that rereplicates its DNA. (1997) *Nat. Genet.* **15**, 258-265.

Jallepalli, P. V., Brown, G. W., Muzi-Falconi, M., Tien, D., Kelly, T. J.: Regulation of the replication initiator protein p65cdc18 by CDK phosphorylation. (1997) *Genes Dev.* **11**, 2767-2779.

Kimura, H., Nozaki, N., Sugimoto, K.: DNA polymerase alpha associated protein P1, a murine homolog of yeast MCM3, changes its intranuclear distribution during the DNA synthetic period. (1994) *EMBO J.* **13**, 4311-4320.

Klemm, R. D., Austin, R. J., Bell, S. P.: Coordinate binding of ATP and origin DNA regulates the ATPase activity of the origin recognition complex. (1997) *Cell* **88**, 493-502.

Kong, D., and DePamphilis, M. L.: Site-specific DNA binding of the *Schizosaccharomyces pombe* origin recognition complex is determined by the Orc4 subunit. (2001) *Mol. Cell Biol.* **21**, 8095-8103.

Kreitz, S., Ritzi, M., Baack, M., Knippers, R.: The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. (2001) *J Biol Chem.* **276**, 6337-6342.

Labib, K., Tercero, J. A., Diffley, J. F.: Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. (2000) *Science* **288**, 1643-1647.

Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. (1970) *Nature* **227**, 680-685.

Lee, J. K., Hurwitz, J.: Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of *Schizosaccharomyces pombe*. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 18871-18878.

Li, C. J., DePamphilis, M. L.: Mammalian Orc1 protein is selectively released from chromatin and ubiquitinated during the S-to-M transition in the cell division cycle. (2002) *Mol. Cell Biol.*

22, 105-116.

Li, J. J., and Herskowitz, I.: Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. (1993) *Science* **262**, 1870-1874.

Liang, C., and Stillman, B.: Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. (1997) *Genes Dev.* **11**, 3375-3386.

Loo, S., Fox, C. A., Rine, J., Kobayashi, R., Stillman, B., Bell, S.: The origin recognition complex in silencing, cell cycle progression, and DNA replication. (1995) *Mol Biol Cell* **6**, 741-756.

Lopes, M., Cotta-Ramusino, C., Pelliccioli, A., Liberi, G., Plevani, P., Muzi-Falconi, M., Newlon, C. S., Foiani, M.: The DNA replication checkpoint response stabilizes stalled replication forks. (2001) *Nature* **412**, 557-561.

Lygerou, Z., and Nurse, P.: The fission yeast origin recognition complex is constitutively associated with chromatin and is differentially modified through the cell cycle. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 3703-12.

Madine, M. and Laskey, R.: Geminin bans replication licence. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 49-50.

Mahbubani, H. M., Chong, J. P., Chevalier, S., Thommes, P., Blow, J. J.: Cell cycle regulation of the replication licensing system: involvement of a Cdk-dependent inhibitor. (1997) *J. Cell Biol.* **136**, 125-135.

Mendez, J., Zou-Yang, X. H., Kim, S. Y., Hidaka, M., Tansey, W. P., Stillman, B.: Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication. (2002) *Mol. Cell* **9**, 481-491.

Micklem, G., Rowley, A., Harwood, J., Nasmyth, K., Diffley, J. F.: Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. (1993) *Nature* **366**, 87-89.

Mihaylov, I. S., Kondo, T., Jones, L., Ryzhikov, S., Tanaka, J., Zheng, J., Higa, L. A., Minamino, N., Cooley, L., Zhang, H.: Control of DNA replication and chromosome ploidy by geminin and cyclin A. (2002) *Mol. Cell Biol.* **22**, 1868-1880.

Natale, D. A., Li, C. J., Sun, W. H., DePamphilis, M. L.: Selective instability of Orc1 protein accounts for the absence of functional origin recognition complexes during the M-G(1) transition in mammals. (2000) *EMBO J.* **19**, 2728-2738.

Nguyen, V. Q., Co, C., Li, J. J.: Cyclin-dependent kinases prevent DNA re-replication through multiple mechanisms. (2001) *Nature* **411**, 1068-1073.

Nishitani, H., Nurse, P.: p65cdc18 plays a major role controlling the initiation of DNA replication in fission yeast. (1995) *Cell* **83**, 397-405.

Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T., Nurse, P.: The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. (2000) *Nature* **404**, 625-628.

Ohta, S., Tatsumi, Y., Fujita, M., Tsurimoto, T., Obuse, C.: The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 41535-41540.

Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D. R., Kelly, T. J., Nevins, J. R.: Expression of the HsOrc1 gene, a human ORC1 homolog, is regulated by cell proliferation via the E2F transcription factor. (1996) *Mol. Cell Biol.* **16**, 6977-6984.

Okuno, Y., McNairn, A. J., den Elzen, N., Pines, J., Gilbert, D. M.: Stability, chromatin association and functional activity of mammalian pre-replication complex proteins during the cell cycle. (2001) *EMBO J.* **20**, 4263-4277.

Ortega, J. M., DePamphilis, M. L.: Nucleoskeleton and initiation of DNA replication in metazoan cells. (1998) *J. Cell Sci.* **111**, 3663-3673.

Pak, D. T., Pflumm, M., Chesnokov, I., Huang, D. W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P., Botchan, M. R.: Association of the origin recognition complex with heterochromatin and HP1 in higher eukaryotes. (1997) *Cell* **91**, 311-323.

Pelizon, C., Diviacco, S., Falaschi, A., Giacca, M.: High-resolution mapping of the origin of DNA replication in the hamster dihydrofolate reductase gene domain by competitive PCR. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5358-5364.

Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J., Helin, K.: Phosphorylation of mammalian CDC6 by cyclin A/CDK2 regulates its subcellular localization. (1999) *EMBO J.* **18**, 396-410.

Petersen, B. O., Wagener, C., Marinoni, F., Kramer, E. R., Melixetian, M., Denchi, E. L., Gieffers, C., Matteucci, C., Peters, J. M., Helin, K.: Cell cycle- and cell growth-regulated proteolysis of mammalian CDC6 is dependent on APC-CDH1. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2330-2343.

Pinto, S., Quintana, D. G., Smith, P., Mihalek, R. M., Hou, Z. H., Boynton, S., Jones, C. J., Hendricks, M., Velinzon, K., Wohlschlegel, J. A., Austin, R. J., Lane, W. S., Tully, T., Dutta, A.: latheo encodes a subunit of the origin recognition complex and disrupts neuronal proliferation and adult olfactory memory when mutant. (1999) *Neuron* **23**, 45-54.

Poloumienko, A., Dershowitz, A., De J., Newlon, C. S.: Links Completion of replication map of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome III. (2001) *Mol. Biol. Cell.* **12**, 3317-3327.

Quintana, D. G., Hou, Zh., Thome, K. C., Hendricks, M., Saha, P., Dutta, A.: Identification of HsORC4, a member of the human origin of replication recognition complex. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28247-28251.

Quintana, D. G., Thome, K. C., Hou, Z. H., Ligon, A. H., Morton, C. C., Dutta, A.: ORC5L, a new member of the human origin recognition complex, is deleted in uterine leiomyomas and malignant myeloid diseases. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 27137-27145.

Romanowski, P., Madine, M. A., Rowles, A., Blow, J. J., Laskey, R. A.: The *Xenopus* origin recognition complex is essential for DNA replication and MCM binding to chromatin. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 1416-1425.

Romanowski, P., Marr, J., Madine, M. A., Rowles, A., Blow, J. J., Gautier, J., Laskey, R. A.: Interaction of *Xenopus* Cdc2 x cyclin A1 with the origin recognition complex. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 4239-4243.

Rowles, A., Chong, J. P., Brown, L., Howell, M., Evan, G. I., Blow, J. J.: Interaction between the origin recognition complex and the replication licensing system in *Xenopus*. (1996) *Cell* **87**, 287-296.

Rowley, A., Cocker, J. H., Harwood, J., Diffley, J. F.: Initiation complex assembly at budding yeast replication origins begins with the recognition of a bipartite sequence by limiting amounts of the initiator, ORC. (1995) *EMBO J.* **14**, 2631-2641.

Saha, P., Chen, J., Thome, K. C., Lawlis, S. J., Hou, Z. H., Hendricks, M., Parvin, J. D., Dutta, A.: Human CDC6/Cdc18 associates with Orc1 and cyclin-cdk and is selectively eliminated from the nucleus at the onset of S phase. (1998) *Mol Cell Biol.* **18**, 2758-2767.

Schepers, A., Ritzi, M., Bousset, K., Kremmer, E., Yates, J. L., Harwood, J., Diffley, J. F., Hammerschmidt, W.: Human origin recognition complex binds to the region of the latent origin of DNA replication of Epstein-Barr virus. (2001) *EMBO J.* **20**, 4588-4602.

Shirahige, K., Hori, Y., Shiraishi, K., Yamashita, M., Takahashi, K., Obuse, C., Tsurimoto, T., Yoshikawa, H.: Regulation of DNA-replication origins during cell-cycle progression. (1998) *Nature* **395**, 618-621.

Stillman, B. and Gluzman, Y.: Replication and supercoiling of simian virus 40 DNA in cell extracts from human cells. (1985) *Mol. Cell. Biol.* **5**, 2051-2060.

Sun, W. H., Coleman, T. R. and DePamphilis, M. L.: Cell cycle-dependent regulation of the association between origin recognition proteins and somatic cell chromatin. (2002) *EMBO J.* **21**, 1437-1446

Tada, S., Li, A., Maiorano, D., Mechali, M., Blow, J. J.: Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 107-113.

Tadokoro, R., Fujita, M., Miura, H., Shirahige, K., Yoshikawa, H., Tsurimoto, T., Obuse, C.: Scheduled conversion of replication complex architecture at replication origins of *Saccharomyces cerevisiae* during the cell cycle. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 15881-15889.

Tanaka, T., Knapp, D., and Nasmyth, K.: Loading of an Mcm protein onto DNA replication origins is regulated by Cdc6p and CDKs. (1997) *Cell* **90**, 649-660

Tatsumi, Y., Tsurimoto, T., Shirahige, K., Yoshikawa, H., Obuse, C.: Association of human origin recognition complex 1 with chromatin DNA and nuclease-resistant nuclear structures. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5904-5910.

- Tatsumi, Y., Ohta, S., Kimura, H., Tsurimoto, T., Obuse, C.: The ORC1 cycle in human cells: I. cell cycle-regulated oscillation of human ORC1. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 41528-41534.
- Tercero, J. A., Diffley, J. F.: Regulation of DNA replication fork progression through damaged DNA by the Mec1/Rad53 checkpoint. (2001) *Nature* **412**, 553-557.
- Thome, K. C., Dhar, S. K., Quintana, D. G., Delmolino, L., Shahsafaei, A., Dutta, A.: Subsets of human origin recognition complex (ORC) subunits are expressed in non-proliferating cells and associate with non-ORC proteins. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35233-35241.
- Triolo, T., Sternglanz, R.: Role of interactions between the origin recognition complex and SIR1 in transcriptional silencing. (1996) *Nature* **381**, 251-253.
- Tugal, T., Zou-Yang, X. H., Gavin, K., Pappin, D., Canas, B., Kobayashi, R., Hunt, T., Stillman, B.: The Orc4p and Orc5p subunits of the *Xenopus* and human origin recognition complex are related to Orc1p and Cdc6p. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32421-32429
- Vashee, S., Simancek, P., Challberg, M. D., Kelly, T. J.: Assembly of the human origin recognition complex. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 26666-26673.
- Wohlschlegel, J. A., Dwyer, B. T., Dhar, S. K., Cvetic, C., Walter, J. C., Dutta, A.: Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. (2000) *Science*. **290**, 2309-2312.
- Wolf, D. A., Wu, D., McKeon, F.: Disruption of re-replication control by overexpression of human ORC1 in fission yeast. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32503-32506.
- Yamashita, M., Hori, Y., Shinomiya, T., Obuse, C., Tsurimoto, T., Yoshikawa, H., Shirahige, K.: The efficiency and timing of initiation of replication of multiple replicons of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome VI.(1997) *Genes Cells*. **2**, 655-665.
- Zhong, W., Feng, H., Santiago, F. E., Kipreos, E. T.: CUL-4 ubiquitin ligase maintains genome stability by restraining DNA-replication licensing. (2003) *Nature* **423**, 885-889.

資料

Yasutoshi Tatsumi, Satoshi Ohta, Hiroshi Kimura, Toshiki Tsurimoto, Chikashi Obuse (2003) The ORC1 cycle in human cells: I. Cell cycle regulated oscillation of human ORC1. *J Biol Chem.* **278**, 41528-41534.

Satoshi Ohta, Yasutoshi Tatsumi, Masatoshi Fujita, Toshiki Tsurimoto, Chikashi Obuse (2003) The ORC1 cycle in human cells: II. Dynamic changes in the human ORC complex during the cell cycle *J Biol Chem.* **278**, 41535-41540.

Yasutoshi Tatsumi, Toshiki Tsurimoto, Katsuhiko Shirahige, Hiroshi Yoshikawa, Chikashi Obuse (2000) Association of human origin recognition complex 1 with chromatin DNA and nuclease-resistant nuclear structures. *J Biol Chem.* **275**, 5904-5910.

The ORC1 Cycle in Human Cells

I. CELL CYCLE-REGULATED OSCILLATION OF HUMAN ORC1*

Received for publication, July 14, 2003, and in revised form, July 31, 2003
Published, JBC Papers in Press, August 8, 2003, DOI 10.1074/jbc.M307534200

Yasutoshi Tatsumi‡§, Satoshi Ohta‡¶, Hiroshi Kimura||, Toshiki Tsurimoto‡**,
and Chikashi Obuse‡ ‡‡

From the ‡Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0101 and the ||Tokyo Medical and Dental University 1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan

Components of ORC (the origin recognition complex) are highly conserved among eukaryotes and are thought to play an essential role in the initiation of DNA replication. The level of the largest subunit of human ORC (ORC1) during the cell cycle was studied in several human cell lines with a specific antibody. In all cell lines, ORC1 levels oscillate: ORC1 starts to accumulate in mid-G₁ phase, reaches a peak at the G₁/S boundary, and decreases to a basal level in S phase. In contrast, the levels of other ORC subunits (ORCs 2–5) remain constant throughout the cell cycle. The oscillation of ORC1, or the ORC1 cycle, also occurs in cells expressing ORC1 ectopically from a constitutive promoter. Furthermore, the 26 S proteasome inhibitor MG132 blocks the decrease in ORC1, suggesting that the ORC1 cycle is mainly due to 26 S proteasome-dependent degradation. Arrest of the cell cycle in early S phase by hydroxyurea, aphidicolin, or thymidine treatment is associated with basal levels of ORC1, indicating that ORC1 proteolysis starts in early S phase and is independent of S phase progression. These observations indicate that the ORC1 cycle in human cells is highly linked with cell cycle progression, allowing the initiation of replication to be coordinated with the cell cycle and preventing origins from re-firing.

The replication of chromosomal DNA in eukaryotes is limited to once per cell division cycle. This control appears to be achieved mainly by the regulation of replication origins so that they fire only once per cell cycle. The origin recognition complex (ORC)¹ identified in budding yeast as a protein complex that

binds origins, consists of six gene products (1–5). In addition to ORC, several factors highly conserved among eukaryotes are involved in initiation (6–8). The sequential assembly of these factors on origin-ORC complexes precedes initiation, as has been shown in yeast and *Xenopus* systems. For example, mini-chromosome maintenance (MCM) proteins are loaded onto origins in the presence of ORC and CDC6, which establishes the pre-replicative complex (pre-RC) necessary for subsequent protein assembly (9–13). After origin firing, the pre-RC changes to a post-replicative form by the dissociation of MCM from the complex (12, 14, 15). These associations provide an important mechanism that 1) ensures that replication origins fire at precise times and 2) prevents re-initiation.

Budding yeast ORC is a static complex that is maintained at a constant level and remains bound to origins throughout the cell cycle (4, 5). Thus, MCM loading in yeast is mainly regulated by other factors such as cell cycle-regulated Cdc6 or CDK kinase activities (7, 8, 16). It is also known that the phosphorylation status of ORC subunits correlates with the timing of pre-RC formation, suggesting a role for ORC phosphorylation in MCM loading (16). Similar phosphorylation of ORC subunits was found in a *Xenopus* egg extract system, suggesting a conserved mechanism for the regulation of ORC functions (17, 18). Recent studies have elucidated possible mechanisms for the regulation of ORC activity in mammals. In human and hamster cells, ORC1, the largest subunit, is ubiquitinated in S phase (19–21). In human cells, ORC1 is poly-ubiquitinated by the SCF^{skp2} ubiquitin ligase complex and degraded through the 26 S proteasome pathway (19). Indeed, the cellular content of ORC1 is greatly reduced in S phase (19, 22). In hamster cells, ORC1 is only mono-ubiquitinated and may be regulated by a mechanism other than degradation (21). Indeed, the cellular ORC1 level remains constant in hamster cells (21, 23). These data suggest that the activity of mammalian ORC is regulated by ubiquitination of ORC1, but ubiquitinated ORC1 has different fates in different species or cell lines.

To elucidate the mechanisms that regulate ORC activity in mammals, and especially in humans, we determined the levels of ORC subunits in several human cell lines throughout the cell cycle. From systematic studies in which we synchronized these cells by a variety of methods, we conclude that ORC1 exhibits cell cycle-dependent oscillation, a phenomenon we have termed the ORC1 cycle. The ORC1 cycle ensures the dynamic assembly of ORC and MCM on chromatin in G₁ phase, which may correspond to the formation of the pre-RC in human cells, as demonstrated in an accompanying paper (24).

liquid chromatography-tandem mass spectrometry; FACS, fluorescence-activate cell sorting; BrdUrd, 5-bromo-2'-deoxy-uridine.

* This work was supported by grants-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Present address: National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan.

¶ Present address: Dept. Molecular Pharmacology, St. Jude Children's Research Hospital, 332 N. Lauderdale St., Memphis, TN 38105-2794.

** Present address: Dept. of Biology, School of Sciences, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan.

‡‡ To whom correspondence should be addressed: Dept. of Gene Mechanisms, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan. Tel.: 81-75-753-4207; Fax: 81-75-753-4208; E-mail: obuse@kozo.biophys.kyoto-u.ac.jp.

¹ The abbreviations used are: ORC, origin recognition complex; MCM, mini-chromosome maintenance; pre-RC, pre-replicative complex; FCS, fetal calf serum; PBS, phosphate-buffered saline; HU, hydroxyurea; DAPI, 4,6-diamidino-2-phenylindole; CMV, cytomegalovirus; Pipes, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid; TBS, Tris-buffered saline; LC/MS/MS,

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture and Synchronization—Cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal calf serum (FCS). To impose cell cycle arrest by the double-thymidine block method, HeLa S3 cells were incubated in the presence of 2.5 mM thymidine for two periods of 24 h with an intervening incubation of 12 h in the absence of thymidine. For M phase arrest, cells were subjected to the double-thymidine block procedure and then cultured in the presence of 150 ng/ml TN16 (WAKO, Japan) for 12 h. Synchronous growth following arrest was achieved by two washes with PBS and subsequent culturing without reagents. Telomerase-immortalized human retina pigment epithelial cells (TERT-RPE1 cells, Invitrogen) were synchronized by serum starvation. TERT-PRE1 cells (50% confluent) were incubated with Dulbecco's modified Eagle's medium without FCS for 84–96 h and then released from starvation by the addition of 10% FCS. Hydroxyurea (HU) was included at 2.5 mM. Synchronized growth was monitored by flow cytometry (BD Biosciences) of propidium iodide-stained cells (25), by immunoblot analysis of cyclin E and cyclin A levels, and by 5-bromo-2'-deoxy-uridine (BrdUrd) incorporation. Incorporated BrdUrd was detected using the 5-Bromo-2'-deoxyuridine Labeling and Detection Kit I (Roche Applied Science, Germany). Briefly, cells were labeled with BrdUrd for 10 min and detected using a monoclonal antibody against BrdUrd and a fluorescein-conjugated second antibody, as specified by the manufacturer. Cells were also stained with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) as described previously (25). The fluorescent signals were visualized with a Leica DMRBE and captured with Photometrics PXL.

Expression of ORC1-FLAG in Human 293 Cells—The ORC1 cDNA with a C-terminal fusion to the 3xFLAG sequence (5'-GACTACAAAG-ACCATGACGGTGATTATAAAGATCATGACATCGATTACAAGGATG-ACGATGACAAG-3') and an N-terminal fusion to an artificial Kozak sequence (5'-GCCGCCGCC-3') was inserted downstream of the CMV promoter of pcDNA3.1zeo (Invitrogen). The resulting plasmid (pcDNA-ORC1-FLAG) was transfected into 293 cells with FuGENE 6 (Roche Applied Science, Germany), and clones expressing ORC1-FLAG were obtained by selection on zeocin. A clone (1C2) expressing a level of ORC1-FLAG equivalent to the endogenous level of ORC1 was chosen for the experiments shown in Fig. 4C.

Preparation of Cell Extracts—For whole cell extracts, cells plated on dishes were washed three times with PBS, suspended in modified CSK buffer (0.1% TX-100-CSK; 100 mM NaCl, 10 mM Pipes (pH 7.0), 300 mM sucrose, 0.1% Triton X-100 (Triton), 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 2 µg/ml leupeptin), and mixed with an equal volume of 2× SDS sample buffer (100 mM Tris-Cl (pH 6.8), 200 mM dithiothreitol, 4% SDS, 0.1% bromophenol blue, and 20% glycerol). Trichloroacetic acid fixation was done as described previously (25). Proteins from HeLa S3 cells were fractionated with Triton as previously described (25).

Antibodies—Antibodies against human ORC1 (#209) and human ORC5 (#241) were generated from New Zealand White rabbits immunized with recombinant ORC1 protein fragments (amino acid residues 1–698) tagged with His₆ (5'-CACCACCACCACCAC-3') or full-length ORC5 tagged with glutathione *S*-transferase at their respective N termini. The peptides were expressed and purified from *Escherichia coli* by standard methods. To obtain monospecific antibodies, the crude antisera were affinity-purified with antigens. Anti-human ORC2 and MCM7 monoclonal antibodies, 3B7 and 4B4, were purchased from MBL (Japan), and anti-human ORC3 and ORC4 antisera were kindly provided by Dr. A. Dutta (26, 27). Rabbit anti-murine MCM3 (mMCM3) antiserum, which reacts with human MCM3, has been described previously (28). Anti-FLAG monoclonal antibody (M2) was purchased from Sigma. Immunoblotting with these antibodies was done as described previously (25).

Two-step Immunostaining with Anti-ORC1 and Anti-BrdUrd Antibodies—For the initial staining with the #209 antibody, cells on coverslips were washed with PBS three times, fixed with 1% formaldehyde in PBS for 10 min, and washed three times with PBS. The coverslips were incubated with Tris-buffered saline (TBS) containing 0.1% Triton for 10 min, washed three times with TBS containing 0.1% Tween 20 (TBS-T), incubated with #209 in TBS-T containing 10% FCS overnight at 4 °C, washed three times with TBS-T and incubated with a Cy3-conjugated secondary antibody (Zymed Laboratories Inc., reactive with rabbit IgG) at room temperature for 2 h. After three washes with TBS-T followed by one PBS wash, cells were treated with 1% formaldehyde in PBS for 10 min and washed three times with PBS. Samples were stained with the anti-BrdUrd antibody in the same way. Fluorescent images were collected using a Leica DMRBE microscope coupled to a Photometrics PXL capturing system (Fig. 2), or by using an Olympus confocal microscope

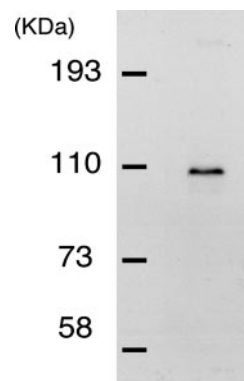


FIG. 1. **Detection of cellular ORC1 protein with the #209 polyclonal antibody.** Proteins in a whole cell lysate prepared from 1×10^5 HeLa S3 cells were separated in a 12.5% SDS-polyacrylamide gel and subjected to immunoblot analysis with the #209 antibody.

(Fluoview FV500; Fig. 3). To count BrdUrd- and ORC1-positive cells (Fig. 2), threshold levels were set just above the cytoplasmic background (Iplab Spectrum P 3.1.2c, Scanalytics Inc.), and cells showing nuclear signals were scored as positive.

RESULTS

Detection of Human ORC1 from Human Cell Lysates with Anti-ORC1 Antibodies—We previously characterized ORC1 in human cells using the monoclonal antibody 3A2A, which was raised against a human ORC1 peptide (25). In this study, we prepared a new polyclonal anti-ORC1 antibody, #209, which detected a 100-kDa polypeptide band, as shown by immunoblot analysis (Fig. 1), and precipitated proteins of the same size from human cell extracts (24). We have confirmed that the 100-kDa polypeptide that reacts with #209 is ORC1 by two lines of evidence. First, the amino acid sequences of 16 tryptic peptides produced from the immunoprecipitated band matched those of human ORC1, as shown by LC/MS/MS analysis (24). Second, the 100-kDa band shown in Fig. 1 disappeared after cells were subjected to RNA interference with human ORC1-specific small interference RNAs (24). Therefore, the new antibody is highly specific to human ORC1. On the other hand, although our previous antibody, 3A2A, also reacted specifically with 100-kDa polypeptide(s) in human cells, including ORC1, LC/MS/MS analysis showed that it also cross-reacted with the 100-kDa polypyrimidine tract binding protein-associated splicing factor (data not shown). The broader recognition specificity of 3A2A may affect our previous conclusions concerning human ORC1 (25). Thus, we re-examined human ORC1 with the new antibody and confirmed that most of our original results are valid, except that we now estimate the ORC1 content of HeLa S3 cells to be 1.5×10^4 molecules/cell (data not shown), and the ORC1 level oscillates in a cell cycle-dependent manner as described below. Hereafter, we used the #209 antibody to characterize ORC1 in human cells.

Cell Cycle-dependent Oscillation of ORC1 in HeLa S3 Cells Synchronized by M Phase Arrest—As described under “Experimental Procedures” and above for the #209 antibody, we obtained antibodies specific for ORCs 1–5 that could be used to detect their respective targets in HeLa S3 cell lysates. We analyzed synchronously growing HeLa S3 cells released from a metaphase arrest imposed by treatment with TN16. Cell cycle progression was monitored by counting BrdUrd-positive cells and by analyzing the single-parameter FACS patterns. These profiles indicated that S phase started between 6 and 9 h after release from arrest (Fig. 2). Whole-cell extracts were prepared from cells withdrawn at indicated time points and subjected to immunoblot analysis with antibodies against ORC subunits, cyclins A and E. The latter two proteins were used as repre-

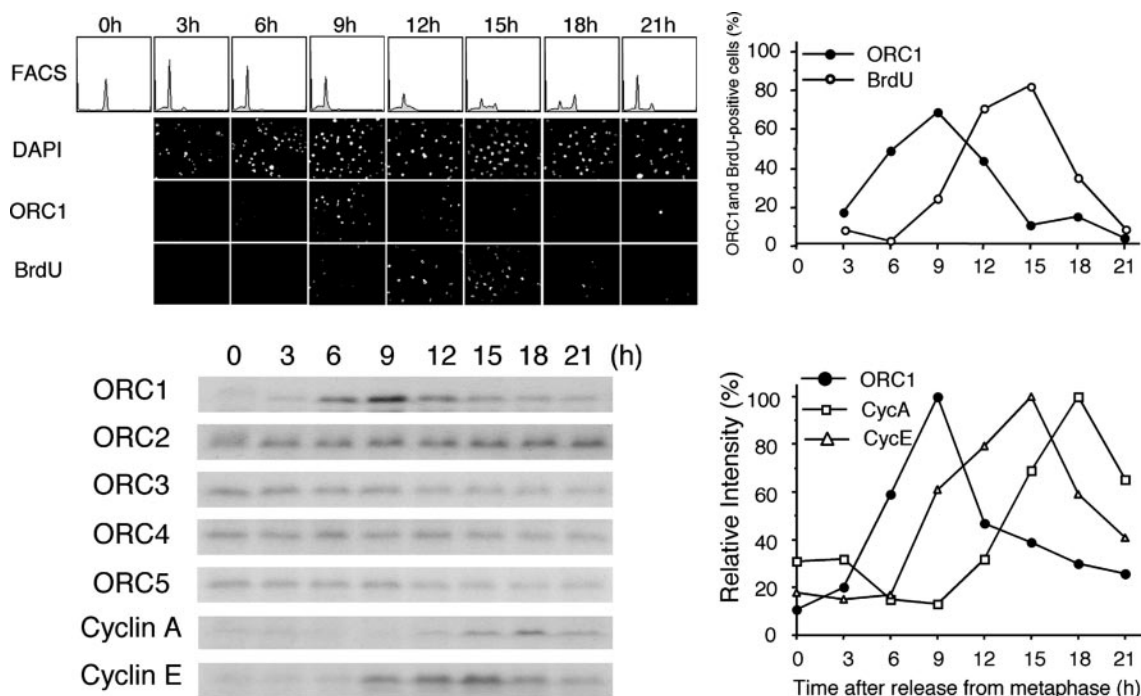


FIG. 2. **Quantitative analysis of ORC subunits in synchronously growing HeLa S3 released from M phase arrest.** HeLa S3 cells were released from M phase arrest by TN16 treatment and harvested at the indicated time points. FACS profiles (upper left panels, first row) and staining patterns with 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, second row) or antibodies to ORC1 (#209, third row) and BrdUrd (fourth row) are shown. The ratio of ORC1 (closed circles)- and BrdUrd (open circles)-positive cells to total DAPI-stained cells is shown graphically, upper right. Quantitative immunoblot analysis of ORC subunits, cyclin A and cyclin E (left panels, fifth to eleventh rows) was performed on whole cell lysates prepared from 1×10^5 cells at each indicated time point. Relative band intensities of ORC1 (closed circles), cyclin A (open squares), and cyclin E (open triangles) with the highest values taken as 1 are shown graphically at lower right.

sentative markers for cell cycle transitions (29). It is notable that the cyclin E level correlated with the frequency of BrdUrd-positive cells and that the cyclin A level increased in S phase. ORC1 was at a basal level from metaphase to early G_1 (0–3 h), started to increase between 3 and 6 h, peaked at 9 h (G_1 /S) at a level 10-fold higher than the basal level, and then decreased from S to G_2 phase (Fig. 2). In contrast, the levels of the ORC2–5 subunits remained constant over time. The oscillation of ORC1 observed by immunoblotting was confirmed by counting #209-positive cells. The ORC1-positive proportion of cells increased during G_1 up to the G_1 /S boundary (3–9 h) and decreased during S phase (9–15 h). These two results clearly indicate that the increase in ORC1 abundance occurred slightly earlier than the increases in the cyclin E level and in the frequency of BrdUrd-positive cells, which both peaked at 15 h (Fig. 2).

The ORC1 Level Decreases before S Phase in Individual Cells—More precise observations of cells stained with the #209 antibody by confocal microscopy showed that ORC1 appeared as punctate signals in HeLa S3 nuclei, suggesting that it associates with nuclear structures (Fig. 3). The number of dots in a cell was correlated with its position in the cell cycle by simultaneously staining for BrdUrd. As indicated in Fig. 3, more than 500 ORC1-specific dots were dispersed throughout the nucleus in G_1 phase cells, but this number decreased in parallel with cell cycle progression (Fig. 3, early S and late S). These data strongly suggest that the decrease in ORC1 abundance that precedes S phase is a result of changes in protein levels in individual cells. Interestingly, ORC1 signals did not overlap with BrdUrd signals, suggesting that ORC1 is not present at sites of DNA synthesis.

Cell Cycle-dependent Oscillation of ORC1 Observed under Various Conditions—Next, we asked whether the oscillation of ORC1 in HeLa S3 cells described above is cell type-specific. We tested two human cell lines, 293 (an embryonic kidney cell line

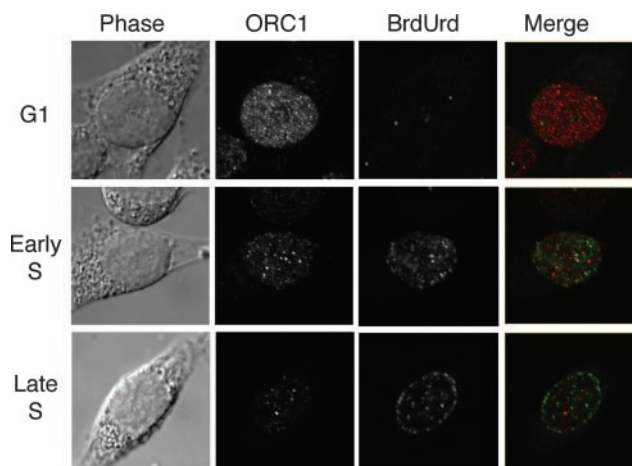


FIG. 3. **Confocal microscopic observations of ORC1 and BrdUrd signals in HeLa S3 cells.** Confocal microscopic images of HeLa S3 cells visualized by phase contrast (Phase) or by staining with the #209 (ORC1) and anti-BrdUrd (BrdUrd) antibodies and their merged images (Merge; ORC1 is red and BrdUrd is green) are shown. Cell cycle phases were determined by patterns of BrdUrd staining. Typical results for G_1 , early S, and late S phases are shown.

transformed with adenovirus type 5, Fig. 4A) and HEP-2 (a larynx carcinoma cell line, Fig. 4B). Synchronization experiments demonstrated that HEP-2 cells enter S phase with a schedule similar to that of HeLa S3 cells, but 293 cells enter S phase slightly earlier, as indicated by FACS analysis and the frequency of BrdUrd-positive cells. For both cell lines, ORC1-specific oscillations were observed, and the ORC1 level peaked earlier than the increase in the frequency of BrdUrd positive cells, although ORCs 2–5 remained at constant levels throughout the cell cycle, as seen for HeLa S3 cells (Fig. 4, A and B). Next we tested whether oscillation could be observed for FLAG-

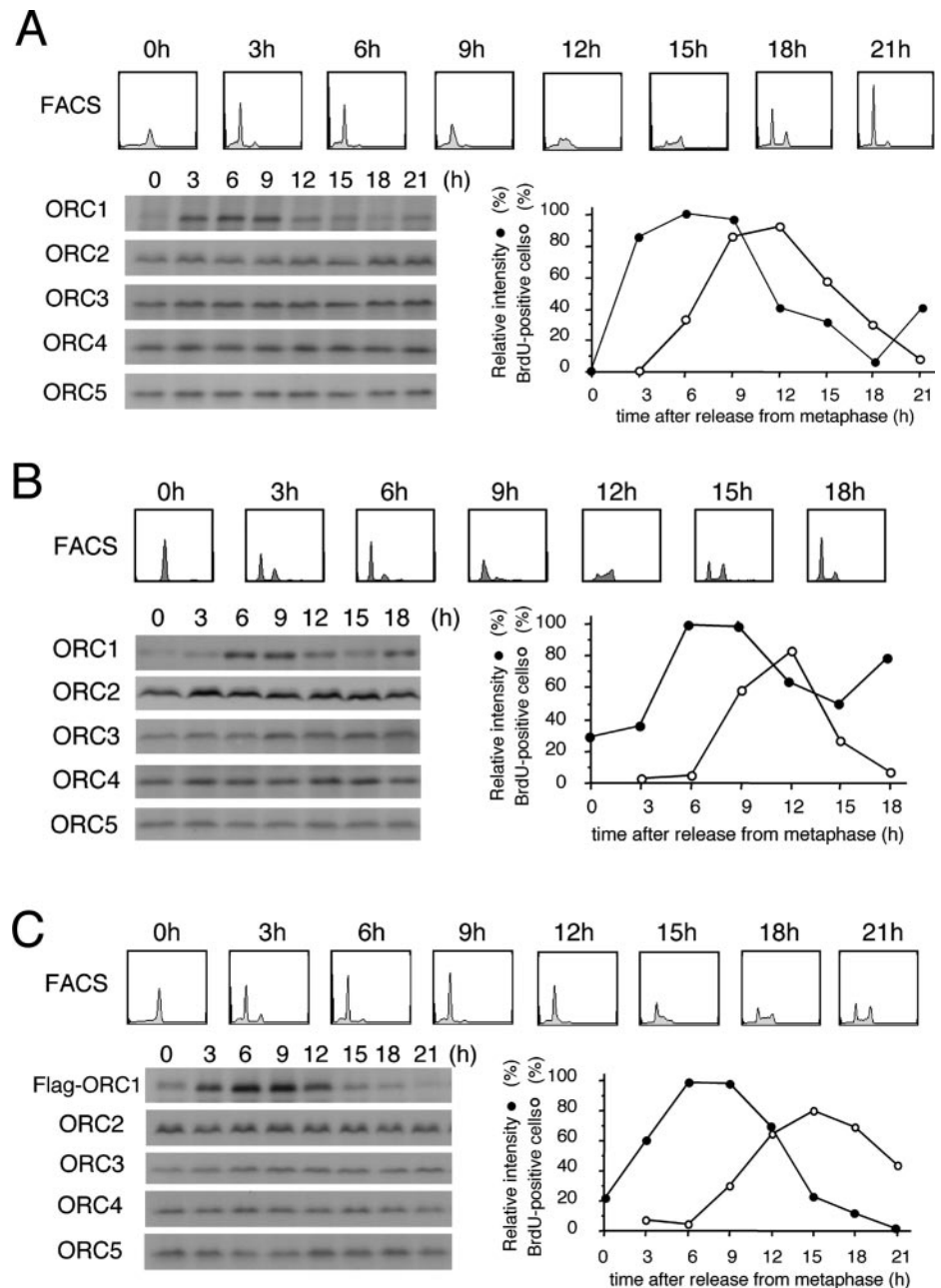


FIG. 4. Quantitative analysis of ORC subunits in synchronously growing human cells from M phase arrest. 293 cells (A), HEP-2 cells (B), and 293 cells expressing FLAG-tagged ORC1 (C) were released from M phase arrest imposed by TN16 treatment and harvested at the indicated time points. FACS profiles (top panels) and the ratios of BrdUrd-positive cells to total DAPI-stained cells (graphs at right) are shown. Quantitative immunoblot analysis of ORC subunits was performed with whole cell lysates as shown in Fig. 2 (lower left panels). The relative band intensities of ORC1 are shown as in Fig. 2 in the graphs at right. ORC1-FLAG in C was detected with the anti-FLAG antibody.

tagged ORC1 ectopically expressed from a CMV-promoter in 293 cells. For a cell line expressing FLAG-tagged ORC1 at a level similar to that of endogenous ORC1 (data not shown), we observed oscillation in the levels of the FLAG-tagged protein as that of endogenous ORC1 (Fig. 4C).

We further tested a different synchronization method to confirm ORC1 oscillation. HeLa S3, 293, and HEP-2 cells were arrested in early S phase for 24 h by the double-thymidine block method, and cellular protein contents were studied as described above after release from arrest (time 0) (Fig. 5, A–C). In all cases, ORC1 was at a basal level at time 0 and remained there until the beginning of BrdUrd incorporation. As was seen in M phase synchronization experiments, the ORC1 peak appeared earlier than the increase in the frequency of BrdUrd-positive cells. Again, the levels of ORC2–5 were constant.

We used a relatively mild lysis method in the preceding experiments, by first suspending cells in Triton buffer and subsequently mixing them with SDS buffer. Thus, it is formally possible that the decrease in ORC1 might be due simply to

degradation during sample preparation, because ORC1 has been reported to be very unstable (21, 23). To address this concern, we tested more direct extraction conditions: 1) cells in culture dishes were directly lysed with SDS buffer, and 2) cells were first fixed with trichloroacetic acid and then lysed with SDS buffer (Fig. 5D). In both cases, the extent of degradation of ORC1 in extracts prepared from thymidine-blocked cells was the same as in extracts prepared by our original method, indicating that the levels of ORC1 observed in our cell lysates reflect the levels of ORC1 in human cells.

Further studies done with TERT-RPE1 cells (telomerase-immortalized human retina pigment epithelial cells) arrested in G₀ by serum starvation for 4 days showed that the level of ORC1 was also low in these cells (Fig. 6). When the cells were stimulated with serum, the level of ORC1 started to increase at 12 h, peaked at 18 h, and decreased in the following S phase (18–27 h, Fig. 6). This result indicates that the ORC1 cycle also occurs in synchronized non-cancer cells. Therefore, irrespective of cell types, antibodies for detection and syn-

FIG. 5. Quantitative analysis of ORC subunits in synchronously growing human cells released from early S phase arrest and comparison of lysis methods. HeLa S3 (A), 293 (B), and HEP-2 (C) cells were released from an early S phase arrest imposed by the double-thymidine block method and harvested at the indicated time points. FACS profiles (top panels) and the ratios of BrdUrd-positive cell numbers to total DAPI-stained cells (graphs at right) are shown. Quantitative immunoblot analysis of ORC subunits was performed with whole cell lysates as shown in Fig. 2 (lower left panels). The relative band intensities of ORC1 are shown as in Fig. 2 in the graphs at right. D, asynchronously growing cells (Asyn) or cells arrested by the thymidine block method for 24 h (Thy) were first harvested in Triton buffer and then mixed with SDS (Triton), lysed directly with SDS (SDS), or first fixed with trichloroacetic acid and then lysed with SDS (TCA). Quantitative immunoblot analysis of ORC1 and ORC2 was performed with lysates prepared from 1×10^5 cells.

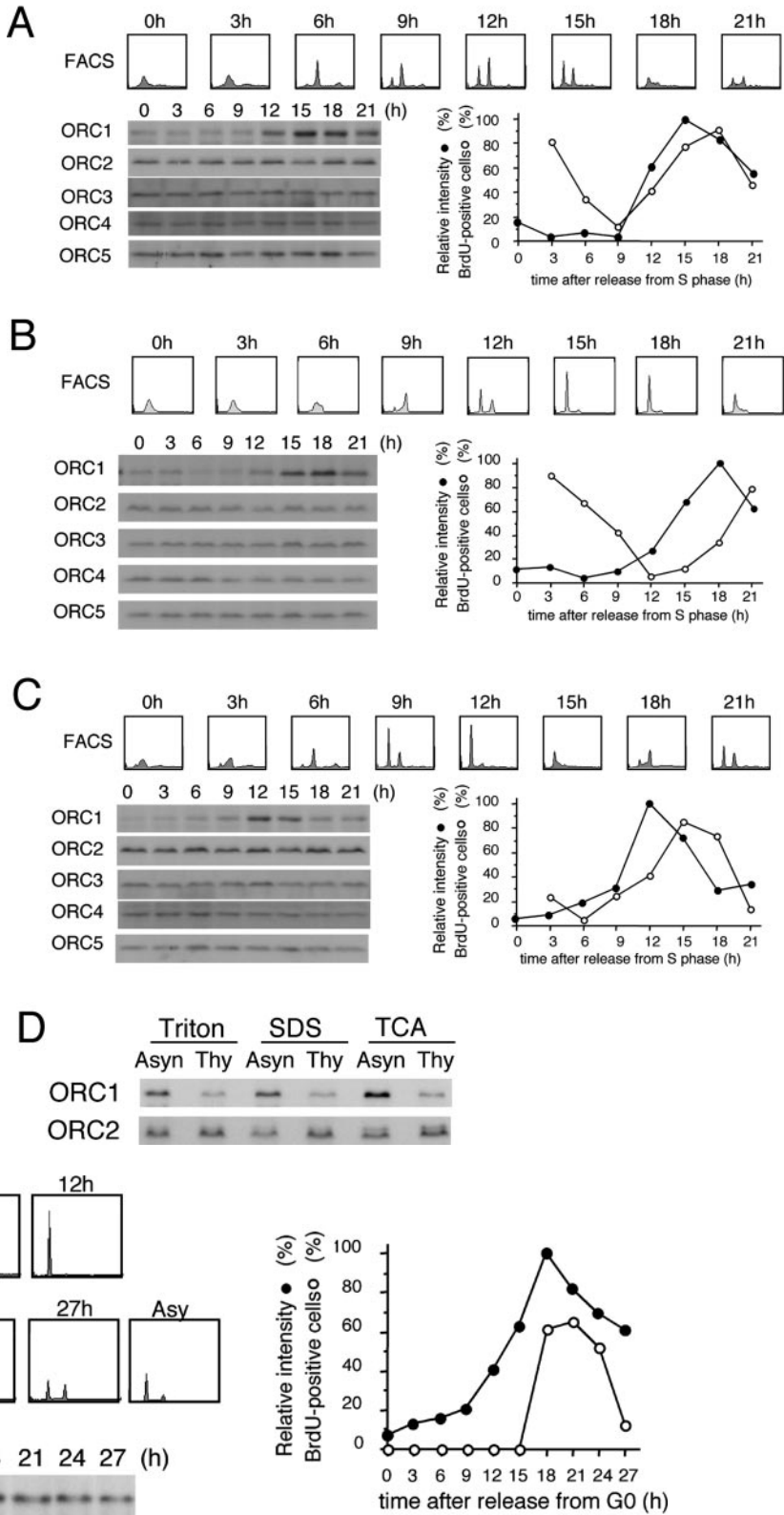


FIG. 6. Oscillation of ORC1 in synchronously growing TERT-PRE1 cells released from serum starvation. Serum-starved TERT-PRE1 cells were released from arrest by the addition of 10% FCS at time 0 and harvested at the indicated time points. FACS profiles (panels upper left), ratios of BrdUrd-positive cells to DAPI-stained cells (graph at right), quantitative immunoblot analysis of ORC subunits (panels at lower left), and relative band intensities of ORC1 (graph at right) are shown as in Fig. 2.

chronization methods, the ORC1 cycle can be observed in human cells.

Cell Cycle-dependent Degradation Controls the ORC1 Cycle—It has been shown that there are E2F sites upstream of the

ORC1 gene and that ORC1 expression is cell cycle-regulated (30). This observation suggested that E2F dependence of ORC1 expression may control ORC1 accumulation during G₁ phase. However, we demonstrated that FLAG-tagged ORC1 expressed

from a CMV promoter exhibited cyclical expression, indicating that transcriptional control makes only a minimal contribution to the regulation of ORC1 levels in cancer cells (Fig. 4C). We also observed that the reduced level of ORC1 in S phase-arrested cells was increased by treatment with a proteasome-specific inhibitor, MG132 (Fig. 7). This result indicates that the ORC1 cycle includes the periodic degradation of ORC1 mediated by the ubiquitin-26 S proteasome pathway. Recently, it has been reported that ORC1 is poly-ubiquitinated by Skp2 during S phase and degraded via the 26 S proteasome pathway in human cells (19).

ORC1 Degradation Is Programmed to Occur Prior to or Early in S Phase—As described above, ORC1 is present at a basal level in cells arrested in early S phase by thymidine, although the ORC1 level is high in early S phase cells released from M phase arrest. The S phase arrest-specific degradation of ORC1 was also observed during arrest promoted by hydroxyurea (HU) or aphidicolin treatment (data not shown). These results suggest that the programmed degradation of ORC1 is initiated before the early S phase arrest point, causing the protein to decrease to a basal level in arrested cells. To study the transition in the level of ORC1 in cells approaching the early S phase arrest point, HeLa S3 cells were first arrested in M phase and then released in the presence of HU (Fig. 8). FACS analysis indicates that these cells made the transition from M to G₁ between 0 and 6 h, but exhibited a 2N DNA content until at least 21 h, indicating that they were arrested in early S phase by HU treatment. Under these conditions, the ORC1 cycle was apparent, indicating that the program of ORC1 degradation turns on prior to or at early S phase. On the other hand, although an increase in the level of MCM3 in the chromatin fraction paralleled the increase in ORC1, MCM3 bound to chromatin remained at high levels even after ORC1 was de-

graded (Fig. 8). This result suggests that, although MCM3 is loaded onto chromatin in an ORC1-dependent manner (24), its subsequent fate is independent of ORC1 degradation.

DISCUSSION

It is well known that the eukaryotic replication initiation factor, ORC, remains at a constant level in chromatin throughout the cell cycle of various species (4, 5, 7, 8, 31–33). However, thus far we have shown that, in four different cell lines subjected to three synchronization methods, human ORC1 exhibits a cell cycle-specific oscillation in abundance, as judged by immunoblotting and immunostaining analyses. On the other hand, the other ORC subunits, ORCs 2–5, remain at constant levels throughout the cell cycle. These same observations have been reported for HeLa and Raji cells by others (19). Taking these results into consideration, we conclude that, in human cells, the levels of ORC1 oscillate, a phenomenon we have termed “the ORC1 cycle” (8). Previous studies had reported that the level of ORC1 was constant throughout the human cell cycle (25, 34), an observation that may be explained by the cross-reactivity of the human ORC1 antibody with other protein(s), as we have demonstrated here.

One important question concerns the time of appearance of the ORC1 cycle during evolution, because it does not exist in yeast or frogs. We have not been able to study the behavior of ORC1 in other species, because our antibody is highly specific to human ORC1. However, a variant ORC1 cycle has been reported in Chinese hamster cells; in these cells, the level of ORC1 is constant (21, 23), but the protein is released from the chromatin fraction in S phase (21, 33). Therefore, the level of ORC1 associated with chromatin cycles in both human and hamster cells, regardless of its overall cellular level. In connection with these behaviors, the S phase-specific ubiquitination of ORC1 has been reported for both species (19–21). Interestingly, hamster ORC1 is only mono-ubiquitinated, but human ORC1 is poly-ubiquitinated, and these distinctions may have consequences for the different fates of the two ORC1 proteins in S phase.

In serum-starved quiescent cells, ORC1 is at a basal level, as observed for M or early S phase-arrested cells. This basal level may be maintained by degradation, but E2F regulation might also have a role in keeping the level of ORC1 low in quiescent cells. Indeed, ectopic expression of ORC1 in quiescent *Drosophila* cells alters the program of proliferation during development (35). In addition, transcription of the ORC1 gene is at a basal level in serum-starved cells, and it can be induced by the addition of serum or by overproduction of the E2F transcription factor (30), suggesting the importance of transcriptional regulation in the maintenance of a low level of ORC1 during G₀ arrest.

In yeast, ORC binds to replication origins as a complex of six

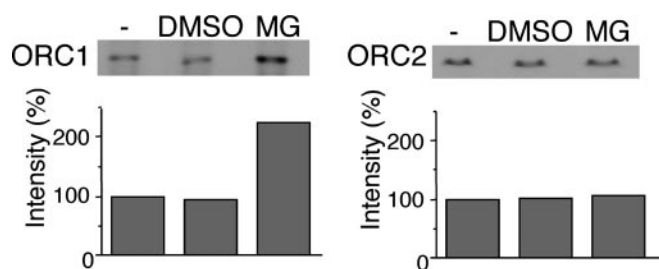


FIG. 7. Effects of 26 S proteasome inhibitors on ORC1 degradation. HeLaS3 cells arrested by the double-thymidine block method for 18 h were further treated with Me₂SO (DMSO) and 5 μ M MG132 (MG) for 6 h before harvest. Quantification of ORC1 (left) and ORC2 (right) in whole cell lysates prepared from equivalent numbers of cells (1×10^6) was done as in Fig. 4. Band intensities were normalized to those of control bands representing ORC1 or ORC2 from untreated cells (–), as indicated.

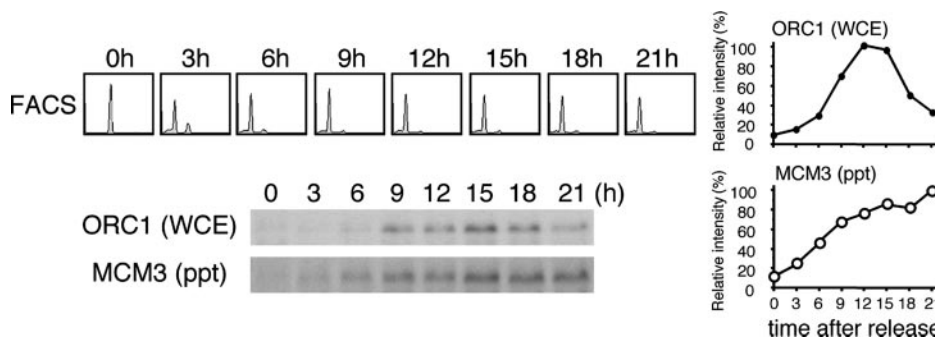


FIG. 8. ORC1 is degraded prior to early S phase. HeLa S3 cells blocked in M phase were released from arrest in the presence of HU, harvested at the indicated time points, and fractionated into soluble and insoluble fractions with Triton X-100. FACS profiles are shown in the top panels. Quantitative immunoblot analysis of ORC1 (ORC1 WCE; whole cell extract) and MCM3 in the insoluble fraction (MCM ppt; lower left panels), and graphs of their relative band intensities (right) are shown.

proteins throughout the cell cycle, and defects in any of these subunits result in a failure in the initiation of replication, suggesting that an intact ORC is necessary (36, 37). Similarly, if intact ORC is required for human DNA replication, the concentration of ORC1 may be a major factor in the regulation of ORC activity, because the levels of ORCs 2–5 are constant. Human ORC6 appears to associate with ORCs 1–5 only weakly, and its functional roles are currently not well understood (38, 39). As we have demonstrated, the level of human ORC1 protein is under strict cell cycle control, which in turn indicates that ORC activity is strictly controlled by cell cycle progression. Indeed, we have demonstrated that formation of the ORC1–5 complex parallels the accumulation of ORC1 in human nuclei, which is further linked with the loading of MCM onto chromatin. These points are discussed in the accompanying paper (24).

Human ORC1 is at a basal level in cells arrested in early S phase by aphidicolin, HU, or thymidine. Furthermore, the arrested cells can start DNA synthesis without accumulating ORC1 after release from this block. Thus, we propose that ORC1 degradation begins prior to S phase. A similar behavior was observed for *Xenopus* ORC1 (XIORC1) when Chinese hamster nuclei were introduced into *Xenopus* egg extracts (33). XIORC1 loaded onto hamster chromatin was released soon after the assembly of pre-RCs on chromatin. It has been also suggested that XIORC is not required for the progression of S phase once pre-RCs have assembled (33, 40). Thus, it is possible that a basal level of ORC1 is sufficient for origin firing. However, we prefer another possibility: that ORC1 that has accumulated in G₁ is used to mark origin sites and is not necessary for subsequent actual firing. Immunostaining experiments showed that ORC1 and BrdUrd signals do not overlap. This result strongly supports the second possibility and furthermore inspires the idea that the removal or degradation of ORC1 is necessary to allow the cell cycle to progress from the initiation reaction to the next stage.

It is important to know what triggers the degradation of ORC1 prior to origin firing. Among candidate processes are the assembly of the pre-RC and the increase in S-CDK or CDC7 kinase activity. Further studies of molecular assemblies, including ORC at specific origins in human cells, will be necessary to address this issue.

Acknowledgments—We thank Drs. Hisao Masukata (Osaka University) and Masatoshi Fujita (National Cancer Center Research Institute) for critical reading of the manuscript and valuable comments. We are also grateful to Dr. Anindya Dutta (Harvard Medical School) for providing antibodies.

REFERENCES

1. Bell, S. P., and Stillman, B. (1992) *Nature* **357**, 128–134
2. Diffley, J. F., and Cocker, J. H. (1992) *Nature* **357**, 169–172
3. Li, J. J., and Herskowitz, I. (1993) *Science* **262**, 1870–1874
4. Diffley, J. F., Cocker, J. H., Dowell, S. J., and Rowley, A. (1994) *Cell* **78**, 303–316
5. Liang, C., and Stillman, B. (1997) *Genes Dev.* **11**, 3375–3386
6. Gavin, K. A., Hidaka, M., and Stillman, B. (1995) *Science* **270**, 1667–1671
7. Bell, S. P., and Dutta, A. (2002) *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 333–374
8. Depamphilis, M. L. (2003) *Gene (Amst.)* **22**, 1–15
9. Carpenter, P. B., Mueller, P. R., and Dunphy, W. G. (1996) *Nature* **379**, 357–360
10. Donovan, S., Harwood, J., Drury, L. S., and Diffley, J. F. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 5611–5616
11. Fujita, M., Hori, Y., Shirahige, K., Tsurimoto, T., Yoshikawa, H., and Obuse, C. (1998) *Genes Cells* **3**, 737–749
12. Tadokoro, R., Fujita, M., Miura, H., Shirahige, K., Yoshikawa, H., Tsurimoto, T., and Obuse, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 15881–15889
13. Takahashi, T., Ohara, E., Nishitani, H., and Masukata, H. (2003) *EMBO J.* **22**, 964–974
14. Aparicio, O. M., Weinstein, D. M., and Bell, S. P. (1997) *Cell* **91**, 59–69
15. Tanaka, T., Knapp, D., and Nasmyth, K. (1997) *Cell* **90**, 649–660
16. Nguyen, V. Q., Co, C., and Li, J. J. (2001) *Nature* **411**, 1068–1073
17. Romanowski, P., Marr, J., Madine, M. A., Rowles, A., Blow, J. J., Gautier, J., and Laskey, R. A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 4239–4243
18. Tugal, T., Zou-Yang, X. H., Gavin, K., Pappin, D., Canas, B., Kobayashi, R., Hunt, T., and Stillman, B. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32421–32429
19. Mendez, J., Zou-Yang, X. H., Kim, S. Y., Hidaka, M., Tansey, W. P., and Stillman, B. (2002) *Mol. Cell* **9**, 481–491
20. Fujita, M., Ishimi, Y., Nakamura, H., Kiyono, T., and Tsurumi, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 10354–10361
21. Li, C. J., and DePamphilis, M. L. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 105–116
22. Kreitz, S., Ritz, M., Baack, M., and Knippers, R. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 6337–6342
23. Okuno, Y., McNairn, A. J., den Elzen, N., Pines, J., and Gilbert, D. M. (2001) *EMBO J.* **20**, 4263–4277
24. Ohta, S., Tatsumi, Y., Fujita, M., Tsurimoto, T., and Obuse, C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 41535–41540
25. Tatsumi, Y., Tsurimoto, T., Shirahige, K., Yoshikawa, H., and Obuse, C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5904–5910
26. Thome, K. C., Dhar, S. K., Quintana, D. G., Delmolino, L., Shahsafaei, A., and Dutta, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 35233–35241
27. Quintana, D. G., Hou, Zh., Thome, K. C., Hendricks, M., Saha, P., and Dutta, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28247–28251
28. Kimura, H., Nozaki, N., and Sugimoto, K. (1994) *EMBO J.* **13**, 4311–4320
29. Dulic, V., Lees, E., and Reed, S. I. (1992) *Science* **257**, 1958–1961
30. Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D. R., Kelly, T. J., and Nevins, J. R. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6977–6984
31. Lygerou, Z., and Nurse, P. (1999) *J. Cell Sci.* **112**, 3703–3712
32. Kong, D., and DePamphilis, M. L. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8095–8103
33. Sun, W. H., Coleman, T. R., and DePamphilis, M. L. (2002) *EMBO J.* **21**, 1437–1446
34. Saha, P., Chen, J., Thome, K. C., Lawlis, S. J., Hou, Z. H., Hendricks, M., Parvin, J. D., and Dutta, A. (1998) *Mol. Cell. Biol.* **18**, 2758–2767
35. Asano, M., and Wharton, R. P. (1999) *EMBO J.* **18**, 2435–2448
36. Hori, Y., Shirahige, K., Obuse, C., Tsurimoto, T., and Yoshikawa, H. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **7**, 409–418
37. Bell, S. P., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1993) *Science* **262**, 1844–1849
38. Vashee, S., Simanek, P., Challberg, M. D., and Kelly, T. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 26666–26673
39. Dhar, S. K., Delmolino, L., and Dutta, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 29067–29071
40. Hua, X. H., and Newport, J. (1998) *J. Cell Biol.* **140**, 271–281

The ORC1 Cycle in Human Cells

II. DYNAMIC CHANGES IN THE HUMAN ORC COMPLEX DURING THE CELL CYCLE*

Received for publication, July 14, 2003, and in revised form, July 31, 2003
Published, JBC Papers in Press, August 8, 2003, DOI 10.1074/jbc.M307535200

Satoshi Ohta^{‡§}, Yasutoshi Tatsumi^{‡¶}, Masatoshi Fujita^{||}, Toshiki Tsurimoto^{‡**},
and Chikashi Obuse^{‡ ‡‡}

From the [‡]Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0101 and the ^{||}National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuohku, Tokyo 104-0045, Japan

The origin recognition complex (ORC) plays a central role in regulating the initiation of DNA replication in eukaryotes. The level of the ORC1 subunit oscillates throughout the cell cycle, defining an ORC1 cycle. ORC1 accumulates in G₁ and is degraded in S phase, although other ORC subunits (ORCs 2–5) remain at almost constant levels. The behavior of ORC components in human cell nuclei with respect to the ORC1 cycle demonstrates that ORCs 2–5 form a complex that is present throughout the cell cycle and that associates with ORC1 when it accumulates in G₁ nuclei. ORCs 2–5 are found in both nuclease-insoluble and -soluble fractions. The appearance of nuclease-insoluble ORCs 2–5 parallels the increase in the level of ORC1 associating with nuclease-insoluble, non-chromatin nuclear structures. Thus, ORCs 2–5 are temporally recruited to nuclease-insoluble structures by formation of the ORC1–5 complex. An artificial reduction in the level of ORC1 in human cells by RNA interference results in a shift of ORC2 to the nuclease-soluble fraction, and the association of MCM proteins with chromatin fractions is also blocked by this treatment. These results indicate that ORC1 regulates the status of the ORC complex in human nuclei by tethering ORCs 2–5 to nuclear structures. This dynamic shift is further required for the loading of MCM proteins onto chromatin. Thus, the pre-replication complex in human cells may be regulated by the temporal accumulation of ORC1 in G₁ nuclei.

which is composed of six polypeptides, is essential for initiation, and it remains bound to replication origins throughout the cell cycle (1–3). Prior to the initiation of DNA replication, ORC forms a large protein complex, called the pre-replicative complex (pre-RC), in association with other initiation factors, including Cdc6 and the mini-chromosome maintenance (MCM) proteins. The pre-RC then changes to a post-replicative form with the dissociation of these factors, in parallel with alterations in the ORC-DNA interaction (2–6). Thus, dynamic changes in DNA-protein complexes at replication origins appear to be closely connected with the initiation of replication (2–7).

Counterparts of yeast pre-RC components have been identified in higher eukaryotes, indicating that basic mechanisms for the initiation of replication are highly conserved (7). Putative ORC subunits that constitute multi-protein complexes similar to those seen in *S. cerevisiae* have been identified in *Drosophila* (8, 9) and *Xenopus* (10–12). In the latter, the depletion of ORC from egg extracts inhibits the initiation of replication (10, 11). Similarly, in *Drosophila*, conditional mutations in the DmORC2, -3, and -5 genes cause strong defects in replication and cellular proliferation (13, 14). Putative human ORC genes have also been identified (12, 14, 15–20), and their products have been shown to interact with each other (21, 22), suggesting that a similar protein complex functions in replication in human cells.

Recent studies have demonstrated that several nuclear events, including replication, take place in specialized compartments where specific factors assemble in highly organized structures (23). Therefore, to understand how replication is initiated and regulated in eukaryotic cells, it is necessary to determine how replication proteins are assembled into higher order complexes and how they are distributed among sub-nuclear compartments. Previous studies have demonstrated that MCMs associate with pre-replicative chromatin and subsequently dissociate upon the initiation of replication (2, 5, 6, 24–26). Similarly, mammalian CDC6 proteins appear to accumulate in G₁ phase nuclei and to move to the cytoplasm in early S phase (27–29). These observations suggest that the dynamic behavior of these proteins in S phase nuclei may be linked to the mechanism that restricts replication to only once per cell cycle. In budding yeast, however, ORC behaves as a static nuclear component and associates with chromatin DNA throughout the cell cycle (2, 3, 6). Despite the overall high conservation of ORC proteins among species, animal ORCs exhibit greater regulatory flexibility than their yeast counterparts. For example, expression of the mammalian ORC1 gene is regulated by the E2F protein (16, 30), and *Xenopus* ORC is known to dissociate from metaphase chromatin, as observed in an egg extract system (11). In addition, the *Drosophila* ORC1 protein changes in abundance depending on developmental

The replication of eukaryotic chromosomes occurs in a highly regulated manner during S phase. In the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* the origin recognition complex (ORC),¹

* This work was supported by Grants-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked “advertisement” in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[§] Present address: Dept. Molecular Pharmacology, St. Jude Children’s Research Hospital, 332 N. Lauderdale St., Memphis, TN 38105-2794.

[¶] Present address: National Cancer Center Research Institute, 5-1-1 Tsukiji, Chuohku, Tokyo 104-0045, Japan.

^{**} Present address: Dept. of Biology, School of Sciences, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan.

^{‡‡} To whom correspondence should be addressed: Dept. of Gene Mechanisms, Graduate School of Biostudies, Kyoto University, Kitashirakawa-Oiwakecho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502 Japan. Tel.: 81-75-753-4207; Fax: 81-75-753-4208; E-mail: obuse@kzo.biophys.kyoto-u.ac.jp.

¹ The abbreviations used are: ORC, origin recognition complex; pre-RC, pre-replicative complex; MCM, mini-chromosome maintenance; RNAi, RNA interference; siRNA, small interference RNA; LC/MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

stage and on the cell cycle, and ectopic expression of DmORC1 alters the program of proliferation. This finding suggests that ORC, and especially ORC1, regulates the growth of animal cells by controlling S phase progression (30). Indeed, the accompanying paper (31) describes an ORC1 cycle in human cells, which is characterized by ORC1 accumulation during G₁ and reduction during the S phase.

In this study, we demonstrate that chromatin-bound ORC2–5 subunits are recruited to nuclease-insoluble, non-chromatin structures in a manner that parallels the ORC1 cycle. Furthermore, this shift in the distribution of ORCs 2–5 tightly correlates with the partitioning of MCMs to chromatin fractions. These results strongly suggest that the accumulation of ORC1 precedes replication complex assembly in human nuclei prior to the S phase.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture and Synchronization—Cell culture, synchronization, and monitoring of the cell cycle were done as described (31, 32). Construction of the 293 cell line expressing FLAG-ORC1 (1C2) was also described (31).

Fractionation of Cellular Proteins—Whole cell extract preparation and fractionation of proteins from HeLa S3 cells with Triton X-100 (Triton), NaCl, or DNase I were done as described (31, 32).

RNA Interference Experiments—RNA interference (RNAi) experiments were done essentially as specified by “The siRNA User’s Guide” (www.mpibpc.gwdg.de/abteilungen/100/105/sirna.html). Annealed siRNAs specific for ORC1 (ORC1 plus 73a, 5′-CUGCACUACCAAACCUAUAdTdT; ORC1 plus 73b, 5′-UAUAGGUUUGGUAGUGCAGTT-3′), CDC6 (CDC6 plus 82, 5′-CUCCAGUGAUGCCAAACUAdTdT-3′; 5′-UAGUUUGGCATCACUGGAGdTdT-3′), LaminA/C (33), and pGL (luciferase, 33) were transfected into HeLa S3 cells with Oligofectamine (Invitrogen) following the manufacturer’s instruction. Cells were harvested and fractionated 2 days after transfection.

Immunoprecipitation and Immunoblotting—All antibodies used in this study have been described (31). #209 (anti-ORC1 antibody) beads were prepared by immobilization of the purified antibody to protein A-Sepharose (Amersham Biosciences, UK), at a ratio of 2 µg of IgG to 10 µl of beads, with dimethyl pimelimidate (Sigma, St. Louis, MO). ORC1 was precipitated from 0.1% TX-300mCSK extracts (31, 32) prepared from 1×10^7 HeLa S3 cells with 10 µl of #209-linked beads after incubation at 4 °C for 3 h. For ORC2, the same lysate was incubated with 1 µg of 3B7 (MBL) at 4 °C for 2 h, followed by addition of 10 µl of protein A-Sepharose and incubation at 4 °C for 1 h. The supernatants were recovered as unbound fractions. The beads were washed twice with 0.1% TX-300mCSK, and elutes were obtained with 0.1 M glycine (pH 2.0) and neutralized with 1/10 volume of 1 M Tris-HCl (pH 8.8). All immunoblotting procedures were as described (32).

Mass Spectrometry—All procedures were essentially done as described previously (34). Immunoprecipitated samples were separated by 12.5% SDS-PAGE, and the region of the gel-containing proteins from about 200 to 30 kDa (Fig. 2) was cut at intervals of ~1 mm. Proteins in the gel slices were subjected to reduction, alkylation, and tryptic digestion with modified trypsin (Roche Applied Science, Germany) at 37 °C for 14 h. After in-gel digestion, the product peptides were extracted with 5% formic acid and acetonitrile, dried under vacuum, and dissolved in 5% formic acid. Multiply digested peptides from each gel slice were separated by micro-capillary C18-reverse phase chromatography (200 µm × 5-cm capillary, Michrom BioResources) and directly applied to an LCQ Advantage quadrupole ion trap mass spectrometer (Finnigan) with a nanoelectrospray needle (New Objective) mounted on a 3D-stage (AMR, Japan). The primary ion spectrum data generated by LC/MS/MS were screened against the NCBI non-redundant protein data base with the Mascot program (Matrix Science, UK) to identify high scoring proteins.

RESULTS

Subcellular Localization of ORC Subunits in HeLa S3 Cells—To study the behavior of ORC subunits in human cells, proteins extracted from HeLa S3 cells growing asynchronously were fractionated into soluble and insoluble fractions by treatment with 0.1% TX-100mCSK. ORC1, -2, -3, -4, and -5 were predominantly found in the insoluble fraction (Fig. 1A), suggesting that they localize to chromatin. When the washed nu-

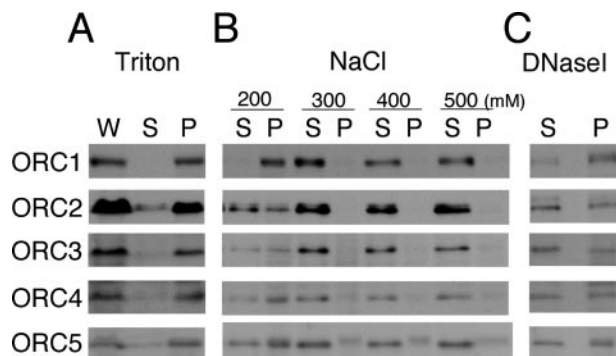


FIG. 1. The distribution of ORC subunits in HeLa S3 cells. ORC subunits were detected in HeLa S3 cell fractions treated with 0.1% TX-100mCSK (A), in Triton-insoluble fractions treated with the indicated concentrations of NaCl (B), or in Triton-insoluble fractions treated with DNase I (C). Proteins obtained from 1×10^5 cells were subjected to immunoblot analysis with antibodies against ORC1, -2, -3, -4, and -5. Soluble (lanes S) and insoluble (lanes P) fractions produced by the three different treatments are shown. In A, lane W shows proteins derived from whole cell extracts of asynchronous HeLa S3 cells prior to fractionation.

clei were further treated with DNase I to extract bulk chromatin-associated DNA (32), most ORC1 remained associated with nuclease-insoluble nuclear structures (non-chromatin nuclear structures) (Fig. 1C). In contrast, about half of the ORC2, -3, -4, and -5 subunits (ORCs 2–5) were solubilized by this treatment, indicating that half of them are associated with nuclear structures (Fig. 1C). When the Triton-insoluble fraction was treated with buffers containing increasing concentrations of NaCl, ORC1 was solubilized by 0.3 M NaCl but not by 0.2 M NaCl, whereas ORCs 2–5 were gradually solubilized by 0.2 and 0.3 M NaCl, as shown in Fig. 1B.

Composition of the ORC Complex in HeLa S3 Cells—To determine whether human ORC subunits are in a stable complex similar to yeast ORC, we studied co-immunoprecipitates with ORC1 from the Triton-insoluble fraction of HeLa S3 cells extracted with 0.3 M NaCl. Several specific bands were detectable on SDS-polyacrylamide gels of proteins precipitated with the #209 antibody (Fig. 2). To identify the proteins in these bands, slices from the gel were subjected to mass spectrometric analysis. Peptides with ORC1 amino acid sequences were found in gel slice #10, which contained proteins of 100-kDa molecular mass. Peptides with ORC2 and ORC3 amino acid sequences were identified in gel slice #16 (67 kDa), and peptides with ORC4 and ORC5 amino acid sequences were found in gel slice #25 (45 kDa). To confirm this result, immunoprecipitated samples were subjected to immunoblot analysis with specific antibodies against ORCs 2–5 (Fig. 3A). Under conditions in which most ORC1 in the lysate was precipitated, roughly half of the ORC2–5 proteins in the extract were co-immunoprecipitated with ORC1. This result was further confirmed by co-immunoprecipitation of FLAG-tagged ORC1 with an anti-FLAG antibody from the 293-cell line, 1C2, which expresses the tagged protein at the same level as endogenous ORC1 (31). ORCs 2–5 were specifically precipitated with FLAG-ORC1 (Fig. 3B). These results indicate that a protein complex consisting of the ORC1–5 subunits is present in the chromatin-bound fraction of human cell extracts.

Cell Cycle-dependent Formation of the ORC1–5 Complex—Next, we studied whether ORCs1–5 persist as a tight complex throughout the cell cycle, as observed for yeast ORC. We prepared 0.3 M NaCl lysates from synchronously growing HeLa S3 cells after release from M phase arrest mediated by the drug TN16. Most cellular ORC1–5 subunits were extracted with 0.3 M NaCl (Fig. 1B). In this experiment, the level of ORC1 was low

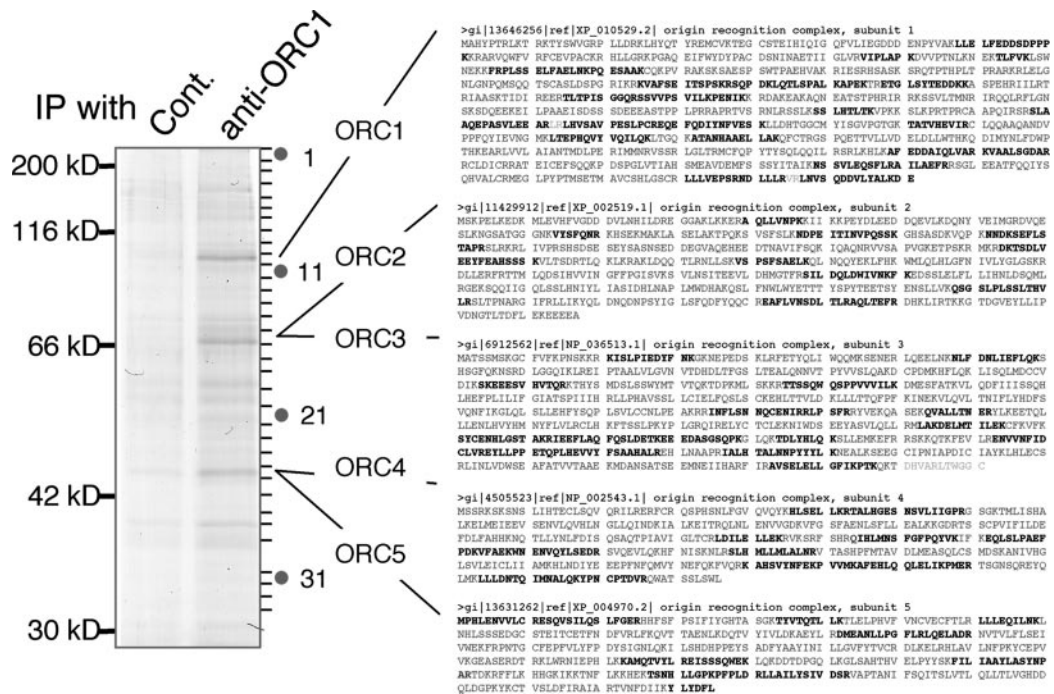


FIG. 2. **Mass spectrometric analyses of the anti-ORC1 antibody immunoprecipitate.** *Left panel*, 12.5% SDS-PAGE/Coomassie Brilliant Blue staining of proteins precipitated with protein A beads coupled to pre-immune IgG (*Cont.*) or to the anti-ORC1 antibody, #209, from the 300 mM NaCl extract of HeLa S3 Triton-washed nuclei, as in Fig. 1B. Tryptic digests of peptides from gel slices were subjected to mass spectrometric analysis. *Right panel*, amino acid sequences of peptides identified from slices #10, #15, and #25 by mass spectrometry, shown in **bold characters** aligned with the full amino acid sequences of human ORC1, -2, -3, -4, and -5. ORC1 peptides were identified in slice #10, ORC2 and -3 peptides in slice #15, and ORC4 and 5 peptides in slice #25.

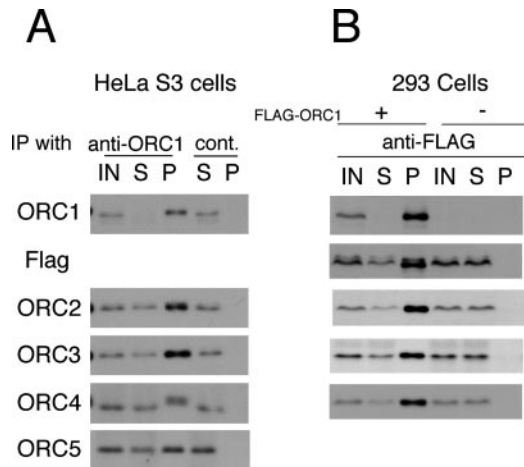


FIG. 3. Immunoblot analysis of co-immunoprecipitated human ORC subunits. *A*, an analysis of proteins in cell lysate (input, *lane IN*), in supernatant (*S*), and in precipitate (*P*) immunoprecipitated with the anti-ORC1 antibody, #209, or with pre-immune IgG (*cont.*) and blotted on filters. The indicated proteins were detected with anti-ORC1, -2, -3, -4, or -5 antibodies, respectively. Lysate and supernatant obtained from an equivalent number of cells and precipitate from a 5-fold number of cells were analyzed. In *B*, extracts from human 293 cells expressing FLAG-ORC1 (1C2, +) or from non-transfected cells (–) were immunoprecipitated with the anti-FLAG antibody. The indicated proteins in cell lysates (*IN*), supernatants (*S*), and immunoprecipitates (*P*) were detected by immunoblot analysis with anti-FLAG or anti ORC2, -3, -4, and -5 antibodies, respectively, as in *A*.

in metaphase and early G₁ (0–3 h), rose between 6 and 12 h (middle G₁), reached a peak at 12 h (G₁/S), and then decreased from S to G₂ phase, slightly in advance of the decrease in the level of cyclin E, as described in a previous study (31) (Fig. 4A). The levels of the ORC2–5 subunits, however, remained essentially constant over time. The #209 antibody precipitated ORC1 at 9 and 12 h, times at which it accumulates, and it co-precip-

itated ORC2–4 subunits in the same period (Fig. 4, A and B). In a converse experiment with the anti-ORC2 antibody, constant amounts of both ORC2 and ORC3 were precipitated throughout the cell cycle (Fig. 4C), and ORC1 appeared in precipitates when it accumulated in cells. Interestingly, although the levels of ORC4 and 5 are constant throughout the cell cycle (31) (Fig. 4A), the amounts of these proteins that co-immunoprecipitated with ORC2 increased when ORC1 was present (Fig. 4C). These results indicate that ORC2 and ORC3 form a stable complex throughout the cell cycle and that their association with ORC4 and ORC5 is stabilized transiently when ORC1 accumulates on chromatin and associates with the ORC2–5 complex from late G₁ to early S phase.

Recruitment of ORCs 2-5 to a Non-chromatin Nuclear Structure through Interaction with ORC1—Although most ORC1 protein was found in a non-chromatin nuclear fraction in extracts from asynchronously growing cells, ORCs 2-5 partitioned into both DNase I-soluble and -insoluble fractions (Fig. 1C). Because accumulated ORC1 appeared to readily associate with ORCs 2-5 (Fig. 4), we speculated that ORCs 2-5 are recruited to the DNase I-insoluble fraction through their association with ORC1. To determine whether the re-distribution of ORCs 2-5 to the DNase I-insoluble fraction is cell cycle-dependent and occurs in G₁, we fractionated ORC1 and ORC2 from synchronously growing cells after release from TN16-mediated arrest by DNase I digestion sensitivity (Fig. 5). From 0 (M phase) to 6 h (early G₁ phase), most cellular ORC2 was soluble with DNase I. Subsequently, ORC2 started to appear in the insoluble fraction at 9 h and peaked at 12 h. This temporal association of ORC2 with the nuclease-insoluble fraction correlates well with the abundance of ORC1 in this fraction.

To obtain more convincing evidence that ORC1 recruits ORCs 2–5 to DNase I-insoluble nuclear structures, we artificially eliminated ORC1 from cells by RNA interference (RNAi) and monitored the distribution of ORC2 in nuclear structures. As shown in Fig. 6A, within 2 days of transfection of ORC1

FIG. 4. Cell cycle-dependent oscillation of the ORC complex status. A, FACS analysis of the DNA content of cells withdrawn at the indicated time points after release from M phase arrest imposed by TN16 treatment are indicated, with an estimation of cell cycle phase (*upper panel*). Quantitative immunoblot analysis of ORC subunits and cyclin E was performed on whole cell lysates, and analysis of MCM3 was performed with the Triton-insoluble fraction (*MCM3 P*) prepared from an equivalent number of cells (1×10^5) at each time point (*lower left panels*). Relative band intensities of ORC1 (closed circles) and cyclin E (open triangles) are expressed relative to their highest value, as shown in the lower graph at right. The immunoprecipitate with #209 (anti-ORC1; B) or 3B7 (anti-ORC2; C) from the 0.3 M extract at each time point was analyzed by immunoblot analysis with anti-ORC1 to -5 antibodies.

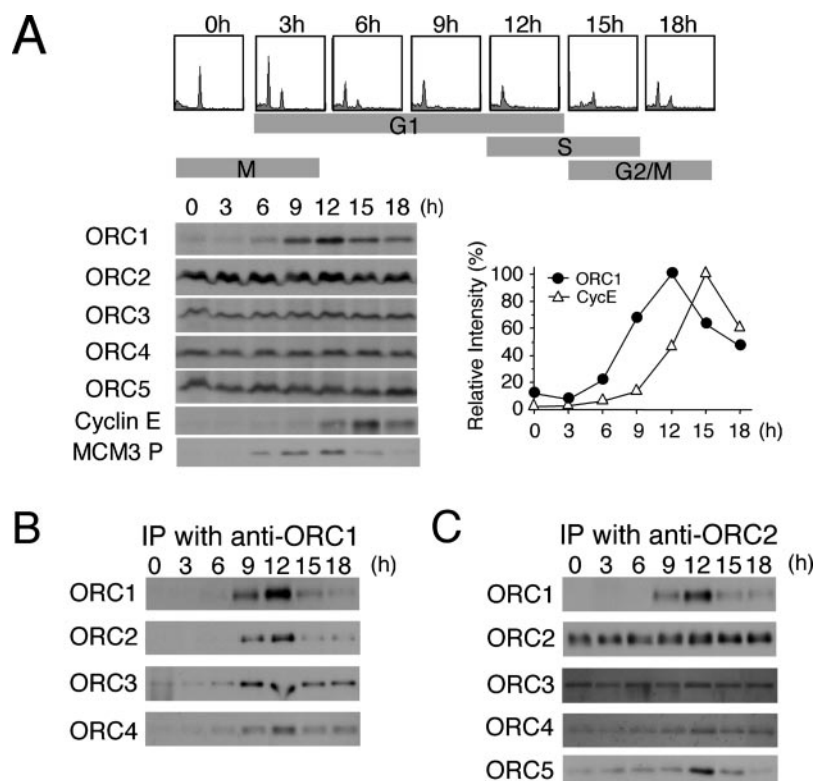
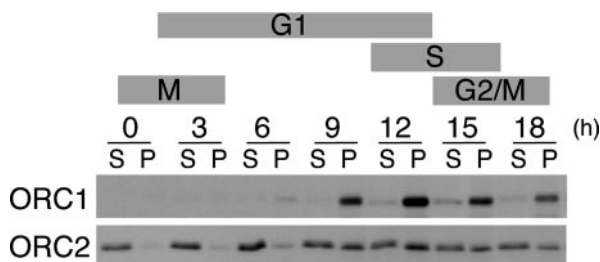


FIG. 5. Cell cycle-dependent partitioning of ORC1 and ORC2 between sub-nuclear fractions. The Triton-insoluble fraction obtained from samples prepared from cells released from TN16-mediated arrest was fractionated by treatment with DNase I, as described in Fig. 1C. Equivalent amounts of soluble (S) and insoluble (P) fractions were subjected to immunoblot analysis with anti-ORC1 and ORC2 antibodies. The corresponding cell cycle phases are shown above.



siRNA into HeLa S3 cells, ORC1 became undetectable. This reduction in ORC1 is specific to the ORC1 siRNA, because siRNAs specific for CDC6, lamin A/C, or luciferase (pGL2) did not affect the level of ORC1 but clearly caused their respective target proteins to disappear. When ORC1 was eliminated from cells, we observed an obvious shift of ORC2 from DNase I-insoluble fractions to DNase I-soluble fractions (Fig. 6B, ORC2). This result strongly supports the ORC1-dependent recruitment of ORC2 to DNase I-insoluble fractions as mentioned above.

The Loading of MCM onto Chromatin Requires the ORC1-5 Complex and CDC6 Protein—We observed the temporal formation of the ORC1-5 complex in non-chromatin nuclear structures in G_1 phase human cells. What is the functional meaning of this assembly? In budding yeast, MCM is loaded onto origin DNA in an ORC- and CDC6-dependent manner to form the pre-RC. In mammalian cells, the loading of MCM onto chromatin in G_1 is simultaneous with the accumulation of ORC1 (Fig. 4) (31, 35). This result implies that ORC1-5 complex formation may be required for loading MCM onto chromatin. To test this possibility, we analyzed the effect of the ORC1-specific siRNA on MCM loading. The level of MCM3 in the chromatin fraction

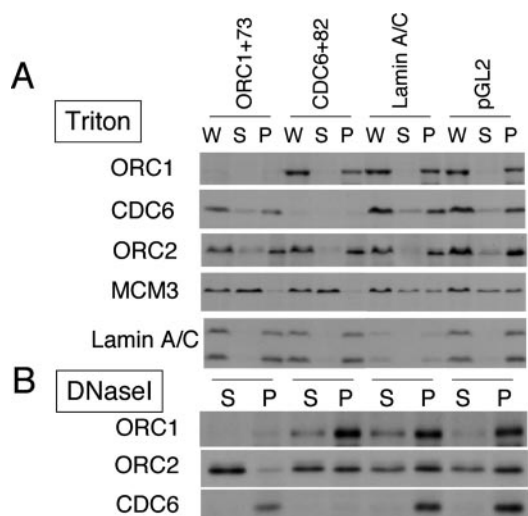


FIG. 6. Analysis of the status of ORC2 and MCM3 statuses in nuclei subjected to ORC1 and CDC6 RNAi. A, HeLa S3 cells were transfected with siRNA specific for ORC1 (*ORC1+73*), CDC6 (*CDC6+82*), Lamin A/C (*Lamin A/C*), and luciferase (*pGL2*). Two days after transfection, cells were harvested and fractionated with 0.1% TX-100mCSK (A) and DNase I (B). Proteins obtained from 1×10^5 cells were subjected to immunoblot analysis with antibodies against ORC1, CDC6, ORC2, MCM3, and Lamin A/C. Sets of soluble (*lanes S*) and insoluble (*lanes P*) fractions prepared by two different treatment methods were studied. A, whole cell extracts.

(Triton ppt) was greatly diminished by the reduction of ORC1 in HeLa S3 cells (Fig. 6A), strongly suggesting that the loading of MCM onto chromatin is not mediated by ORCs 2-5 but by the complete ORC1-5 complex. Interestingly, the elimination of CDC6 from cells by RNAi inhibited MCM loading. Thus, both CDC6 and ORCs1-5 are necessary for MCM loading onto chromatin in human cells. It is noteworthy that CDC6-specific siRNA treatment did not interfere with the association of ORC2 with the DNase I-insoluble fraction. On the other hand, elimination of ORC1 also did not affect the association of CDC6

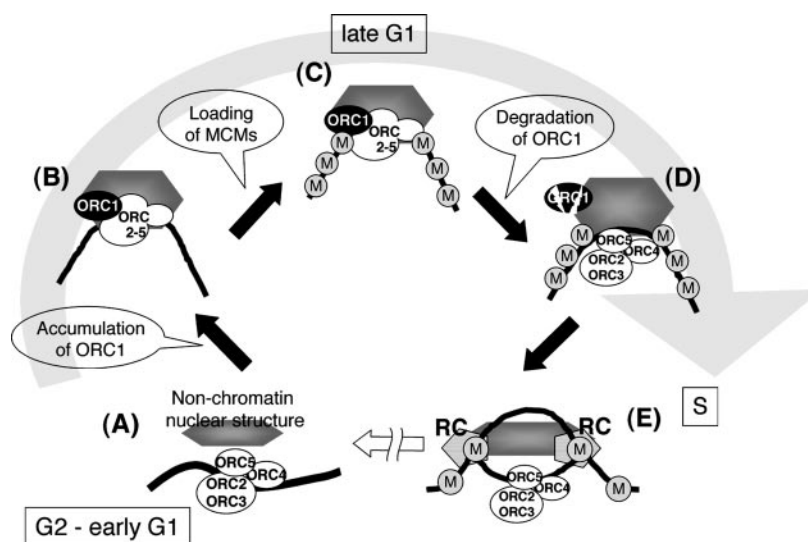


FIG. 7. Cell cycle-dependent assembly of the human ORC1-5 complex and its association with non-chromatin nuclear structures. From G_2 to early G_1 , ORC1 is present at very low levels in nuclei. ORC2-5 subunits associate with chromatin DNA but not with non-chromatin nuclear structures (A). During the progression of G_1 , as judged by the accumulation of ORC1, the ORC1-5 complex is formed by the association of ORC1 with ORCs 2-5, and the interaction between ORCs2/3 and ORCs4/5 is simultaneously stabilized (B). Once formed, the complex is tethered to non-chromatin nuclear structures, and MCM (M) is loaded onto chromatin DNA (C). We propose that complex formation determines whether and when potential origins fire. The degradation of ORC1 returns the ORC2-5 complex to its G_2 /M state (D). Subsequently, further initiation steps can then occur, including the assembly of the DNA synthesis apparatus (RC, E). The dramatic cycle of assembly and disassembly of initiation proteins, including ORC, has a role in blocking the re-firing of origins in the same cell cycle.

with nuclease-insoluble fractions. Thus, the association of CDC6 with nuclear structures and the formation of the ORC1-5 complex on nuclear structures are independent.

DISCUSSION

ORC was originally identified in budding yeast as a complex of six different subunits. All six subunit components of ORC have been identified in various eukaryotes, including humans, indicating that the configuration of the complex is conserved among eukaryotes (7, 36). To date, stable ORC1-6 complexes have been isolated from yeast, flies, and frogs. However, although we detected the ORC1-5 complex in human cell lysates by immunoprecipitation with anti-ORC1 or ORC2 antibodies, we could detect ORC6 in these precipitates neither by the sensitive technique of mass spectrometry (Fig. 2) nor by immunoblot analysis with the anti-ORC6 antibody (data not shown). Thus, ORC6 in human cells may interact with other ORC subunits only weakly, if at all. The same limited affinity of ORC6 for the ORC1-5 complex has been reported for reconstitution experiments using a baculovirus expression system (21, 22). These findings do not necessarily mean that ORC6 is less important for ORC function, because it has been reported that *Drosophila* ORC6 is important for the specific binding of ORC to origin DNA (37). Therefore, ORC6 has a role in the regulation of ORC activity by its transient interaction with the ORC1-5 complex. Interestingly, it has been reported that human ORC6 has a role as a kinetochore complex component, in addition to its role in the initiation of replication (38). Further studies of its behavior during the cell cycle will be necessary to understand how human ORC6 functions in replication.

We have demonstrated that the appearance of the ORC1-5 complex is cell cycle-dependent and regulated by the ORC1 cycle. Furthermore, ORC2 and ORC3 are always in a stable complex, but ORC4 and ORC5 are separable from ORC2 and ORC3 in the absence of ORC1. Thus, human ORC subunits have a dynamic assembly mechanism that is regulated primarily by the level of ORC1. This result indicates that the subunit configuration of ORC in animal cells is apparently different from that in budding yeast and that there are multiple assembly states, each of which has a distinct role in regulating

replication complex formation at origins (Fig. 7).

A prominent protein assembly in human cells is the ORC2-5 complex, which is always found in the chromatin fraction. It has been reported that ORC proteins specifically bind to replication origin sequences in budding yeast, fission yeast, and *Drosophila* (1, 37, 39). Furthermore, this association is maintained throughout the cell cycle in budding yeast. Recent studies have demonstrated that human ORC2 and ORC3 bind to the Epstein-Barr virus replication origin (oriP) and that ORC2 binds to a potential replication origin region in the human MCM4 locus throughout the cell cycle (40). In contrast, human ORC1 associates with the MCM4 origin only in G_1 phase (40). The ORC2-5/chromatin complex that we have observed associates with ORC1 in G_1 . Due to the coincidence of the reported origin association and our observed chromatin binding of ORC subunits during the cell cycle, we suggest that the ORC2-5 complex associates with chromatin by binding to DNA, probably to potential origin sequences (Fig. 7A). If this is the case, human ORCs 2-5 are sufficiently active to recognize potential replication origin sequences and to bind them, like budding yeast ORC.

Subsequently, some replication origins will be chosen by ORC1 and recruited to nuclear structures where replication machineries assemble (Fig. 7B). Formation of the ORC1-5 complex in nuclear structures promotes binding of MCM to chromatin, which corresponds to pre-RC formation (Fig. 7C). Once MCM is loaded, the ORC1-5 complex disassembles by the degradation of ORC1 (Fig. 7D). Subsequently, further initiation steps occur, including the loading of the DNA synthesis apparatus (Fig. 7E). This proposed mechanism has two implications. The first concerns the selection of origins to be fired from among the many sites potentially bound by the ORC2-5 complex. Thus, ORC1 may determine the timing and order of origin firing by recruiting ORC2-5/chromatin complexes to nuclear structures or sites. The second is to ensure that origins are fired only once per cell cycle, by the inactivation of ORC1 immediately after use. This model is consistent with previous reports that ori- β at the dihydrofolate reductase locus of Chinese hamster ovary cells and that the β -globin locus origin of

HeLa S3 cells associate with similar nuclease-insoluble nuclear structures in late G₁ and dissociate from them after the initiation of replication in S phase (41).

It is well known that in yeast and *Xenopus*, the loading of MCMs onto the ORC/origin complex corresponds to the formation of the pre-RC, a direct precursor of the complex that initiates replication. This step requires the essential components CDC6 and Cdt1, in addition to an active ORC complex (7, 36). We showed with RNAi experiments that both ORC1 and CDC6 are required for the loading of MCMs onto chromatin in human cells (Fig. 6). We also observed that the presence of the ORC2–5 complex in chromatin fractions is not sufficient for MCM loading onto chromatin. In yeast, ORCs 1–6 form a stable complex, and the transient accumulation of activator proteins primes a reaction to MCM loading. As discussed above, if the human ORC2–5 complex functions like the budding yeast ORC1–6 complex, human ORC1 and CDC6 may function as activators. In this respect, because the level of human ORC1 oscillates, so that it accumulates in concert with the loading of MCM, ORC1 may activate ORC functions as CDC6 does in budding yeast. Indeed, ORC1 and CDC6 share significant amino acid sequence similarity and are derived from the same ancestor (42). Nonetheless, human CDC6 exhibits a pattern of oscillation opposite to that of ORC1, accumulating during S phase, peaking in M phase and decreasing in the following G₁ phase (35).² This observation indicates that, although both CDC6 and ORC1 are required for MCM loading in human cells, they have distinct temporal patterns of expression roles and different roles in pre-RC formation.

We have demonstrated that human ORC components exhibit a dynamic pattern of assembly during the cell cycle. Several lines of evidence strongly support the proposal that this assembly directly links temporal and spatial controls in the initiation of replication in human chromosomes. However, many questions remain to be answered: how does ORC recognize specific chromosomal DNAs, how are ATP binding and hydrolysis involved in dynamic assembly and in the initiation mechanism, how do further protein assemblies, for example, those including CDC6, CDT1, and CDC45, develop, and what is the significance of ORC1 degradation prior to origin firing? Further experiments will be necessary to answer these questions and to elucidate the mechanism by which DNA replication is regulated in animal cells.

Acknowledgments—We thank Drs. Hisao Masukata (Osaka University) and Dr. Hiroshi Kimura (Tokyo Medical and Dental University) for critical reading of the manuscript and valuable comments, Drs. Anindya Dutta and Hiroshi Kimura for providing antibodies, and Drs. Mitsuhiro Yanagida and Gohta Goshima (Kyoto University) for valuable suggestions for RNAi analysis.

REFERENCES

- Bell, S. P., and Stillman, B. (1992) *Nature* **357**, 128–134
- Liang, C., and Stillman, B. (1997) *Genes Dev.* **11**, 3375–3386
- Diffley, J. F., Cocker, J. H., Dowell, S. J., and Rowley, A. (1994) *Cell* **78**, 303–316
- Fujita, M., Hori, Y., Shirahige, K., Tsurimoto, T., Yoshikawa, H., and Obuse, C. (1998) *Genes Cells* **3**, 737–749
- Tadokoro, R., Fujita, M., Miura, H., Shirahige, K., Yoshikawa, H., Tsurimoto, T., and Obuse, C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 15881–15889
- Tanaka, T., Knapp, D., and Nasmyth, K. (1997) *Cell* **90**, 649–660
- Bell, S. P., and Dutta, A. (2002) *Annu. Rev. Biochem.* **71**, 333–374
- Gossen, M., Pak, D. T., Hansen, S. K., Acharya, J. K., and Botchan, M. R. (1995) *Science* **270**, 1674–1677
- Pak, D. T., Plumm, M., Chesnokov, I., Huang, D. W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P., and Botchan, M. R. (1997) *Cell* **91**, 311–323
- Carpenter, P. B., Mueller, P. R., and Dunphy, W. G. (1996) *Nature* **379**, 357–360
- Romanowski, P., Madine, M. A., Rowles, A., Blow, J. J., and Laskey, R. A. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 1416–1425
- Tugal, T., Zou, Y. X., Gavin, K., Pappin, D., Canas, B., Kobayashi, R., Hunt, T., and Stillman, B. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32421–32429
- Michelle, F. P., and Michael, R. B. (2001) *Development* **128**, 1697–1707
- Pinto, S., Quintana, D. G., Smith, P., Mihalek, R. M., Hou, Z. H., Boynton, S., Jones, C. J., Hendricks, M., Velinzon, K., Wohlschlegel, J. A., Austin, R. J., Lane, W. S., Tully, T., and Dutta, A. (1999) *Neuron* **23**, 45–54
- Gavin, K. A., Hidaka, M., and Stillman, B. (1995) *Science* **270**, 1667–1671
- Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D. R., Kelly, T. J., and Nevins, J. R. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**, 6977–6984
- Quintana, D. G., Hou, Z., Thome, K. C., Hendricks, M., Saha, P., and Dutta, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 28247–28251
- Quintana, D. G., Thome, K. C., Hou, Z. H., Ligon, A. H., Morton, C. C., and Dutta, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 27137–27145
- Ishiai, M., Dean, F. B., Okumura, K., Abe, M., Moon, K. Y., Amin, A. A., Kagotani, K., Taguchi, H., Murakami, Y., Hanaoka, F., O'Donnell, M., Hurwitz, J., and Eki, T. (1997) *Genomics* **46**, 294–298
- Dhar, S. K., and Dutta, A. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 34983–34988
- Dhar, S. K., Delmolino, L., and Dutta, A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 29067–29071
- Vashee, S., Simanek, P., and Challberg, M. D., and Kelly, T. J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 26666–26673
- Dijkwel, P. A., and Hamlin, J. L. (1995) *Int. Rev. Cytol.* **162**, 455–484
- Ogawa, Y., Takahashi, T., and Masukata, H. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7228–7236
- Kimura, H., Nozaki, N., and Sugimoto, K. (1994) *EMBO J.* **13**, 4311–4320
- Fujita, M., Kiyono, T., Hayaishi, Y., and Ishibashi, M. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 4349–4354
- Fujita, M., Yamada, C., Goto, H., Yokoyama, N., Kuzushima, K., Inagaki, M., and Tsurumi, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25927–25932
- Jiang, W., Wells, N. J., and Hunter, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6193–6198
- Petersen, B. O., Wagnier, C., Marinoni, F., Kramer, E. R., Melixetian, M., Denchi, E. L., Gieffers, C., Matteucci, C., Peters, J. M., and Helin, K. (2000) *Genes Dev.* **14**, 2330–2343
- Asano, M., and Wharton, R. P. (1999) *EMBO J.* **18**, 2435–2448
- Tatsumi, Y., Ohta, S., Kimura, H., Tsurimoto, T., and Obuse, C. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 41528–41534
- Tatsumi, Y., Tsurimoto, T., Shirahige, K., Yoshikawa, H., and Obuse, C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 5904–5910
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001) *Nature* **411**, 494–498
- Ohta, S., Shiomi, Y., Sugino, K., Obuse, O., and Tsurimoto, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 40362–40367
- Mendez, J., Zou-Yang, X. H., Kim, S. Y., Hidaka, M., Tansey, W. P., and Stillman, B. (2002) *Mol. Cell.* **9**, 481–491
- DePamphilis, M., L. (2003) *Gene (Amst.)* **310**, 1–15
- Chesnokov, I., Remus, D., and Botchan, M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 11997–12002
- Prasanth, S. G., Prasanth, K. V., and Stillman, B. (2002) *Science* **297**, 1026–1031
- Chuang, R. Y., and Kelly, T. J. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 2656–2661
- Ladenburger, E. M., Keller, C., and Knippers, R. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1036–1048
- Djeliova, V., Russev, G., and Anachkova, B. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 3181–3187
- Liu, J., Smith, C. L., DeRyckere, D., DeAngelis, K., Martin, G. S., and Berger, J. M. (2000) *Mol. Cell.* **6**, 637–648

² Y. Tatsumi and C. Obuse, unpublished results.

Association of Human Origin Recognition Complex 1 with Chromatin DNA and Nuclease-resistant Nuclear Structures*

(Received for publication, October 19, 1999, and in revised form, December 6, 1999)

Yasutoshi Tatsumi, Toshiki Tsurimoto, Katsuhiko Shirahige, Hiroshi Yoshikawa,
and Chikashi Obuse†

From the Nara Institute of Science and Technology, 8916-5 Takayama, Ikoma, Nara 630-0101, Japan

An origin recognition complex (ORC) consisting of six polypeptides has been identified as a DNA replication origin-binding factor in *Saccharomyces cerevisiae*. Homologues of ORC subunits have been discovered among eukaryotes, and we have prepared monoclonal antibodies against a human homologue of ORC1 (hORC1) to study its localization in human cells. It was thus found to associate with nuclei throughout the cell cycle and to be resistant to nonionic detergent treatment, in contrast to MCM proteins, which are other replication factors, the association of which with nuclei is clearly dependent on the phase of the cell cycle. A characteristic feature of hORC1 is dissociation by NaCl in a narrow concentration range around 0.25 M, suggesting interaction with some specific partner(s) in nuclei. Nuclease treatment experiments and UV cross-linking experiments further indicated interaction with both nuclease-resistant nuclear structures and chromatin DNA. Although its DNA binding was unaffected, some variation in the cell cycle was apparent, the association with nuclear structures being less stable in the M phase. Interestingly, the less stable association occurred concomitantly with hyperphosphorylation of hORC1, suggesting that this hyperphosphorylation may be involved in M phase changes.

The replication of eukaryotic chromosome occurs in a highly regulated manner during the S phase. It is important to understand coordinated action of various proteins acting on specific cis-elements during initiation of chromosomal replication. In budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), the origin recognition complex (ORC),¹ composed of six polypeptides, is essential for initiation of DNA replication, binding specifically to replication origins throughout the cell cycle (1–6). Prior to the initiation of DNA replication, ORC forms a large protein complex, called a prereplicative complex, by association with other initiation factors, including CDC6 and MCM proteins. After the initiation of DNA replication, the prereplicative complex change to the postreplicative form as indicated by dissociation of factors from ORC in parallel with alteration of the ORC-DNA interaction (3, 5–8). Thus, dynamic change of DNA-protein

complexes at replication origins in S phase appears to be closely connected with the initiation of DNA replication.

The counterparts of prereplicative complex components, such as ORC, CDC6, and MCMs, have been identified in various eukaryotes. Thus, the basic mechanisms for initiation of DNA replication seem to be highly conserved. Putative ORC subunits constituting similar multiprotein complexes as that in *S. cerevisiae* have been identified in *Drosophila* (9, 10) and *Xenopus* (11–15). In the latter, depletion of ORC from egg extracts results in inhibition of the initiation of DNA replication (11–14). Similarly, in *Drosophila*, a conditional mutation in the DmORC2 gene demonstrated strong effects (16). In human cells, putative ORC genes have also been identified (15, 17–23), and interaction of their products has been reported (17, 21–23), suggesting that a similar protein complex might be functional during DNA replication in human cells.

Recent studies have demonstrated that several events in nuclei, including DNA replication, take place in specialized compartments, in which specific factors assemble in highly organized structures. It is essential to ascertain the distribution of replication proteins among subcellular fractions and their interactions to understand how DNA replication is initiated and otherwise regulated. The subcellular localization of MCMs has been well characterized in eukaryotes from yeast to mammalian cells; they associate with prereplicative chromatin and dissociate from it upon initiation of replication (5, 8, 24–27). Subcellular localization of CDC6 proteins also appears to be cell cycle dependent in mammalian cells (28–31). CDC6 is in nuclei in G₁ phase and transferred to the cytoplasm when cells enter into S phase. Change in localization of the two factors, MCMs and CDC6, implies a mechanism for prevention of re-replication of chromosomal DNA. In contrast, ORC in budding yeast associates with chromatin DNA in a sequence-specific manner throughout the cell cycle, suggesting that ORC functions as the landing pad for CDC6, MCMs and other factors to form prereplicative complex (3, 5, 8). The cellular localization of ORC in higher eukaryotes has not yet been elucidated in detail except for the *Xenopus* case, in which ORC dissociates from metaphase chromatin in an egg extract cell-free system (13, 32).

In mammalian cells, the mRNA expression of ORC1 is cell cycle-regulated by an E2F responsible promoter like that of CDC6 (18). In addition, the abundance of *Drosophila* ORC1 protein changes with the development stage and the cell cycle, accumulating in proliferating cells in G₁/S (33). Furthermore, ectopic expression of ORC1 during *Drosophila* development alters the proliferation program, suggesting that ORC1 is a main contributor to cell cycle regulation (33). In contrast to ORC1, expression of ORC2–5 seems not be cell cycle regulated in human cells (21, 22, 28, 34). Thus, although ectopic expression of ORC1 in mammalian cells does not drive cells into S phase (18), ORC1 may be one of limiting factor for initiation of

* This work was supported in part by a grant from the Ministry of Education, Science, Sports and Culture of Japan. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

† To whom correspondence should be addressed. Tel.: 81-743-72-5512; Fax: 81-743-72-5519; E-mail: c-obuse@bs.aist-nara.ac.jp.

¹ The abbreviations used are: ORC, origin recognition complex; hORC, human ORC; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate-buffered saline; Pipes, 1,4-piperazinediethanesulfonic acid; FCS, fetal calf serum; FACS, fluorescence-activated cell sorter; MCM, minichromosome maintenance.

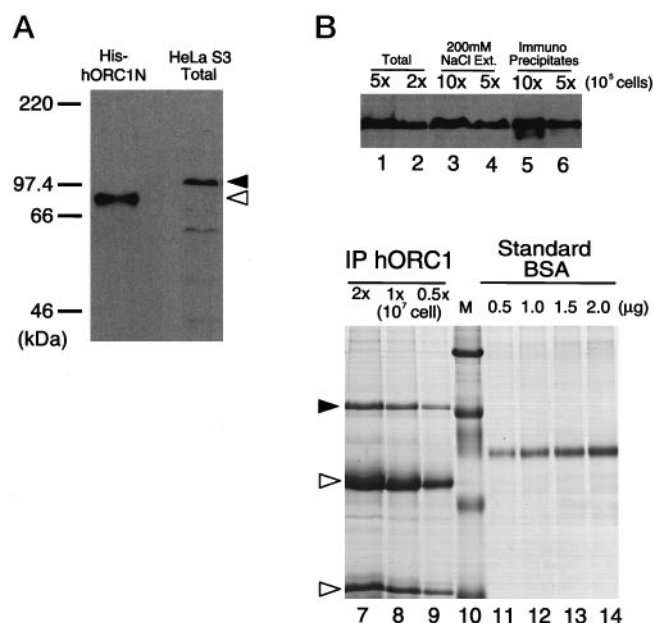


FIG. 1. Detection of cellular hORC1 protein with a monoclonal antibody. A, 100 ng of purified his-hORC1N and total cell lysate from 1×10^5 HeLa S3 cells (*HeLa S3 Total*) were subjected to immunoblotting with 3A2A. The filled and open arrowheads indicate hORC1 and His-hORC1N, respectively. The weak additional band positioned at ~60 kDa in HeLa S3 total cell lysate is a degradation product of hORC1 protein, appearing occasionally at various levels. B, hORC1 was immunoprecipitated from a 0.2 M NaCl extract of HeLa S3 cells with 3A2A. Total protein (lanes 1 and 2), the 0.2 M NaCl extract from Triton extracted cells (lanes 3 and 4), and immunoprecipitates from the 0.2 M NaCl extract (lanes 5 and 6) were subjected to immunoblotting and detection with 3A2A (upper panel). Immunoprecipitates from the indicated numbers of cells (lanes 7–9) and control bovine serum albumin (lanes 11–14) were subjected to SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue (lower panel). In lane 10, Rainbow-colored protein molecular weight markers (Amersham Pharmacia Biotech) were run as a size marker. The filled arrowhead indicates hORC1, and open arrowheads indicate IgG (top and bottom arrows indicate heavy and light chains, respectively).

their replication (34). Elucidation of its precise localization and dynamics in human cells should help uncover roles of the ORC complex in chromosomal DNA replication. This was the aim of the present cell fractionation and immunostaining study with a newly prepared anti-human ORC1 monoclonal antibody.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture and Synchronization—HeLa S3 and normal human fibroblast WI38 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal calf serum (FCS). For synchronization, exponentially growing HeLa S3 cells were arrested at M phase for 24 h with 150 ng/ml of TN16 (WAKO, Osaka, Japan) or with 2.5 mM of thymidine at the S phase for 24 h. For double thymidine blocking, HeLa S3 cells were incubated with 2.5 mM of thymidine for 24 h twice with an intervening 12 h of incubation without thymidine. WI38 cells were synchronized by serum starvation. In this experiment, 30% confluent WI38 cells were incubated with Dulbecco's modified Eagle's medium without serum for 36–48 h and then released from the starvation by addition of 10% FCS. The cell cycle synchronizations were checked by flow cytometry (Becton Dickinson) after propidium iodide staining with a Cycle Test kit (Becton Dickinson).

Fractionations of Cellular Proteins—The adenovirus-transformed human embryonic kidney cell line, 293, was grown, and its cellular proteins were fractionated as described previously (35). HeLa and WI38 cell extracts were prepared essentially as detailed earlier (36), using modified CSK buffer (0.1% TX-100mCSK; 10 mM Pipes, pH 7.9, 100 mM NaCl, 300 mM sucrose, 0.1% Triton X-100 (Triton), 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 10 μ g/ml aprotinin, 20 mM β -glycerophosphate, 200 μ M Na₃VO₄, 10 mM NaF, 0.2 μ M calyculin A, and 1 μ M staurosporine). Aliquots of 5×10^6 cells in 100-mm dishes were washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and lysed with 1 ml of 0.1% TX-100mCSK for 10 min on ice. After centrifugation (3000 rpm for 3 min at

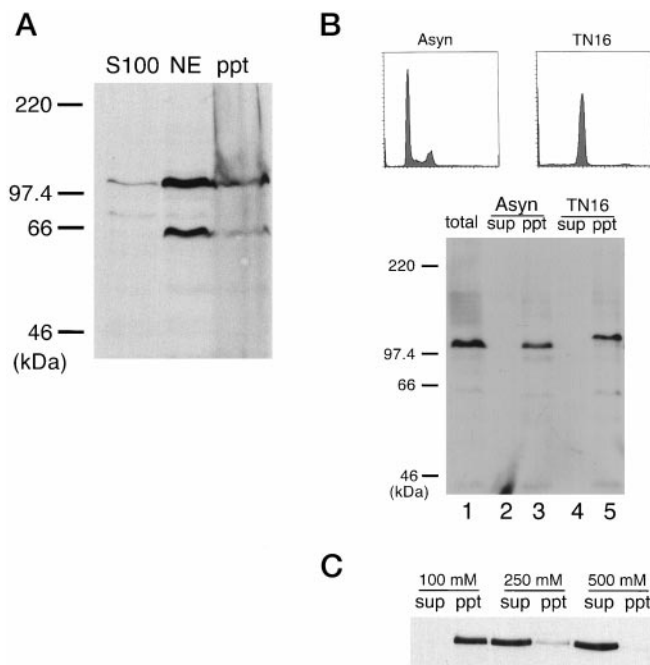


FIG. 2. Nuclear hORC1 protein associated with nonionic detergent-resistant nuclear structures. A, the cytoplasmic fraction (S100), the 0.2 M NaCl-soluble fraction (NE), and the remaining insoluble fraction (ppt) from 5×10^5 kidney 293 cells were immunoblotted with 3A2A. B, HeLa S3 cells, growing asynchronously (*Asyn*) (lanes 2 and 3) or arrested with TN16 at M phase (lanes 4 and 5) were treated with 0.1% TX-100mCSK, and the supernatant (*sup*) (lanes 2 and 4) and the precipitated fractions were obtained after centrifugation (*ppt*) (lanes 3 and 5). Proteins from 2×10^5 cells were analyzed by immunoblotting with 3A2A. The total cell lysate obtained from asynchronous cells before fractionation is shown in lane 1. FACS analyses of the used cell preparations are shown in the top panels. C, the insoluble fraction from HeLa S3 cells after Triton extraction was incubated on ice for 30 min in 0.1% TX-CSK supplemented with the indicated concentrations of NaCl. After centrifugation, the supernatant (*sup*) and precipitated (*ppt*) fractions were analyzed by immunoblotting with 3A2A.

4 °C), the debris was washed once more with the same volume of ice-cold 0.1% TX-100mCSK. For DNase I or NaCl extraction, the debris from the second 0.1% TX-100mCSK extraction was resuspended in 1 ml of ice-cold 0.1% TX-100mCSK supplemented with indicated amounts of NaCl or DNase I (Roche Molecular Biochemicals) and incubated further at the indicated temperature. After incubation, insoluble and soluble materials were separated by centrifugation. The chromatin DNA retained after this DNase I treatment was isolated from the insoluble fraction by treatment with 20 mM EDTA, 0.5% SDS, and 100 μ g/ml RNase A in 0.1% TX-100mCSK at 37 °C for 30 min followed by 2 h incubation with Protease K (200 μ g/ml). The DNA was extracted with phenol-chloroform (1:1), precipitated with ethanol, separated by electrophoresis in 0.8% agarose, and quantified with an image analyzer (ATTO, Tokyo, Japan).

Antibodies—Hybridoma cell lines were prepared from Balb/c mice after immunization with synthetic 15-amino acid polypeptides from within the human ORC amino acid sequence. Clones were screened by their reactivity against a recombinant human ORC1 (hORC1) protein (amino acids 1–698) tagged with His₆ at the N terminus (His hORC1N) by immunoblotting. Two positive clones, 3C1B (producing IgM) and 3A2A (producing IgG1) were obtained and used in this study. Rabbit anti-murine MCM3 (mMCM3) antiserum was kindly provided by Dr. H. Kimura (Oxford University). This antibody recognized the corresponding human homologue on immunoblotting (25). Goat anti-lamin B antibody was purchased from Santa Cruz Biotechnology.

Immunoprecipitation and λ Phosphatase Treatment—For immunoprecipitation of hORC1, anti-hORC1 antibody (3A2A) was added to 0.2 M NaCl extracts of HeLa S3 cells as described above at a concentration of 20 μ g/ml. After 8 h incubation at 4 °C, protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia Biotech) was added to the mixture at 20 μ l resin/ml, and incubation was continued for an additional 2 h. After centrifugation at 3000 rpm for 3 min, the precipitated beads were washed twice with Tris-buffered saline (30 mM Tris, 200 mM NaCl, pH 7.5) + 0.1% Tween 20.

To test the shift of hORC1 by phosphorylation, the immunoprecipitate was treated with λ phosphatase (20 units/ μ l; New England Biolabs) in $1 \times \lambda$ phosphatase buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 0.1 mM EDTA, 2 mM MnCl_2 , 5 mM dithiothreitol, 0.01% Brij 35, 0.1 mg/ml bovine serum albumin) at 30 °C for 30 min. The reaction was stopped by the addition of SDS sample buffer, and the products were separated by SDS-PAGE.

Western Blotting—All procedures were performed at room temperature except for blocking at 4 °C. Samples were separated by 12.5% SDS-PAGE and transferred to polyvinylidene fluoride membranes (Amersham Pharmacia Biotech) using a semidry transfer apparatus in transfer solution (100 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS, pH 8.3) at 3 mA/cm² for 60 min. After blocking of membranes, achieved with Tris-buffered saline + 0.1% Tween 20 containing 10% dry milk (SNOW Brand, Sapporo, Japan) at 4 °C overnight, they were incubated first with antibodies in Tris-buffered saline + 0.1% Tween 20 containing 20% FCS for 1 h, followed by peroxidase-labeled second antibodies in the same solution for 1 h. Antibody reactive protein bands were visualized using the ECL system (Amersham Pharmacia Biotech).

Immunostaining—All procedures were carried out at room temperature. Cells on cover glasses were washed with CSK buffer without Triton three times, and fixed with 2.5% formalin solution in CSK for 10 min. After three washes with CSK, the fixed cells were incubated with PBS containing 10% FCS and 0.1% Triton for 30 min, for masking and permeabilization. Following a further three washes with 10% FCS in PBS, the cover glasses were incubated with the culture supernatant of clone 3C1B for 1 h, washed with 10% FCS in PBS three times, and incubated with Rhodamin-conjugated second antibody (MBL, Nagoya, Japan; reactive with both IgM and IgG) and 0.02 μ g/ml of 4,6-diamidino-2-phenylindole in PBS containing 10% FCS for 1 h. After washing with PBS four times, the samples were mounted on slide glasses, and fluorescent signals were visualized with a Leica DMRBE and captured with a Photometrics PXL.

UV Cross-linking—HeLa S3 cells grown in 100-mm dishes (5×10^6 cells) were washed twice with PBS and irradiated with UV at the indicated doses in an UV chamber (Spectronics Corp., Westbury, NY) in 10 ml of PBS. The cells were lysed in 500 μ l of 0.1% TX-100mCSK at 4 °C for 10 min, and the insoluble fraction was obtained after centrifugation. NaCl extracts were prepared as described under "Fractionations of Cellular Proteins," above.

RESULTS

Detection of hORC1 from Human Cell Lysates—We have developed hybridoma cell lines expressing antibodies 3A2A and 3C1B against specific oligopeptides of the hORC1 protein. Because they were screened for a recombinant hORC1 fragment produced in *Escherichia coli* (containing amino acids 1–698), it was necessary to test whether they could detect hORC1 protein specifically in human cell lysates. When we applied 1×10^5 HeLa cells to an immunoblot analysis, a major protein band of 97 kDa could be detected with monoclonal antibodies 3A2A (Fig. 1A) and 3C1B (data not shown). As the molecular mass of

the detected band was in good agreement with the predicted molecular mass of hORC1, it was concluded that these antibodies specifically recognize hORC1 protein.

Next we estimated the amount of hORC1 in human cells by the immunoprecipitation method. First, the recovery of hORC1 by immunoprecipitation was calculated as follows. Cellular proteins from a fixed number of HeLa cells were prepared by using: 1) a total cell lysate obtained by SDS lysis, and 2) a soluble fraction obtained as an 0.2 M NaCl extract. About 50% of hORC1 in the total cell lysate was recovered in the latter soluble fraction (Fig. 1B, upper panel). Because about 80% of hORC1 in the 0.2 M NaCl extract was recovered in the immunoprecipitated fraction (Fig. 1B, upper panel), 3A2A could precipitate the native hORC1 protein in the cell extract efficiently. Thus, 40% of the cellular hORC1 protein could be recovered by immunoprecipitation. When the immunoprecipitate from HeLa cells was analyzed by SDS-PAGE followed by Coomassie Blue staining, only a hORC1 band appeared other than the heavy and light chains of the IgG (Fig. 1B, lower panel), indicating

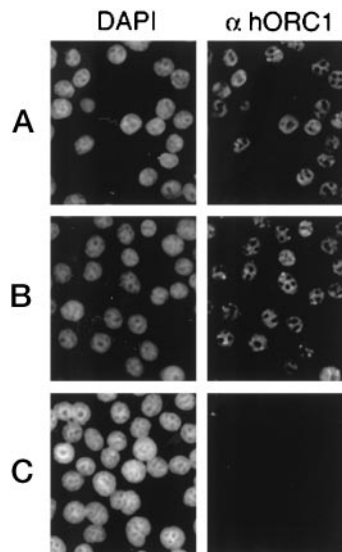
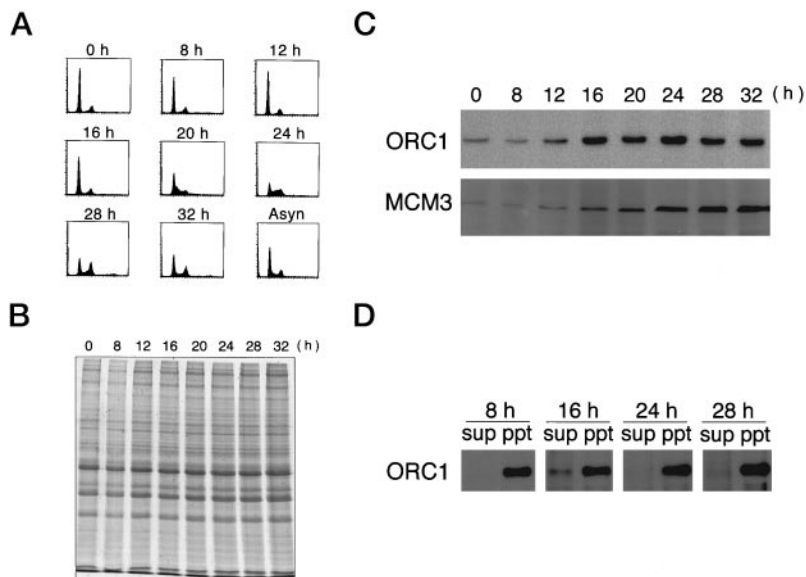


FIG. 3. Localization of hORC1 in cells by immunostaining with 3C1B. Cells untreated (A), extracted with Triton (B), or extracted with 250 mM NaCl (C) were fixed with formaldehyde and stained with 3C1B and 4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

FIG. 4. hORC1 protein in synchronously growing normal human fibroblast WI38 cell. WI38 cells were released from serum starvation with 10% FCS, harvested at the indicated time points, and analyzed by FACS analysis (A). Total cell lysates obtained from the same number of trichloroacetic acid-fixed cells (1×10^6) were applied to SDS-PAGE, and the gels were stained with Coomassie Blue (B) or immunoblotted with 3A2A or anti-MCM3 antiserum (C). Cells harvested at the indicated time points were treated with 0.1% TX-100mCSK, fractionated into soluble (sup) and insoluble (ppt) fractions as described for Fig. 2, and analyzed by immunoblotting with 3A2A (D). Exposures were adjusted to give the same intensity of hORC1 in precipitated fractions.



that hORC1 in the 0.2 M NaCl extract is mostly a single molecule entity. Using bovine serum albumin bands as the standard, we estimated that about 1 μ g of hORC1 was recovered from 1×10^7 cells (Fig. 1B, lower panel). Using the above factors for extraction and immunoprecipitation efficiencies, the cellular content of hORC1 was calculated to be approximately 1.6×10^6 molecules per HeLa cell.

Association of hORC1 with Nonionic Detergent-resistant Nuclear Structure throughout Cell Cycle—The subcellular localization of hORC1 was roughly studied with a cytoplasmic extract, 0.2 M NaCl nuclear extract, and the remaining cell debris from 293 cells. As shown in Fig. 2A, the majority of hORC1 was detected in the 0.2 M extract, suggesting a predominant localization in nuclei. It is known that nuclear proteins associated with some nuclear structures are retained in nuclei even after nonionic detergent treatment. When HeLa cells growing asynchronously and arrested in M phase by TN16 were treated with CSK buffer containing 0.1% Triton (0.1% TX-100mCSK), all hORC1 remained the insoluble fraction (Fig. 2B). In contrast the other replication factors, MCMs were separated in two forms, soluble and insoluble, by this treatment (see Fig. 5A). It is noteworthy that a mobility shift of hORC1 in SDS-PAGE was observed in M phase-arrested cells, suggesting some modification as described below.

Solubility of hORC1 in the Triton-insoluble fraction was studied with increasing concentrations of NaCl, as shown in Fig. 2C. Interestingly, hORC1 was completely insoluble with 100 mM NaCl, whereas more than 90% of hORC1 became soluble with 250 mM NaCl.

To obtain convincing evidence of nuclear localization of hORC1 by fractionation of cellular proteins, immunostaining of HeLa cells was performed with the 3C1B antibody. As shown in Fig. 3, hORC1 was found in the nuclei in both unwashed (Fig. 3A) and Triton-washed HeLa cells (Fig. 3B). However, after extraction with 250 mM NaCl, hORC1 signals could no longer be detected (Fig. 3C), consistent with the cell fractionation experiments, indicating that hORC1 mainly exists in nuclei, but it efficiently dissociated at 0.25 M NaCl.

To investigate the localization of hORC1 during the cell cycle, synchronously growing WI38 cells were studied (Fig. 4). Flow cytometric analysis revealed more than 90% of cells to be arrested once in G₀ and to enter S phase at 20 or 24 h after serum addition (Fig. 4A). The total cell lysate was subjected to SDS-PAGE (Fig. 4B), and hORC1 and MCM3 were detected by immunoblotting (Fig. 4C). These results demonstrated hORC1 protein to begin to increase at 12–16 h, just before the onset of S phase, as also observed for MCM3 proteins. Using the same samples, retention of hORC1 in nuclei was tested by detergent treatment. As shown in Fig. 4D, all hORC1 existed in the insoluble fraction throughout the cell cycle except for partial release in the 16 h sample. Because the increase of hORC1 protein was greatest during 12–16 h, the soluble protein may correspond to newly synthesized molecules not yet imported into the nuclei.

Association of hORC1 with Both Chromatin DNA and Nuclease-resistant Nuclear Structure—In line with a previous report (36), about half of the MCM3 in cells became soluble with Triton, but the rest remained insoluble (Fig. 5A, lanes 2 and 3). Furthermore, the latter was released from nuclear debris, in parallel with solubilization of DNA by DNase I treatment, indicating a chromatin-bound nature (Ref. 36; Fig. 5, A, lanes 4–11, and B). Association of MCMs with chromatin DNA was also demonstrated by UV cross-linking experiments, as shown in Fig. 5, C and D. The chromatin-bound MCM3, soluble on 0.5 M NaCl treatment (Ref. 36; data not shown), became insoluble upon UV irradiation in a dose dependent manner (Fig. 5, C,

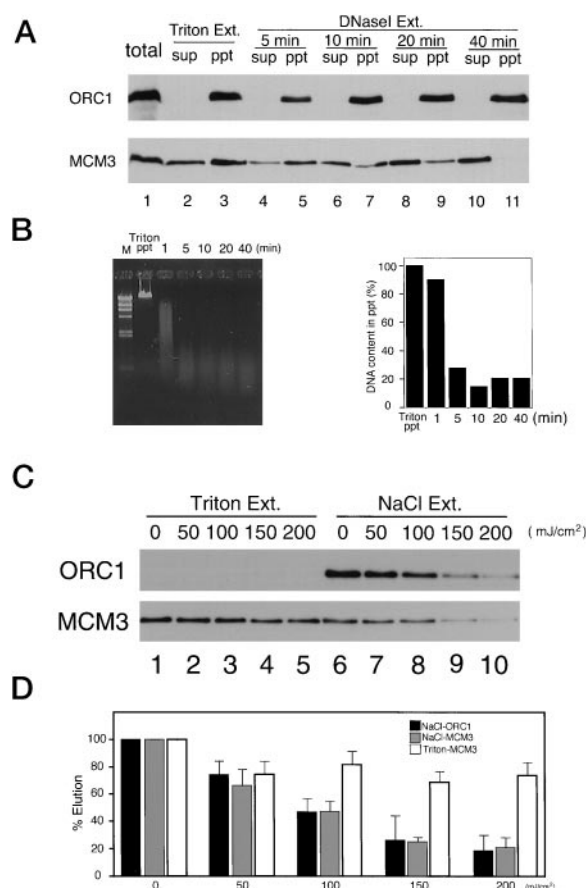


FIG. 5. hORC1 associates with both chromatin DNA and nuclease-resistant nuclear structures. Triton-treated HeLa S3 cells were incubated with 1000 units/ml of DNase I at 25 °C for the indicated period, in the presence of 1 mM ATP. Addition of ATP did not affect the results of ORC (data not shown). After centrifugation, the supernatant (sup) and the precipitate (ppt) fractions were analyzed by immunoblotting with 3A2A antibody and anti-MCM3 antiserum (A). Chromatin DNA was purified from the precipitated fraction and analyzed on 0.8% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide (B, left panel). Amount of the DNA relative to the starting materials (Triton ppt) is shown in the right panel of B. λ phage DNA digested with HindIII was introduced into lane M. Living HeLa S3 cells on dishes were irradiated with UV at 50 (lanes 2 and 7), 100 (lanes 3 and 8), 150 (lanes 4 and 9), and 200 mJ/cm² (lanes 5 and 10) and subjected to successive extractions with Triton (lanes 1–5) and 500 mM NaCl (lanes 6–10) as described under “Experimental Procedures.” hORC1 and MCM3 were detected by immunoblotting (C). The intensity of each band was measured and the relative value using that of nonirradiated cells as 100% is indicated by the height of the bar (D). Standard evaluations were obtained from three independent experiments.

lanes 6–10, and D). The dose required to make half of the MCM3 insoluble was calculated to be 100 mJ/cm². On the other hand, the MCM3 in the Triton-soluble fraction was scarcely cross-linked in this UV range (Fig. 5, C, lanes 1–5, and D). All hORC1 was soluble in 0.5 M NaCl before UV irradiation (Fig. 2C), becoming insoluble in a UV dose-dependent manner even in the presence of 0.5 M NaCl, like the Triton-insoluble MCM3 (Fig. 5, C and D). It has been reported that only proteins that associate directly with DNA could be cross-linked by UV (37). Thus, these results suggest that most MCM3 and the hORC1 retained in nuclei after Triton washing are linked directly with chromatin DNA.

To determine whether the same mode of association is involved, the susceptibility of hORC1 to nuclease treatment in the Triton-insoluble fraction was compared with that of MCM3. On incubation with DNase I for 40 min, when all MCM3 became soluble and less than 20% of total chromatin DNA shorter

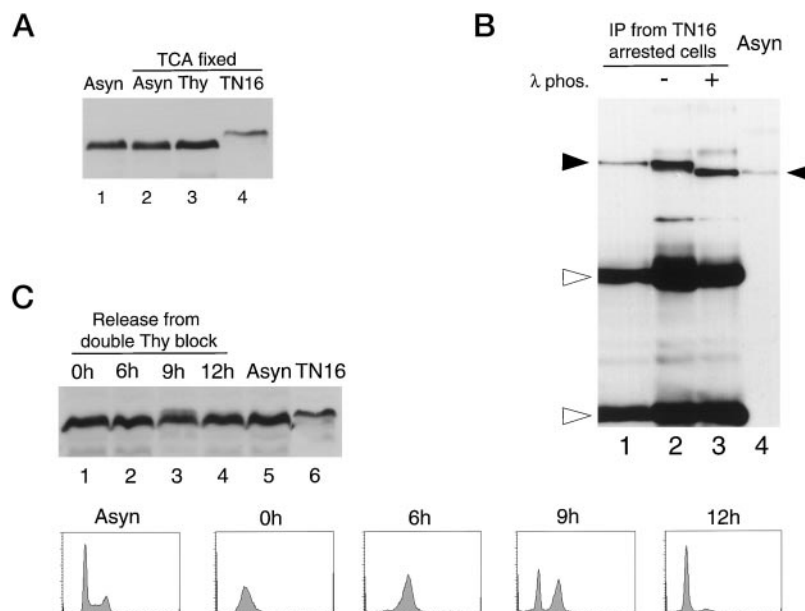


FIG. 6. Phosphorylation of hORC1 protein in the M phase. *A*, asynchronous (lane 2), thymidine-blocked (lane 3), and TN16-arrested (lane 4) HeLa S3 living cells were immediately fixed with 10% trichloroacetic acid (TCA) and analyzed by immunoblotting with 3A2A. Unfixed asynchronous cells (Asyn) were also analyzed on the same gel (lane 1). *B*, hORC1 protein was immunopurified from TN16-arrested HeLa S3 (lane 1) and then incubated with (lane 4) or without (lane 3) λ phosphatase. Total cell lysate from asynchronous cells was separated on the same gel (lane 2). hORC1 was detected by immunoblotting with 3A2A. The filled arrowheads on the left and right of the panel indicate the band positions of hORC1 obtained from TN16-arrested and asynchronous cells, respectively. The bands indicated by open arrowheads are IgG (heavy and light chains shown by top and bottom arrowheads, respectively). *C*, HeLa S3 cells were released from double thymidine blocking and harvested after trichloroacetic acid fixation at the indicated time points. Total cell lysate from asynchronous cells (lane 5), cells grown synchronously for the indicated times (lanes 1–4) or arrested with TN16 (lane 6) were analyzed by immunoblotting with 3A2A. The cell populations were analyzed by FACS (see below).

than 500 base pairs remained in nuclei (Fig. 5B), none of the hORC1 protein was eluted (Fig. 5A, lanes 10 and 11). The insoluble nature of hORC1 with nuclease treatment points to a link with nuclear structures other than chromatin.

Phosphorylation of hORC1 in M Phase—When hORC1 was isolated from M phase-arrested HeLa cells, its migration in SDS-PAGE was slower than that isolated from asynchronously growing cells (Fig. 2B). This change did not occur during the cell lysis process, because the same mobility shift could be detected in the lysate from trichloroacetic acid-fixed cells, in which the activity of enzyme is minimized by acid denaturation (Fig. 6A, lane 4). This experiment led to the conclusion that the modification is M phase-specific, because no shift of hORC1 could be detected in asynchronous or thymidine-blocked cells (Fig. 6A, lanes 1–3). To examine the relationship to phosphorylation, hORC1 was purified from TN16-arrested cells by immunoprecipitation, and incubated with λ phosphatase. As shown in Fig. 6B, its mobility shifted down to the position with asynchronous cells (lane 3 and 4). The band shift of hORC1 was not detectable at any time point after the release from double thymidine blocking except for at 9 h, when about a half of the cells were in late M and the remainder were in G₁ (Fig. 6C; FACS). At this time, a significant portion of the hORC1 band shifted upward as in the TN16-arrested sample (Fig. 6C, lanes 3 and 6).

hORC1 in M Phase—hORC1 was extracted efficiently by around 0.25 M NaCl from the insoluble nuclear fraction, suggesting that some DNA-hORC1 and/or protein-hORC1 interaction is sensitive to this moderate salt condition (Fig. 2C). To study this characteristic, Triton-washed nuclei were prepared from asynchronously growing cells, as well as in S phase by thymidine blocking or in M phase by TN16 treatment and further treated with increasing concentrations of NaCl (Fig. 7A). The salt sensitivity of hORC1 retention in S phase was almost same as that from asynchronous cells, and most hORC1

protein was eluted at 250 mM NaCl (Fig. 7A, Asyn and S phase arrest). The retention became sensitive to salt in M phase, and most hORC1 eluted at 200 mM (Fig. 7A, M phase arrest). Nuclear lamin B serving as a control was resistant to salt in asynchronous cells, but soluble only by Triton-washing in M phase (Fig. 7A, Lamin B). These results suggested that the association of hORC1 with chromatin DNA or nuclease-resistant structures becomes weak in M phase. As shown in Fig. 7B, hORC1 in M phase was cross-linked with chromatin as efficiently as in asynchronous cells. On the other hand, half of the hORC1 in M phase was eluted by DNase I treatment (Fig. 7C). Under these conditions, the efficiency of solubilization of chromatin DNA was similar to that in asynchronous cells (data not shown). To eliminate the possibility that the alteration of hORC1 association with nuclear structure is due to the effect of the M phase arrest by microtubule disrupting drug, we tested its elution by DNase I treatment with M phase-enriched cells from double thymidine block synchronization. In cells at 9 h after the release from double thymidine block, a significant amount of hORC1 was shifted upward by phosphorylation and partly eluted by DNase I treatment (Fig. 7D, 9 h), whereas the shift and elution by DNase I were limited at the other time points (Fig. 7D, 0, 8, 10, and 11 h). It should be noted that two distinct shifted bands appeared in the eluted sample by DNase I: the higher one is at the same position as observed in TN16-arrested cells, and another is at slightly lower position, suggesting multiple phosphorylation of hORC1 during M phase. These results suggest that the association of hORC1 with chromatin DNA in M phase was not affected significantly, whereas that with nuclease-resistant structures was weakened.

DISCUSSION

The present analyses of the localization of hORC1 protein in human cells, using newly prepared hORC1-specific monoclonal antibodies, provided evidence of a direct link with chromatin

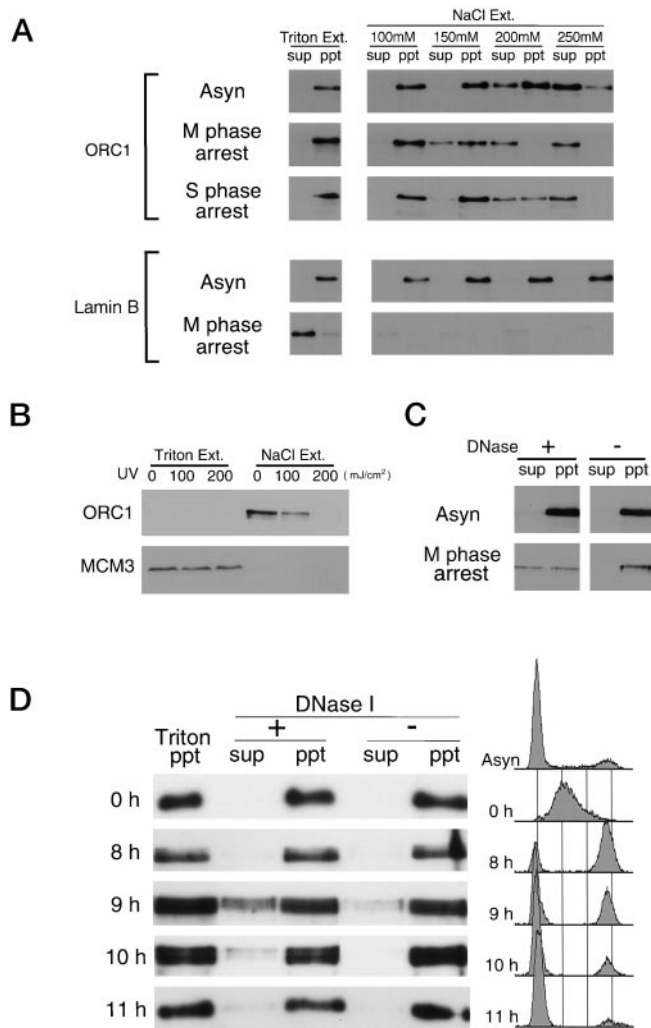


FIG. 7. hORC1 in M phase cells. *A*, cells exponentially growing (Asyn, asynchronous cell), arrested with TN16 at M phase, and arrested with a thymidine block in S phase were treated with the indicated concentrations of NaCl (100, 150, 200, and 250 mM) as described for Fig. 2C and analyzed by immunoblotting with 3A2A and anti-lamin B antibodies. *B*, UV cross-linking analysis as described for Fig. 5 was performed on TN16-arrested M phase cells. hORC1 and MCM3 were detected by immunoblotting. All MCM3 was extracted by Triton treatment in M phase. *C*, asynchronous or TN16-arrested cells were incubated with DNase I (DNase +) or without (DNase -) for 40 min as described for Fig. 5. After centrifugation, hORC1 in soluble (*sup*) and insoluble (*ppt*) fractions was analyzed by immunoblotting. *D*, HeLa S3 cells were released from double thymidine blocking and harvested at the indicated time points. The Triton-insoluble fractions from these cells as shown in the left lane (Triton *ppt*) were treated with (+) or without (-) DNase I as described for *C*. Cell populations in samples determined by FACS analyses are shown the right.

DNA. However, unlike MCM, hORC1 was not eluted from the Triton-insoluble fraction by DNase I treatment, suggesting that it does not associate simply with bulk DNA. Despite this resistance to nuclease, it was easily eluted by a simple salt wash within a narrow concentration band pointing to limited partners. Taking the factors necessary to release hORC1 from nuclei into consideration, an association with nuclease-resistant nuclear structures using DNA as the mediator can be speculated. Alternatively, interaction with both chromatin DNA and a nuclease-resistant nuclear component(s) is possible. Because the association became less stable in M phase, when resetting of next replication cycle may occur, it is possible that hORC1 has some role in this event.

It has been reported that ORC behaves as a stable complex in

S. cerevisiae, *Xenopus* egg extract, and *Drosophila* embryo (9, 10, 12, 14, 15). On the other hand, previous reports have suggested that ORC1 subunit behaves differently from other subunits in human cells, indicating an unstable complex formation of human ORC (22, 28, 34). We showed here that hORC1 is eluted from nuclei by simple salt wash, despite its association with nuclear structures. This is apparently different from tight association of hORC5 with the nuclear-insoluble fraction, being unable to be dissociated even with 0.4 M NaCl (22). We further showed that entire population of ORC1 in human cells have an association with nuclease-resistant nuclear structures throughout the cell cycle except for M phase, demonstrating an obvious contrast with the association of hORC2 with a nuclear fraction, which was highly sensitive to nuclease treatment (38). These results support the previous notion that ORC in human cells would not be in a tight complex, and if they form a complex, their assembly would occur in a narrow time window during cell cycle (34). Indeed our observation indicated that predominant hORC1 in 0.2 M NaCl extract is single molecule entity.

Interestingly, unlike MCMs but similar to hORC1, chromatin-bound CDC6 associates with nuclear structures (29, 30). Because hORC1 physically interacts with hCDC6 in cell extracts (28), it may recruit hCDC6, thereby functioning as a MCM loader as suggested in yeast (39, 40). Although ORCs may determine all sites of MCM loading, the status of their associations with nuclear structures obviously differs. The available data suggest that MCMs may move away from the ORC binding site promptly after the loading. Indeed, a previous report indicated that chromatin-bound MCMs are separated from hORC2 by at least 500–1000 base pairs in HeLa cell chromosomes (38).

The present study showed the phosphorylated form of hORC1 to appear in M phase-arrested cells and in HeLa cells synchronously progressing from M to G₁ phase as a slow migrating band on SDS-PAGE. However, we could not detect the mobility shift in neither asynchronous HeLa cells or in semi-synchronously growing normal fibroblasts, so that the slow migrating form of hORC1 appears in only a limited window in the cell cycle, around metaphase. Similar slow migration of XORC1 and XORC2 has been shown in cytosolic factor-arrested extracts of *Xenopus* eggs (15), pointing to a common modification of ORC1 in M phase. Although the significance of this phosphorylation is unknown, the timing is consistent with that of a potential change of hORC1 association with the nuclear structure. Thus, the link could be causative. Alternatively, the target structure may disappear in M phase or be masked from hORC1 in condensed chromatin. Further experiments are needed to clarify this point.

Although budding yeast ORC has sequence-specific DNA binding activity, none of the ORCs in higher eukaryotes has so far been shown to have such specificity. In contrast to yeast autonomously replicating sequence, mammalian chromosomes can not be expected to have discrete origin sequences (41, 42). However, several pieces of evidence indicate that there are preferential sequences for origins through interaction with specific proteins in somatic cells (43, 44). The present study showed that hORC1 is associated with particular DNA regions that are resistant to nuclease treatment, this being maintained throughout the cell cycle, as observed for DNA binding of yeast ORC (3, 5, 6, 8). If human ORC binds to DNA sequences for initiation of DNA replication through hORC1-DNA interactions, our antibody will be a useful tool to isolate cis-elements from human cells.

In addition to functioning as a replication factor, ORC1 is possibly involved in gene silencing from yeast to higher

eukaryotes. In yeast, ORC1 directly associates with SIR1 protein (45), a silencing factor, and mutant alleles for ORC subunits affect gene silencing at mating type and telomeric loci (2, 46, 47). In *Drosophila*, ORC colocalizes with HP1, a structural component of heterochromatin, and ORC1 physically interacts with it (48). In connection with the proposed conserved role of ORC in gene silencing, the features of hORC1 observed in this study are compatible with formation of silencing-related heterochromatin. First, the DNA binding property of hORC1 satisfies the function of tethering heterochromatin components to particular DNA sequences. Indeed, the associated DNA seems to be resistant to nuclease treatment, indicating localization inside of silenced chromatin. Second, its nuclear structure association may reflect a relation with heterochromatin components integrated in insoluble nuclear structures. In this context, it is of interest that HP1 is reported to colocalize with actin-related protein (Arp4) in *Drosophila* (49) and interact with lamin B receptor in human cells (50), which form such nuclear structures.

The available data indicate that hORC1 behaves as both a static and a dynamic component in nuclei and has a key role in controlling cell programs through DNA replication and chromatin organization. To approach the mechanisms, elucidation of functional connections of all ORC subunits on nuclear structures is indispensable. The present study was one step toward this goal.

Acknowledgments—We thank Dr. M. Fujita (Aichi Cancer Center) for helpful and shared discussions, Dr. K. Ohtani (Tokyo Medical and Dental University) for providing hORC1 cDNA, Dr. H. Kimura (Oxford University) for providing anti-mMCM antibody, Dr. K. Takeuchi (NAIST) for helpful advice on establishment of monoclonal antibody, Dr. H. Masumoto (Nagoya University) for advice on preparation of M phase cells, S. Yamaguchi (NAIST) for construction of a plasmid for expression of hORC1N in *E. coli*, and S. Ohta (NAIST) for preparing nuclear extracts from 293S cells.

REFERENCES

- Bell, S. P., and Stillman, B. (1992) *Nature* **357**, 128–134
- Foss, M., McNally, F. J., Laurenson, P., and Rine, J. (1993) *Science* **262**, 1838–1844
- Diffley, J. F., Cocker, J. H., Dowell, S. J., and Rowley, A. (1994) *Cell* **78**, 303–316
- Loo, S., Fox, C. A., Rine, J., Kobayashi, R., Stillman, B., and Bell, S. (1995) *Mol. Biol. Cell* **6**, 741–756
- Aparicio, O. M., Weinstein, D. M., and Bell, S. P. (1997) *Cell* **91**, 59–69
- Fujita, M., Hori, Y., Shirahige, K., Tsurimoto, T., Yoshikawa, H., and Obuse, C. (1998) *Genes Cells* **3**, 737–749
- Donovan, S., Harwood, J., Drury, L. S., and Diffley, J. F. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 5611–5616
- Tanaka, T., Knapp, D., and Nasmyth, K. (1997) *Cell* **90**, 649–660
- Gossen, M., Pak, D. T. S., Hansen, S. K., Acharya, J. K., and Botchan, M. (1995) *Science* **270**, 1674–1677
- Chesnokov, I., Gossen, M., Remus, D., and Botchan, M. (1999) *Genes Dev.* **13**, 1289–1296
- Carpenter, P. B., Mueller, P. R., and Dunphy, W. G. (1996) *Nature* **379**, 357–360
- Romanowski, P., Madine, M. A., Rowles, A., Blow, J. J., and Laskey, R. A. (1996) *Curr. Biol.* **6**, 1416–1425
- Rowles, A., Chong, J. P. J., Brown, L., Howell, M., Evan, G. I., and Blow, J. J. (1996) *Cell* **87**, 287–296
- Carpenter, P. B., and Dunphy, W. G. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 24891–24897
- Tugal, T., Zou-Yang, X. H., Gavin, K., Pappin, D., Canas, B., Kobayashi, R., Hunt, T., and Stillman, B. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 32421–32429
- Landis, G., Kelley, R., Spradling, A. C., and Tower, J. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **15**, 3888–3892
- Gavin, K. A., Hidaka, M., and Stillman, B. (1995) *Science* **270**, 1667–1670
- Ohtani, K., DeGregori, J., Leone, G., Herendeen, D. R., Kelly, T. J., and Nevins, J. R. (1996) *Mol. Cell Biol.* **16**, 6977–6984
- Wolf, D. A., Wu, D., and McKeon, F. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32503–32506
- Ishiai, M., Dean, F. B., Okumura, K., Abe, M., Moon, K. Y., Amin, A. A., Kagotani, K., Taguchi, H., Murakami, Y., Hanaoka, F., O'Donnell, M., Hurwitz, J., and Eki, T. (1997) *Genomics* **46**, 294–298
- Quintana, D. G., Hou, Z., Thome, K. C., Hendricks, M., Saha, P., and Dutta, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **7**, 28247–28251
- Quintana, D. G., Thome, K. C., Hou, Z., Ligon, A. H., Morton, C. C., and Dutta, A. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 27137–27145
- Pinto, S., Quintana, D. G., Smith, P., Mihalek, R. M., Hou, Z. H., Boynton, S., Jones, C. J., Hendricks, M., Velinzon, K., Wohlschlegel, J. A., Austin, R. J., Lane, W. S., Tully, T., and Dutta, A. (1999) *Neuron* **23**, 45–54
- Yan, H., Merchant, A. M., and Tye, B. K. (1993) *Genes Dev.* **7**, 2149–2160
- Kimura, H., Nozaki, N., and Sugimoto, K. (1994) *EMBO J.* **13**, 4311–4320
- Todorov, I. T., Attaran, A., and Kearsley, S. E. (1995) *J. Cell Biol.* **129**, 1433–1445
- Takahara, K., Bong, M., Brevard, R., Eddy, R. L., Haley, L. L., Sait, S. J., Shows, T. B., Hoffman, G. G., and Greenspan, D. S. (1996) *Genomics* **31**, 119–122
- Saha, P., Chen, J., Thome, K. C., Lawlis, S. J., Hou, Z. H., Hendricks, M., Parvin, J. D., and Dutta, A. (1998) *Mol. Cell Biol.* **18**, 2758–2767
- Fujita, M., Yamada, C., Goto, H., Yokoyama, N., Kuzushima, K., Inagaki, M., and Tsurumi, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25927–25932
- Jiang, W., Wells, N. J., and Hunter, T. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 6193–6198
- Petersen, B. O., Lukas, J., Sorensen, C. S., Bartek, J., and Helin, K. (1999) *EMBO J.* **18**, 396–410
- Coleman, T. R., Carpenter, P. B., and Dunphy, W. G. (1996) *Cell* **87**, 53–63
- Asano, M., and Wharton, R. P. (1999) *EMBO J.* **18**, 2435–2448
- Quintana, D. G., and Dutta, A. (1999) *Front. Biosci.* **4**, 805–815
- Stillman, B. W., and Gluzman, Y. (1985) *Mol. Cell Biol.* **5**, 2051–2060
- Fujita, M., Kiyono, T., Hayashi, Y., and Ishibashi, M. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 10928–10935
- Carr, A., and Biggin, M. D. (1999) *EMBO J.* **18**, 1598–1608
- Ritzi, M., Baack, M., Musahl, C., Romanowski, P., Laskey, R. A., and Knippers, R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 24543–24549
- Liang, C., Weinreich, M., and Stillman, B. (1995) *Cell* **81**, 667–676
- Perkins, G., and Diffley, J. F. (1998) *Mol. Cell* **2**, 23–32
- Masukata, H., Satoh, H., Obuse, C., and Okazaki, T. (1993) *Mol. Biol. Cell* **4**, 1121–1132
- Obuse, C., Okuno, Y., Okazaki, T., and Masukata, H. (1996) *Mol. Biol. Cell* **7**, 43–55
- Aladjem, M. I., Rodewald, L. W., Koleman, J. L., and Wahl, G. M. (1998) *Science* **281**, 1005–1009
- Kalejta, R. F., Li, X., Mesner, L. D., Dijkwel, P. A., Lin, H. B., and Hamlin, J. L. (1998) *Mol. Cell* **2**, 797–806
- Triolo, T., and Sternglanz, R. (1996) *Nature* **381**, 251–253
- Bell, S. P., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1993) *Science* **262**, 1844–1849
- Micklem, G., Rowley, A., Harwood, J., Nasmyth, K., and Diffley, J. F. X. (1993) *Nature* **366**, 87–89
- Pak, D. T., Plumm, M., Chesnokov, I., Huang, D. W., Kellum, R., Marr, J., Romanowski, P., and Botchan, M. R. (1997) *Cell* **91**, 311–323
- Frankel, S., Sigel, E. A., Craig, C., Elgin, S. C., Mooseker, M. S., and Artavanis-Tsakonas, S. (1997) *J. Cell Sci.* **110**, 1999–2012
- Ye, Q., and Worman, H. J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 14653–14656