

所属 (主指導教官)	動物分子遺伝学講座 (加藤順也)		
氏名	太田 聡	提出	平成 15 年 1 月 7 日
題目	ヒト細胞における染色体複製因子機能ネットワークの解析 －PCNA 結合因子の網羅的な同定－ －ORC 複合体形成制御とその機能－		

真核生物の染色体複製に関与する多くの因子は、染色体の構築、維持、機能発現に深く関与し、細胞周期の制御下において複製、修復、遺伝子発現からのシグナルに対して細胞を正常に保つために重要な役割を担っていると考えられる。さらに、これらの因子間で形成されるより大きな機能的ネットワークによりそれぞれの機能が協調的に機能しゲノム情報の安定な維持伝達を行っていると考えられる。本研究ではヒト染色体複製の開始反応および合成反応において染色体上での他の複製因子の足場としての役割を持つ因子である ORC (Origin Recognition Complex) と PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) に着目し、ORC については複合体形成とその制御に関する解析を、また、PCNA については結合因子の網羅的な同定により新たな機能ネットワークの探索を行った。

<PCNA を中心としたタンパク質のネットワークの解明>

DNA ポリメラーゼ δ ($\text{pol}\delta$) の補助因子 PCNA は、3 量体からなるリング構造を有し、中心部の穴に DNA が貫通して DNA 上をスライディングする機能を持ち、様々な因子を DNA 上につなぎ留めるクランプとして機能している。クランプローダーである RFC との複合体形成によりそのリング構造に一時的に切れ目が入り、DNA 上にロードされる。 $\text{pol}\delta$ は DNA 上の PCNA と結合すると、鋳型から外れることなく長い DNA を合成できるようになる。近年、 $\text{pol}\delta$ 、RFC の他にさまざまな方法を用いて細胞周期制御、DNA 修復、染色体情報の維持に関わるタンパク質が PCNA 結合因子として同定され、いくつかの因子について PCNA により活性が促進されることが示された。このことから PCNA は $\text{pol}\delta$ の補助因子として働くほかに、複製された染色体の機能維持の中心的役割を持つと考えられる。従って、PCNA の従来知られている機能にとらわれず、PCNA 結合因子を網羅的に明らかにすることは非常に意義深いと考えられる。そこで、ヒト 293 細胞の細胞質抽出液 (S100) と核抽出液 (NE) から PCNA をリガンドとしたアフィニティークロマトグラフィー (PCNA カラム) により PCNA に特異的に結合する 20 種以上の因子を精製した。これらの因子をウェスタンブロッティング、アミノ酸配列分析法および質量分析装置を用いて同定を試みたところ、S100、NE からそれぞれ 19 個と 31 個の因子が同定され、このうちこれまでに報告のある PCNA 結合因子がそれぞれ 12 個と 16 個含まれていた。よって、PCNA 結合因子の網羅的な精製法として PCNA カラムが有効であることが示された。また、同定法として質量分析装置を導入することで微量な核内因子の解析も通常の培養、精製スケールで効率よく同定できることが示された。NE からの残りの因子のなかには、修復、転写に関わる因子である DNA-dependent protein kinase、Ku80、Ku70、NDH1、RPA1、RuvB-like protein 2、Myb binding protein が同定されたことから、様々なイベントにおいて PCNA が機能していることが予想された。さらに、S100 と NE の双方から、cDNA 配列 (AAH06278) 由来の出芽酵母の CHL12 と相同性のあるタンパク質が同定された。CHL12 は出芽酵母の

解析からチェックポイント、姉妹染色体接着に関与し、RFC1 と一次構造が似ていることが知られている。実際に、昆虫細胞でのヒト CHL12 および RFC2-5 が新規のクランプローダー型の複合体となり、精製した PCNA と特異的な結合をすることが確かめられた。よって、CHL12/RFC2-5 は PCNA をターゲットとする新規のクランプローダーとして機能することが示唆された。

<ヒト ORC 複合体形成の解析>

出芽酵母の ORC は細胞周期を通して 6 つのサブユニットから成る安定な複合体として複製開始点に結合し、複製開始前に他の複製因子が複製開始点と相互作用するための染色体上の足場として機能していると考えられている。ヒトにおいても 6 つのサブユニットに対応するタンパク質 (ORC1-6) の存在が示されているが、細胞内での機能はもちろん、他の複製因子、さらに ORC サブユニット間の相互作用も明らかにされていない。そこで、ヒト ORC の複製開始における機能を明らかにするために、ORC の複合体形成について解析を行った。HeLa 細胞抽出液からヒト ORC に特異的な抗体を用いて免疫精製を行ったところ、ORC1、2、3、4、5 から成る ORC1-5 複合体が細胞内に存在することが示された。また、全てのサブユニットはクロマチン結合画分に見いだされることを考え合わせると、ヒト ORC は出芽酵母の場合と同様に複合体として複製開始点に結合することが予想された。しかしながら、同調細胞を用いた実験から ORC2-5 は細胞周期を通して一定量存在するのに対し、ORC1 は G1 期に一過的に増加し、その後、S 期の進行に伴って減少することが明らかとなった。S 期における ORC1 の分解は 26S プロテアソームの阻害剤 MG132 で阻害されることから、ORC1 の分解はプロテアソームの分解経路に依存すると考えられる。さらに、抗 ORC1 抗体と抗 ORC2 抗体を用いた免疫沈降実験から、この ORC1 の増加に伴って G1/S 期に ORC1-5 複合体が形成されることが明らかとなった。ORC の全てのサブユニットが細胞周期を通して一定量存在し、安定な複合体を形成している出芽酵母とは異なり、ヒトでは ORC1 の量に依存して ORC 複合体の形成が制御されていることが明らかとなった。ところで、ORC1 は常に DNase I 不溶画分に存在し、単にクロマチンと結合しているのではなく、何らかの核構造と相互作用していると考えられる。一方、核構造と相互作用する ORC2 の割合が G1/S 期に増加すること、細胞内の ORC1 の量を siRNA を用いて減少させたとき、核構造と相互作用する ORC2 の割合が減少したことから、ORC2、おそらくは他の ORC のサブユニットは ORC1 と核構造との相互作用を利用して、G1/S 期に ORC1-5 複合体として核構造上に存在すると考えられる。また、ORC1 に対する siRNA 処理により ORC1-5 の複合体形成を阻害すると、クロマチン結合画分に存在する MCM は減少した。また、CDC6 に対する siRNA により細胞を処理しても同様の結果が得られた。従って、ORC1 を含む ORC 複合体は CDC6 とともに働くことによってクロマチン上に MCM をロードすることにより複製開始複合体 (pre-RC) の形成に深く関与することが明らかとなった。本研究により明らかとなった、複製開始複合体の形成活性をもつ ORC 複合体が ORC1 の量に依存して細胞周期特異的に形成されるシステムは、酵母と比較して非常に長い S 期をもつ動物細胞に再複製の防止機構として新たに加わったものと考えられる。また、複製開始点の核内配置はそれぞれの複製開始点の開始時期のみならず遺伝子の機能発現とも密接に関係があることが古くから知られており、今回見いだした ORC 複合体と核構造との相互作用は、複製開始制御のみならず動物細胞における高次機能発現制御のメカニズムを内包していると考えられる。

ヒト細胞における染色体複製因子機能ネットワークの解析

PCNA 結合因子の網羅的な同定

ORC 複合体形成制御とその機能

太田 聡

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 15 年 1 月 31 日提出

目次

第1章 序論	3
第2章 PCNA 結合因子の網羅的な同定	
2-1 序	5
2-2 材料と方法	7
2-3 結果	11
2-4 考察	14
第3章 ORC 複合体形成制御とその制御	
2-1 序	19
2-2 材料と方法	22
2-3 結果	27
2-4 考察	33
謝辞	38
参考文献	39
資料	

Satoshi Ohta, Yasushi Shiomi, Katsunori Sugimoto, Chikashi Obuse, and Toshiki Tsurimoto (2002) A proteomics approach to identify proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding proteins in human cell lysates. *J. Biol Chem.* **277**, 40362-40367

Koh Shikata, Satoshi Ohta, Kouichi Yamada, Chikashi Obuse, Hiroshi Yoshikawa, and Toshiki Tsurimoto (2001) The human homologue of fission yeast cdc27, p66, is a component of active human DNA polymerase δ . *J. Biochem.* **129**, 699-708

Tetsuo Iida, Isao Suetake, Shoji Tajima, Hiroshi Morioka, Satoshi Ohta, Chikashi, Obuse, and Toshiki Tsurimoto (2002) PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes to Cells.* **7**, 997-1007

第1章

序論

遺伝情報を担う染色体 DNA が細胞増殖の過程で親細胞から娘細胞へと正しく受け継がれていく過程にはさまざまな機構が関与しているが、その中で、染色体 DNA が複製されることが必須のイベントである。したがって、DNA 複製機構の解明は、生物のあらゆる生命現象の理解のための基盤となる。

複製の基本的なしくみ、遺伝学的、生化学的な方法を駆使して原核生物の染色体、ファージ、プラスミドを材料にして解析されてきた (Kornberg et al., 1992)。これらの解析から、複製はゲノム上で無作為に始まるのではなく、複製開始点 (replication origin) とよばれる特定領域から開始することが示された。複製開始領域に存在する開始制御配列 (レプリケーター) とその配列を識別する開始制御因子 (イニシエーター) により制御される複製単位をレプリコンと呼ぶが、大腸菌や枯草菌などの真正細菌の染色体とそのファージゲノムやプラスミド DNA、および SV40 などのウイルスゲノムはいずれも1個の開始点と終結点から構成されるモノレプリコンである。モノレプリコンの代表である大腸菌染色体では 245 塩基対の *oriC* 配列が複製開始に必要な領域として同定された。一方、*oriC* 配列内に特異的に結合し、複製開始に必要な DnaA タンパク質がそのイニシエーターとして同定された。DnaA が *oriC* 配列内のくり返し配列 (DnaA box) に特異的に結合すると ATP 依存的に集合体を形成し隣接する二本鎖 DNA を部分的にほどき、DNA ヘリカーゼである DnaB タンパク質が導入され、プライマーゼとともにプライモソームを形成する。これにより開いた DNA 上に合成されるプライマー RNA を標的として DNA ポリメラーゼ III ホロ酵素が導入されて複製フォークとなって DNA 合成を開始する。一方、真核生物の複製因子の解析では二つの流れがあり、その一つはウイルスの複製開始点を利用した試験管内 DNA 複製系の再構築の研究である。これにより少なくとも十数種の細胞由来の複製タンパク質が同定されてきた。もう一つの流れは出芽酵母の複製開始点である ARS の解析で、それにより、ORC (origin recognition complex) が ARS 内の必須の 11 塩基対に特異的に結合する因子として同定された (Bell and Stillman., 1992)。遺伝学的な解析から、ORC が複製に必須であることが示され、ORC が真核生物のイニシエーターであると考えられている。これらをまとめて真核生物の複製機構をみると、ORC が複製開始点に結合し、CDC6、MCM (minichromosome maintenance) とともに複製前開始複合体 (pre-replication complex, pre-RC) が形成され、pre-RC の活性化に

ともない二本鎖 DNA が部分的にほどかれ、DNA ポリメラーゼ α /プライマーゼ複合体が導入されてプライモソームを形成する。つづいて DNA ポリメラーゼ δ (pol δ) が呼び込まれ、複製フォークとなって DNA 合成が開始する (Waga and Stillman, 1998)。以上のように、真核生物と大腸菌の DNA 複製反応の骨格はほぼ同じであり、原核、真核生物の区別なく高度に保存されてきたことがわかる。しかし、真核生物特有の問題に視点をおくと、その染色体の複製では数千から数万の複製開始点を持つが、細胞周期に連動して協調的に複製を開始するマルチレプリコンである点が上げられる。また、真核生物では複製反応が染色体 DNA の複製のみならず、さまざまな細胞機能と連携していることが知られている。例えば、複製開始因子がセントロメアやテロメアなどの他の染色体機能領域の染色体構築にも関わっている (Pak et al., 1997)。また、染色体の正確な分配に必要な姉妹染色体と複製反応が連動していることも知られている (Skibbens et al., 1999)。さらに、遺伝子の機能発現に関与するエピジェネティックな情報の伝達、再編にも複製反応は重要な役割をしている。このように染色体複製と細胞周期あるいは細胞機能との連携（機能ネットワーク）は、真核生物特有の問題であり、その解明は細胞機能の理解にとって不可欠である。これまで、このネットワークの理解するためのアプローチとして酵母の遺伝学がもっとも強力な武器であった。しかし、酵母よりもさらに多様で高度の機能を有する多細胞生物の細胞では遺伝学的なアプローチをとるのが困難であるだけでなく、より複雑な因子間のつながりを解明する必要がある。ここでは、染色体複製因子の機能ネットワークがすべての細胞の機能ネットワークの基盤となっているという考えを基にして、プロテオミックス解析を導入してヒト細胞における DNA 伸長反応の中心因子 PCNA および複製開始反応の中心因子 ORC を核としたタンパク質相互作用ネットワークの網羅的解析を行った。

第2章

PCNA 結合因子の網羅的な同定

2-1 序

PCNA は最初、systemic lupus erythematosus という自己免疫疾患の抗原タンパク質として見いだされた (Miyachi et al., 1978)。S 期細胞の核内に特異的に出現し、取り込まれたブロモデオキシウリジンと局在を共にすることから DNA 複製に関与することが示唆された (Bravo and Celis, 1980)。つづいて、SV40 ウイルスの DNA 複製の再構築によりヒト細胞の必須複製因子として同定され、その後の研究から pol δ の補助因子として機能することが示された (Prelich et al., 1987)。PCNA は 29 kD のサブユニットの三量体で構成され、特徴的な環状構造をとることが結晶解析で明らかにされている (Krishna et al., 1994, Gulbis et al., 1996)。PCNA と同じ特性をもつタンパク質として、大腸菌 DNA ポリメラーゼ III の β サブユニット、T4 ファージの gene 45 タンパク質が知られている。これらは、同じ環状構造をもち、その構造を使って DNA を包み込む形で結合し、DNA ポリメラーゼをはじめとする様々な因子を DNA 上につなぎとめておくクランプとしての機能を持つ (Kuriyan et al., 1993)。環状分子の PCNA は単独では DNA に結合できないが、クランプローダーとして機能する RFC (Tsurimoto and Stillman, 1989, Tsurimoto and Stillman, 1990) との複合体形成により環状構造に一時的に切れ目が入り、DNA 上にロードされと考えられている。PCNA の主な機能は pol δ の補助因子で、鋳型 DNA 上の pol δ と結合して、その鋳型 DNA に対する結合性を高め DNA 合成のプロセッシビリティを高める。しかし、近年、pol δ 、RFC の他にさまざまな方法を用いて細胞周期制御、DNA 修復、染色体機能に関わるタンパク質が PCNA 結合因子として同定され (Tsurimoto, 1999)、いくつかの因子について PCNA により活性が促進されることが示された。その多くは、その N 末端あるいは C 末端の近傍に (Gln-X-X-Ile / Lys-X-X-Phe-Phe) とい PIP (PCNA interacting peptide) モチーフとよばれるアミノ酸配列をもつ特徴がある (Warbrick et al., 1998)。まず、DNA 連結因子 FEN1 (flap endonuclease 1)、DNA リガーゼ I、ミスマッチ修復因子 MSH3 (MutS homolog 3)、MSH6 (MutS homolog 6)、塩基除去因子 UNG2 (Uracil-DNA glycosylase)、染色体 DNA のメチル化パターンを維持する酵素である DNA (cytosine-5-) -methyltransferase 1 (Dnmt 1) (Iida et al., 2002) などがある。また、PCNA は pol δ との結合以外に、複製に必要とされる DNA ポリメラーゼ ϵ (pol ϵ)、DNA 損傷の乗り越え合成をする DNA ポリメラーゼ η 、DNA ポリメラーゼ κ 、

DNA ポリメラーゼと相互作用して活性を促進し、多様な DNA ポリメラーゼの活性制御に関与している (Haracska et al., 2001a, Haracska et al., 2001b, Haracska et al., 2002)。これらに加えて、クロマチン形成に関与する CAF-1 (chromatin assembly factor 1) が PCNA と相互作用して複製後の染色体構造維持に関与しているという報告もある (Shibahara and Stillman, 1999, Zhang et al., 2000)。このような PCNA に対する多様な因子の相互作用の存在は、DNA が直接機能する DNA 複製反応を中心にして DNA 修復、細胞周期制御そして染色体構造維持機構が密接に連携していることを示しており、PCNA がその中心的役割を持つと考えられる。

この PCNA を中心にした機能ネットワークの全体像の解明は、真核生物の細胞機能の中の DNA 複製反応の位置付けをする上で必要不可欠である。しかしながら、多くの PCNA 結合因子の同定および機能解析は個別に行われ、相互にどのような関係にあるかは明確でない。そのための一つのアプローチとして、細胞抽出液からの PCNA 結合因子の網羅的解析がある。これにより、どの PCNA 結合因子が、どのような状態で、どれぐらい存在するか相対的な情報を得ることができる。また当然、新規の因子の同定も可能である。ここでは、その方法として PCNA をリガンドとしたアフィニティーカラム (PCNA カラム) と質量分析を組み合わせることでそれを可能とした。すでに PCNA カラムは pol δ や RFC などの精製に用いられており、細胞抽出液からの PCNA 結合因子のウエスタンブロッティング、プロテインシーケンサーによる同定も行われた (Loor et al., 1997, Hughes et al., 1999)。しかし、これらは方法的にも感度的にも網羅的というには不十分であった。本研究では質量分析の導入により、20 以上の PCNA に直接あるいは間接的に結合する因子を一度に同定し、それらの存在状態、PCNA との機能連携についていくつかの新しい知見を得ることができた。

2-2 材料と方法

2-2-1 緩衝液

ハイポ緩衝液 : 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) pH 7.5、5 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)、0.5 mM dithiothreitol (DTT)、2 μ g/ml leupeptin

核抽出緩衝液 : 25 mM Tris-HCl pH 7.5、0.2 M NaCl、1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)、10 mM sodium sulfite、0.1 mM PMSF、1 mM DTT、2 μ g/ml leupeptin

A 緩衝液 : 25 mM Tris-HCl pH 7.5、1 mM EDTA、10 % glycerol、0.01 % nonidet P40 (NP40)、1 mM DTT、0.1 mM PMSF、2 μ g/ml leupeptin

TBS 緩衝液 : 30 mM Tris-HCl pH 7.4、200 mM NaCl

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)

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

ウェスタンブロッティング用転写緩衝液 A : 100 mM Tris、190 mM glycine、pH 8.3 (必要に応じて 0.1% SDS を添加)

MES 緩衝液 : 50 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid, monohydrate pH 6.0

Tris 緩衝液 : 50 mM Tris-HCl pH 7.5

エタノールアミン緩衝液 A : 1 M 2-aminoethanol pH 8.2

CHAPS 緩衝液 : 10 mM N-cyclohexyl-3-aminopropanesulfonic acid pH 11、10 % methanol

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 抗体

抗 pol δ 抗体は本研究室において四方が作製した pol δ p125 サブユニットに対するマウスモノクローナル抗体 (8A5E3) を用いた (shikata et al., 2001)。抗 MSH2 抗体 (sc-494)、抗 cdk2 抗体 (sc163)、抗 cyclin A 抗体 (sc751) は Santa Cruz Biotechnology から購入した。抗 RFC (p40) 抗体は本研究室の所有のウサギポリクローナル抗体を用いた。抗 pol ϵ (p240)モノクローナル抗体は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC) から購入した抗 pol ϵ (p240) 抗体産生ハイブリドーマ (2284) の培養上清を用いた。抗 CAF-1 (p150) 抗体は柴原博士 (国立遺伝学研究所) より譲与されたモノクローナル抗体を用いた (Smith and Stillman, 1991)。抗 Dnmt 1 抗体は田嶋博士 (大阪大学) より譲与されたウサギポリクローナル抗体を用いた (Takagi et al., 1995)。抗 DNA リガーゼ抗体は serotec のマウスモノクローナル抗体 (7A12) を用いた。ヤギ抗ウサギ (IgG) 抗体とヤギ抗マウス (IgG) 抗体は BIO-RAD から購入したものをを用いた。

2-2-3 培養細胞

293 細胞株 (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の培養細胞株、Stillman and Gluzman, 1985) は 5 % Calf Serum (Bio WHITTAKER)、1 % Penicillin-Streptomycin (GIBCO BRL)を含む S-MEM with L-Gln, NaHCO₃ (日研生物医学研究所) を使用して 37°C、5 % CO₂条件下で浮遊培養した。

2-2-4 タンパク質

ヒト PCNA : T7 プロモーターの下流にヒト PCNA の cDNA を組み込んだプラスミド (pT7PCNA) を保持する大腸菌 BL21 (DE3) の抽出液より、DEAE セファロース、Q セファロースおよび S300 の 3 ステップの分画により得られた純度 95 %以上のものを使用した (Fukuda et al., 1995)。

ウシ血清アルブミン (BSA) : 宝酒造株式会社の酵素反応グレードのものをを用いた。

2-2-5 SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

タンパク質試料を 2×SDS サンプル緩衝液に加え 95°Cで 5 分間インキュベートし、12.5 %または 4-20 %濃度勾配 (Tefco) のポリアクリルアミドゲルを用いて泳動溶液中で電気泳動した。

2-2-6 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) にセミドライ式ブロッティング装置を用いて転写緩衝液中で 30~60 分間、3 mA/cm² の条件でブロッティングした。0.5~1 %ドライミルク (雪印) を含む TBS 中で 1 時間ブロッティングした後、0.5~1 %ドライミルクを含む TBS 中で一次抗体反応 1 時間行った。つぎに PVDF 膜を TBS で 10 分間、3 回洗浄した後、0.5~1 %ドライミルクを含む TBS 中でペルオキシダーゼ標識された二次抗体反応を 1 時間行った。最後に PVDF 膜を TBS で 10 分間、3 回洗浄し、抗体と反応したタンパク質は ECL システム (Amersham Biosciences) を用いて可視化した。

2-2-7 細胞抽出液 (S100)、核抽出液の調製

ヒト 293 細胞抽出液は Li and Kelly (1984)、Stillman and Gluzman (1985) らの方法に従って調製した。293 細胞培養液 (~5×10⁵/ml、8 l) を 1000 ×g、7 分間低速遠心し約 10 ml の細胞を回収した。これを PBS (リン酸緩衝塩溶液、pH7.4) で一度洗浄し、さらに 80 ml のハイポ緩衝液で洗浄した。以下の操作は 0~4°Cで行った。ハイポ緩衝液により約 20 ml に膨張した細胞を 20 ml のハイポ緩衝液で再び懸濁し、10 分間放置し、これを、Dounce 型ホモジナイザーにより破碎し (30 ストローク)、30 分間放置した。この後、破碎液を 16000 ×g、12 分間遠心し、上清を細胞質画分、沈殿を核画分として回収した。細胞質画分に塩濃度が 0.1 M になるように NaCl を加え、100000×g、1 時間超遠心し、この上清を細胞質抽出液、以下 S100 とした。核画分には 25 ml の 0.2 M の NaCl を含む核抽出液を徐々に加え、30 分間攪拌し、これを 16000 ×g、12 分間遠心して得られる上清を核抽出液とした。

2-2-8 PCNA カラムと BSA カラムの作製

以下の操作は 0~4°Cで行った。MES 緩衝液で洗浄したベット体積 5 ml の Affi-gel 15 ビーズ (Bio-Rad) と MES 緩衝液に溶解した 20 mg の PCNA あるいは 40 mg の BSA を混合し、6 時間攪拌した。つぎに、遠心して上清を除いた後ビーズに Tris 緩衝液、エタノールアミン緩衝液 A を加え、一晚攪拌した。攪拌後、遠心して上清を除いた後ビーズを Tris 緩衝液で懸濁し、それぞれ PCNA ビーズ、BSA ビーズとした。

2-2-9 PCNA カラムを用いたクロマトグラフィーの操作

全ての操作は 4°Cで、試料溶液と各緩衝液の添加は自然落下で行った。PCNA カラム (ベット体積 2 ml)、BSA カラム (ベット体積 1 ml) をそれぞれ 5 ベット体積の 1M NaCl を含む A 緩衝液で洗浄し、つづいて 5 ベット体積の 0.1M NaCl を含む A 緩衝液で平衡化した。S100 あるいは核抽出液に塩を含まない A 緩衝液を加えて 0.1 M の NaCl 溶液に対応する電気伝導度にし、これを連続して BSA カラムと PCNA カラムに添加して非吸着画分を 5 ml ずつ分画した。非吸着タンパク質をさらに 40 ml の

0.1 M NaCl を含む A 緩衝液で洗い出し、洗浄画分を 1ml ずつ分画した。つづいて BSA カラムと PCNA カラムを分離し、0.3M NaCl、0.5M NaCl、1M NaCl および 0.1% SDS を含む A 緩衝液の 20ml ずつを順次 PCNA カラムに添加して吸着タンパク質を溶出し、溶出画分を 1ml ずつ分画した。また、BSA カラムに 10ml の 1M NaCl を含む A 緩衝液と 10ml の 0.1% SDS を含む A 緩衝液を順次添加し、0.5 ml ずつ分画して溶出画分とした。

2-2-10 アミノ酸配列分析（プロテインシーケンサーによる解析）

目的のタンパク質を含む PCNA カラムの溶出画分、あるいは、さらに逆相クロマトグラフィーにより精製を行った画分を SDS-PAGE (12.5 %) し、PVDF 膜 (Hybond-P, Amersham Biosciences) にセミドライ式プロットング装置を用いて CAPS 緩衝液中で 50 分間、20 V の条件でプロットングした。膜に転写されたタンパク質をボンソー S (SIGMA) で染色し、検出されたバンドを切り出し、プロテインシーケンサー (ABI 476A) による解析を行った。得られたアミノ酸配列から BLAST による検索を行った。

2-2-11 質量分析によるタンパク質の同定

タンパク質のゲル内消化は Shevchenko らの方法 (Shevchenko et al., 1996) をもとに改変を加えて行った。PCNA カラムの溶出分画を 12.5 % SDS ポリアクリルアミドで分離後、30 kD から 300 kD の領域にわたって 1 mm 間隔でゲル短冊状に切り出した。ゲル片をアセトニトリルで脱水したあと、10 mM DTT を含む重炭酸アンモニウムで 56°C、45 分間インキュベートし、還元化した。室温にして、55 mM ヨード酢酸を含む 100 mM 重炭酸アンモニウムを加え、暗条件下で 30 分間反応させて、アルキル化を行った。アセトニトリルを添加して脱水し、100 mM 重炭酸アンモニウムで膨潤させたあと、12.5 μ g/ml トリプシン (Roche molecular Biochemicals Germany) を含む 50 mM 重炭酸アンモニウム溶液中で、37°Cで一晩インキュベートした。ペプチドを室温で、25 mM 重炭酸アンモニウムで 1 回、5%ギ酸を含むアセトニトリルで 2 回抽出し、スピードバックコンセンレーターで乾燥させ 5%ギ酸に溶解した。この試料を四重極イオントラップ型質量分析装置 (LC/MS/MS)、LCQ Deca quadrupole ion trap mass spectrometer (Finnigan) に導入し、得られた測定結果から、検索ソフト Mascot (Matrix Science) を用いてデータベース検索を行った。

2-3 結果

2-3-1 PCNA アフィニティクロマトグラフィー

PCNA 結合因子を網羅的に検索するために、まず、PCNA をリガンドとしたカラムを作製し、ヒト 293 細胞抽出液を用いて PCNA カラムに結合する因子の精製を行った。

321 培養スケールの 293 細胞 (2×10^{10}) から由来した S100 画分 (9.3 mg/ml, 100 ml) を 0.1 M の NaCl の条件で、BSA カラムと PCNA カラムを連結したカラムに添加した。非吸着タンパク質を 0.1 M NaCl を含む A 緩衝液で洗い出した後、それぞれのカラムを分離し、PCNA カラムについては、吸着タンパク質を 0.3 M、0.5 M、1 M の NaCl さらに 0.1% SDS を含む A 緩衝液により溶出した。BSA カラムについては、吸着タンパク質を 1 M の NaCl および 0.1% SDS を含む A 緩衝液により順次溶出した。各試料は SDS-PAGE で分離し、銀染色により検出した (図 2-1)。0.3 M NaCl による溶出画分には数十個のバンドが確認された (図 2-1A)。BSA カラムから検出されず、PCNA カラムの 0.1M NaCl による洗浄画分 (図 2-1A の W) でもほとんど検出されず、溶出画分にだけ特異的に検出された、分子量 140 kD、72 kD、50 kD、42 kD、10 kD のものをそれぞれ P1~P5 とした。(図 2-1B)。P1~P5 以外に、バンド強度は弱いが PCNA カラムに特異的なバンドが約 20 本認められた (図 2-1B ※印)。0.3 M 溶出につづく 0.5 M、1 M NaCl の溶出では P1~P5 が検出されたが、新たに検出されるものはなかった (図 2-1C)。0.1% SDS の変性条件では、マトリクスに結合した PCNA 三量体から遊離した PCNA 36 kD および 56 kD (後述) のバンド 2 本が検出された (結果不掲載)。

以上の 2 つの試料をさらに逆相クロマトグラフィーにかけ、P4、P5 および p56 を精製し、プロテインシーケンサーによりアミノ酸配列を決定した。決定したアミノ酸配列をもとに相同配列のデータベース検索を行った結果、P4 は既知の PCNA 結合因子 FEN1、P5 はグリオブラストーマ細胞の分泌タンパク質として報告のある E06811、p56 は β -チューブリンであることがわかった (結果不掲載)。このうち、E06811 については組み換えタンパク質を作製し、PCNA との相互作用の解析を行ったが、PCNA との結合は認められなかった (結果不掲載)。また、 β -チューブリンについては、BSA カラムの 0.1% SDS 溶出画分にも同様に検出され、カラムに非特異的に結合していると考えられた。

また、S100 と同様に、321 培養スケールの 293 細胞 (2×10^{10}) 由来の核抽出液 (4.3 mg/ml, 126 ml) を PCNA カラムにロードし、0.3 M NaCl の条件で溶出したタンパク質のパターンは図 2-2 のようになった。S100 同様、P1~P5 に相当するバンドが検出された。核抽出液の溶出パターンを示したゲルは S100 の溶出パターンを示したゲル

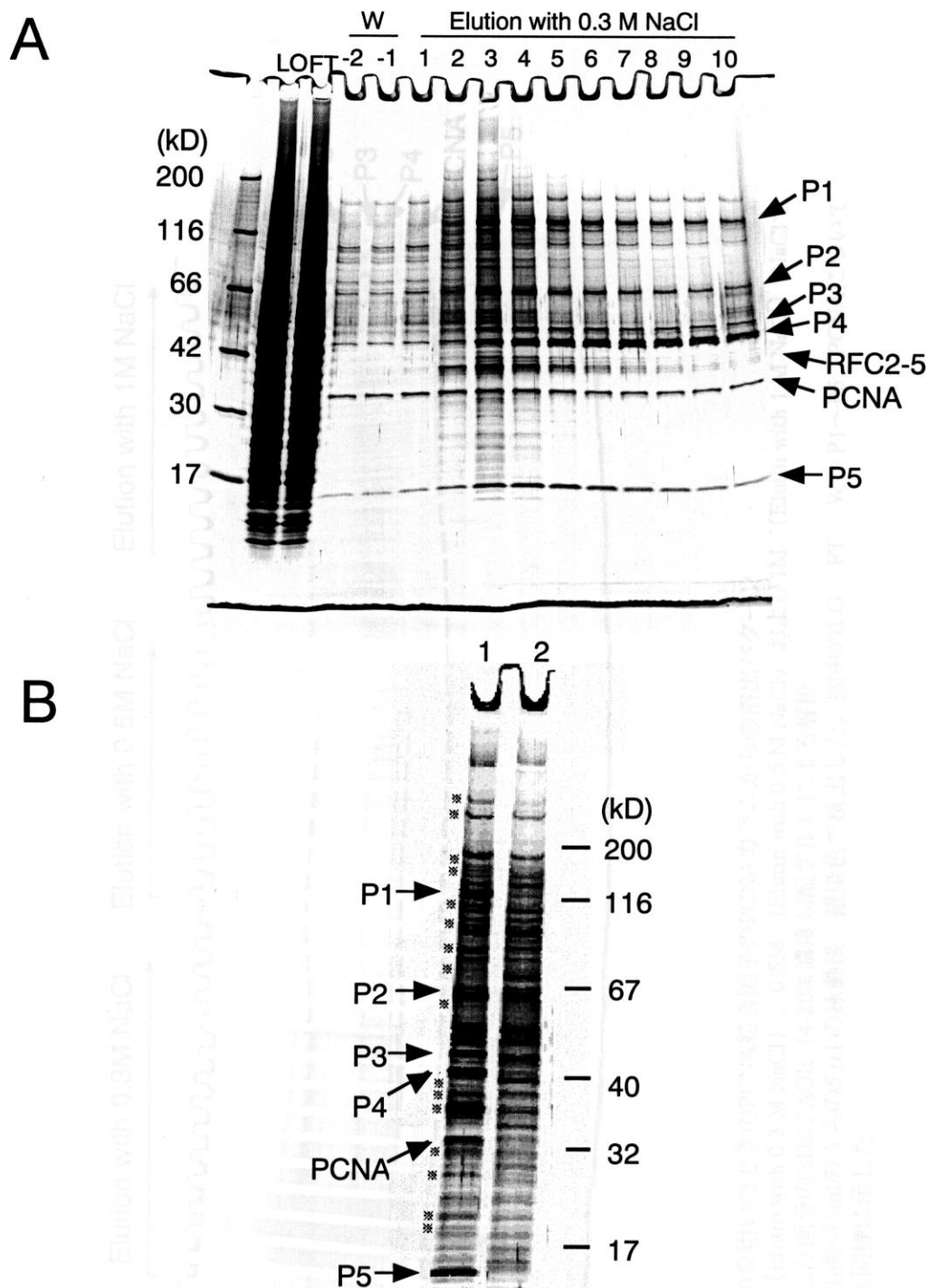


図2-1. S100を用いたときのPCNA結合因子のPCNAカラムからの溶出パターン

A: 0.3M NaClで溶出した画分 (Elution with 0.3 M NaCl) のSDS-PAGE (4-20% 濃度勾配ゲル) による解析
 LO: カラムに添加した画分、FT: 非吸着画分、W: 洗浄画分を示す。番号は各画分番号を示し、
 -1、-2については洗浄画分のそれぞれ最後から1番目と2番目の画分を示す。画分1mlのうちの5 μ lの
 泳動後、銀染色で検出した。検出されたバンドのうち、強いバンドをP1~P5として示した。RFC2-5
 (p40、p38、p37、p36) はウエスタンブロッティング (図2-3) から予想されるRFCのサブユニット
 を示す。分画中にカラムから外れたPCNAを図中に示した。

B: PCNAカラムとBSAカラムからの結合因子の溶出パターンの比較

PCNAカラムの0.3 M NaCl溶出画分 (レーン1) とBSAカラムの1 M NaCl溶出画分 (レーン2) を並べて
 泳動し、銀染色で検出した。それぞれの分画のピーク画分の1 ml と0.5 mlのうちの5 μ lを泳動した。
 PCNAカラム溶出画分のうちP1 ~P5以外で特異的にPCNAに結合していると思われる弱いバンドを
 ※印で示した。分画中にカラムから外れたPCNAに相当するバンドを図中に示した。

C

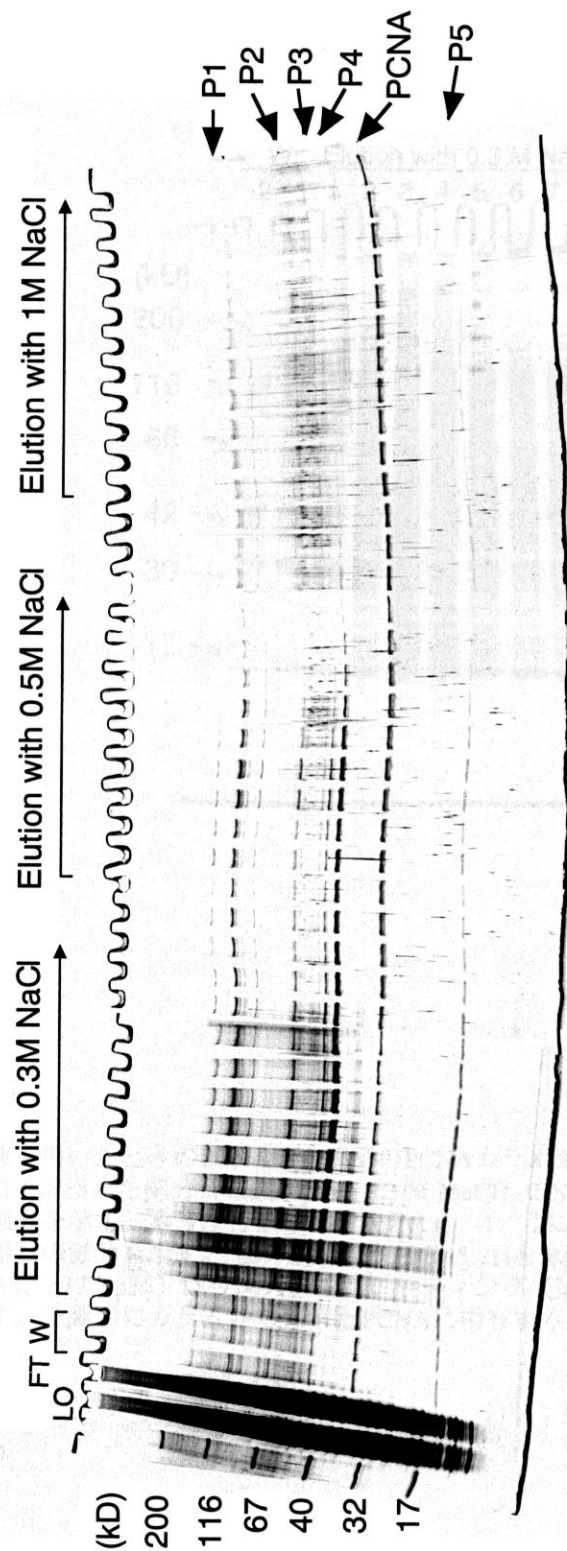


図2-1. S100を用いたときのPCNA結合因子のPCNAカラムからの溶出パターン
 C: 0.3M (Elution with 0.3 M NaCl)、0.5M (Elution with 0.5 M NaCl) および1M (Elution with 1 M NaCl) NaClで
 溶出した画分のSDS-PAGE (4-20%濃度勾配ゲル) による解析
 各溶出画分1mlのうちの5 μ lの泳動後、銀染色で検出した。図中のLO、FT、W、P1~P5、PCNAについて
 はAと同様に示した。

(図 3-1 A) の 3 倍量の各画分を泳動したことを考慮すると、P1~P5 は S100 と核抽出液からほぼ等量が回収されたと考えられる。

2-3-2 PCNA カラム溶出画分のウエスタンブロッティングによる解析

報告されている PCNA 結合因子に対する抗体のうち入手できるものについてウエスタンブロッティングにより PCNA カラム結合分画での有無を解析した。カラム添加画分、非結合画分、洗浄画分および PCNA カラムと BSA カラムの 0.3 M NaCl 溶出画分でのそれぞれの因子の存在量を比較した (図 2-3、図 2-4)。その結果、S100 と核抽出液の両方から、pol δ (p125)、pol ϵ (p240)、RFC (p40)、MSH2、Dnmt 1、DNA リガーゼ、CAF-1 が PCNA カラムの溶出画分に特異的に検出された。S100 と核抽出液で異なることは、cdk2、サイクリン A は核抽出液では特異的な結合はみられず (結果不掲載)、S100 のみにみられたこと、また RFC (p40) と CAF-1 は抽出液中 (図 2-3 と図 2-4、LO) ではほとんど検出されないが PCNA カラム溶出画分 (図 2-3 と図 2-4、PCNA column) に強く検出されたことから、非常に効率よく PCNA カラムに結合したと考えられる。また、PCNA と機能的なつながりをもつ DNA 修復因子 Ku70 と DNA-dependent protein kinase (DNAPK) について核抽出液の分画を用いて解析したところ、PCNA カラム特異的な結合がみられた。PCNA カラム溶出画分の銀染色によるプロファイル (図 2-1A、図 2-2) とウエスタンブロッティングの結果の比較から、P1 に関しては、その分子量 140kD が pol δ (p125) とほぼ一致し、また各分画のウエスタンブロッティング (図 2-3、図 2-4) と P1 の銀染色との溶出画分におけるバンドの強度の遷移が一致することから、このバンドは pol δ (p125) であることが予想された。RFC は異なる 5 つのサブユニット RFC1~5 (p140、p37、p36、p40、p38) で構成されるが、ウエスタンブロッティングで p40 が検出され、さらに銀染色の弱いバンドのなかに分子量から判断して p40、p38、p37、p36 に相当するものがあることから、RFC 複合体も PCNA カラムに結合していたと考えられる (図 2-1 A、図 2-2)。また MSH2 は洗浄画分にも検出され、その溶出プロファイルと分子量から、図 2-1 B の※で示した上から 6 番目の弱いバンドに対応すると考えられる。pol ϵ (p240)、cdk2、サイクリン A、Dnmt 1、DNA リガーゼは銀染色のバンドとして特定できず、弱いバンドのなかに含まれると考えられる。

2-3-4 質量分析による PCNA 結合因子の網羅同定

ウエスタンブロット、プロテインシーケンスでは存在するタンパク質の同定が限定されるため、上で得た試料の一部をプールし [S100; 18 mg タンパク質、(4×10^8 細胞に相当) 由来、核抽出液; 5.4 mg タンパク質、(2×10^8 細胞に相当) 由来]、12.5% SDS-PAGE ゲルで分離し CBB 染色によって検出した (図 2-5)。図 2-1、図 2-2 同様、

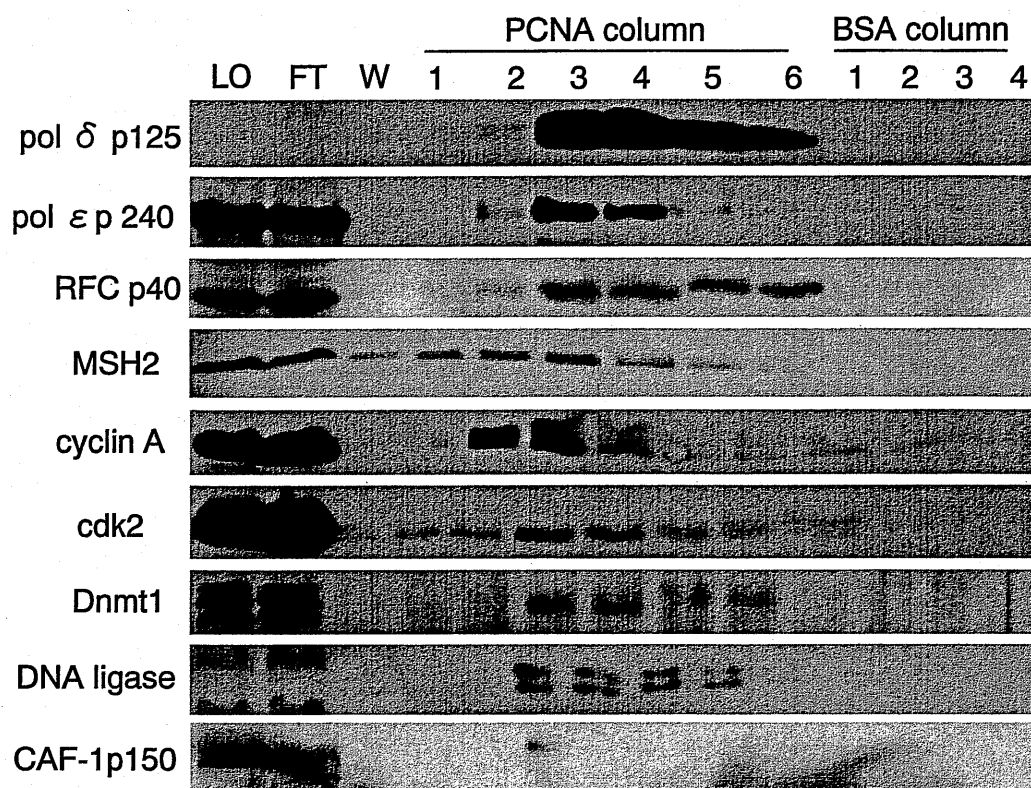


図2-3. S100を用いたときのPCNAカラム溶出画分のウエスタンブロッティング

PCNAカラムの0.3 M NaCl溶出画分 (PCNA column) とBSAカラムの1M NaCl溶出画分 (BSA column) をSDS-PAGE (12.5 %ゲル) しpol δ (p125)、pol ϵ (p240)、RFC4 (p40)、MSH2、cdk2、サイクリンA、Dnmt 1、DNAリガーゼ、CAF-1に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。LO: カラム添加画分、FT: 非吸着画分、W: 洗浄画分と示す。番号はPCNAカラムとBSAカラムの各溶出画分番号を示す。洗浄画分、PCNA溶出画分は画分1 mlのうちの、BSA溶出画分は画分0.5 mlのうちの15 μ lを泳動した。

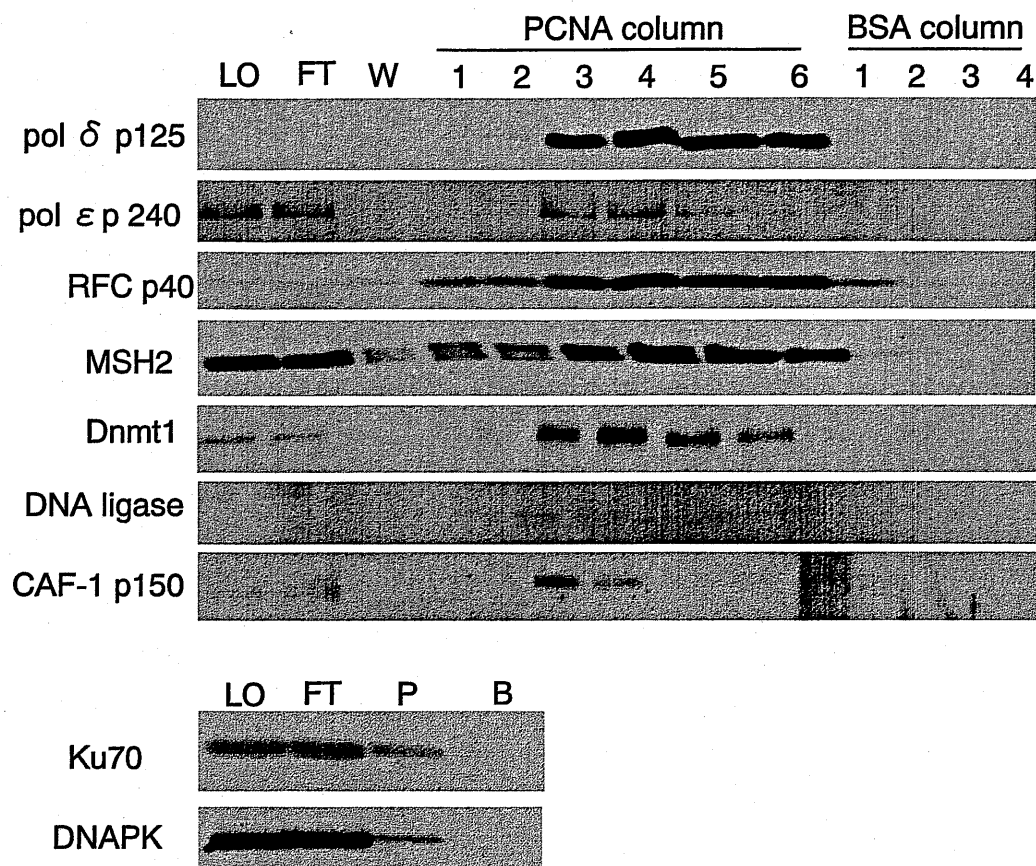


図2-4. 核抽出液を用いたときのPCNAカラム溶出画分のウエスタンブロッティング
 PCNAカラムの0.3 M NaCl溶出画分 (PCNA column) とBSAカラムの1M NaCl溶出画分 (BSA column) をSDS-PAGE (12.5 %ゲル) し、pol δ (p125)、pol ε (p240)、RFC (p40)、MSH2、Dnmt 1、DNAリガーゼ、CAF-1 (p150) に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。また、それぞれのカラムの溶出画分 (2~7) をプールしたもの (P: PCNAカラム由来、B: BSAカラム由来) についてKu70とDNAPKに対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。LO: カラム添加画分、FT: 非吸着画分、W: 洗浄画分と示す。番号はPCNAカラムとBSAカラムの各溶出画分番号を示す。洗浄画分、PCNA溶出画分は画分1 mlのうちの、BSA溶出画分は画分0.5 mlのうちの15 μlを泳動した。

P1~P4 に相当するバンドが確認された。これらをバイアスを加えずに同定するため、300 kD から 30 kD の分子量のタンパク質についてゲルごと切り出し、トリプシン消化後ゲルから回収し、そのペプチドを質量分析により解析した。得られた解析データを NCBI のタンパク質の配列データベースに対して検索し、有意にマッチするタンパク質を抽出した。生のデータから同定されたタンパク質から、明らかに PCNA と無関係でコンタミネーションと考えられるものを除いたものを PCNA カラム結合因子として示した (表 2-1、表 2-2)。S100 からは重複を含めて 41 個のタンパク質が同定され、19 種類のタンパク質が存在した (表 2-1)。このうち pol δ (p125、p66、p50)、RFC (p40、p38、p37、p36)、DNA リガーゼ、FEN1、MSH6、MSH3、MSH2、UNG2、Dnmt 1 の 12 個のタンパク質は既知の PCNA 結合因子であった。のこり 7 つの中に cDNA 配列 (AAH06278) 由来の出芽酵母の CHL12 と相同性のあるタンパク質が同定された。一方、核抽出液からは重複を含めて 52 個のタンパク質が同定され、31 種類のタンパク質が存在した (表 2-2)。このうち、16 個の既知の PCNA 結合因子で、S100 から同定されたものに加えて、pol ϵ (p240)、RFC (p140)、MSH3 が検出された。のこり 15 種類の中に PCNA との関連が報告されている DNA 修復、転写に関わる因子として、DNAPK、Ku80、Ku70、nuclear DNA helicase II (NDH II)、RPA1、BUVBL2、Myb binding protein 1a が含まれていた。さらに、ここでも出芽酵母の CHL12 と相同性のあるタンパク質が同定された。質量分析によって同定された既知の PCNA 結合因子には、ウエスタンブロッティングとプロテインシーケンサーの解析から同定された、pol δ (p125)、pol ϵ 、DNA リガーゼ、FEN1、MSH2、Dnmt1、RFC (p40) が含まれるが、さらにこれらに加えて、RFC (p40) 以外の他の 4 つのサブユニットと DNA 修復に関わる因子、MSH6、MSH3、UNG2 が同定されたが、これらは抗体の関係でウエスタンブロッティングを試みなかった因子である。また、P1~P4 を含むゲル片から、それぞれ pol δ (p125)、pol δ (p66)、pol δ (p50)、FEN1 が検出されたことから、P1~P3 は pol δ の各サブユニット、P4 は FEN1 であると考えられる。S100 と核抽出液から見いだされた、それぞれのこりの 6 つと 7 つの因子については、H1 histon family (ヒストン H1 関連因子)、segregation of mitotic chromosomes b (染色体凝縮、姉妹染色体結合関連因子)、あるいは、細胞内における機能が明らかでない因子 (AK019460、NM-006386、Non-Pou domain-containing octamer binding protein、MGC5528、AB014772、TCDF1 gene、KIAA0690、AK012242、NM-025364) が含まれていた。これらについて PCNA との結合の可能性を検討するため、アミノ酸配列を検索したが明確な PCNA 結合配列を見いだせなかった。ウエスタンブロッティング、プロテインシーケンサー、質量分析による解析から検出された因子を表 2-3 にまとめた。

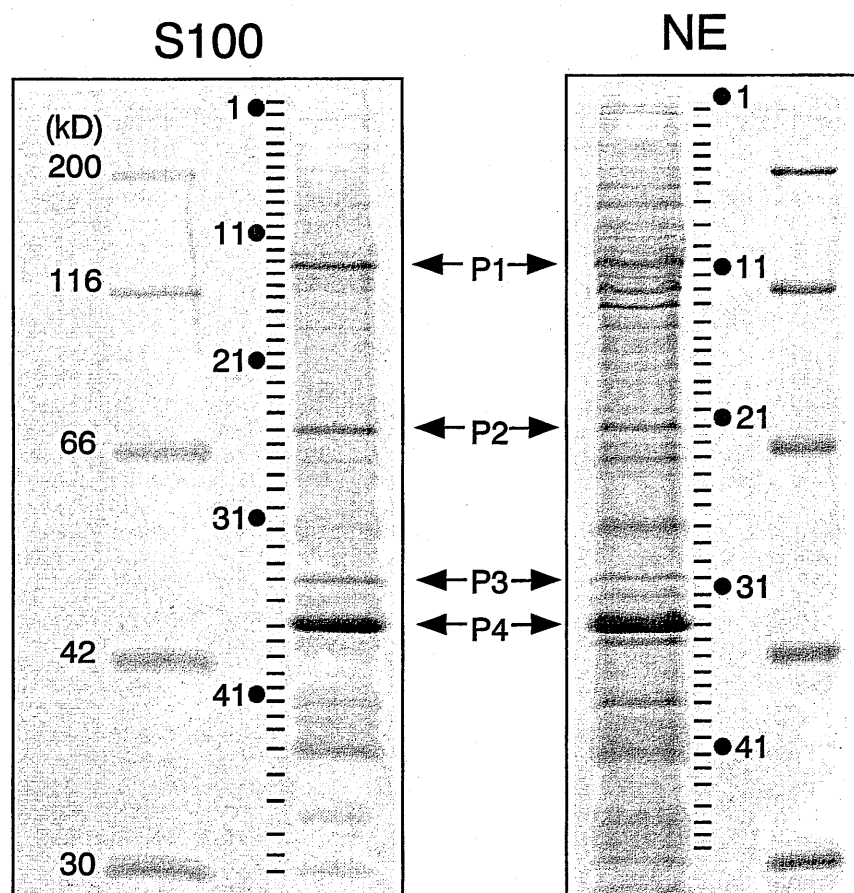


図2-5. PCNA結合因子のPCNAカラムからの溶出パターン

S100 (S100) または核抽出液 (NE) をPCNAカラムにより分画した溶出画分を集め、SDS-PAGE (12.5 %ゲル) を行い、タンパク質をCBB染色で検出した。

質量分析装置を用いた解析の試料は、図中に示した間隔でゲルを切り出し、ゲル中のタンパク質をトリブシン処理して得たペプチドを用いた。図中の数字は切り出したゲルの番号を示し、表2-1と表2-2のGel slices number に対応する。P1~P4に相当するバンドを図中に示した。

表 2-1 S100 からの PCNA カラム結合タンパク質の質量分析による解析

Gel slice number : 図 2-5 の S100 から切り出したゲルの番号に対応する。gi : 同定したタンパク質のアクセッション番号、Mass : 同定したタンパク質の分子量、Total score : 同定したタンパク質の Mascot を用いた検索のときのスコア、peptides matched : 同定されたペプチド断片数、annotation : 同定したタンパク質についての情報、を示す。

Gel slice number	gi	Mass	Total score	Peptides matched	Annotation
8	1709123	152858	214	11	DNA mismatch repair MSH6 (MUTS-ALPHA 160-kDa subunit)
11	4505933	123635	148	8	Polymerase (DNA-directed), delta, catalytic subunit (125 kDa)
	4557719	101736	77	5	DNA ligase I
12	4505933	123635	467	21	Polymerase (DNA-directed), delta, catalytic subunit (125 kDa)
	4557719	101736	326	13	DNA ligase I
13	4505933	123635	1525	57	Polymerase (DNA-directed), delta, catalytic subunit (125 kDa)
	4557719	101736	176	9	DNA ligase I
14	4505933	123635	445	16	Polymerase (DNA-directed), delta, catalytic subunit (125 kDa)
	4557719	101736	385	16	DNA ligase I
	13623351	108738	338	13	Protein for IMAGE:3959495;CHL 12
15	13623351	108738	468	17	Protein for IMAGE:3959495;CHL 12
	4505933	123635	99	4	Polymerase (DNA-directed). Delta 1, catalytic subunit (125 kDa)
16	4505933	123635	495	22	Polymerase (DNA-directed). Delta 1, catalytic subunit (125 kDa)
17	4505933	123635	488	21	Polymerase (DNA-directed). Delta 1, catalytic subunit (125 kDa)
18	4557761	104743	281	10	MutS homolog 2; mutS (<i>E. coli</i>) homolog 2
19	1285967	68462	108	7	(AK019460) putative
21	4505933	123635	110	6	Polymerase (DNA-directed), delta 1, catalytic subunit (125 kDa)
23	4505933	123635	161	9	Polymerase (DNA-directed), delta 1, catalytic subunit (125 kDa)
24	3123056	54079	131	7	KIAA0039; delta 3 (66 kDa)
25	3123056	54079	615	33	KIAA0039; delta 3 (66 kDa)
26	3123056	54079	229	10	KIAA0039; delta 3 (66 kDa)
	5453840	72371	78	4	(NM-006386) DEAD/H box polypeptide 17
31	7657383	54252	100	6	Non-Pou domain-containing octamer binding protein
33	5453924	51289	137	4	Polymerase (DNA-directed), delta 2, regulatory subunit (50 kDa)
34	5453924	51289	568	24	Polymerase (DNA-directed), delta 2, regulatory subunit (50 kDa)
35	4758356	42593	239	9	Flap structure-specific endonuclease 1; FEN 1
	5453924	51289	147	4	Polymerase (DNA-directed), delta 2, regulatory subunit (50 kDa)
36	4758356	42593	380	22	Flap structure-specific endonuclease 1; FEN 1
37	13129096	44844	227	9	Hypothetical protein MGC5528
	4758356	42593	195	7	Flap structure-specific endonuclease 1; FEN 1
	13278939	41190	132	4	(BC004223) Unknown (protein for IMAGE:3533309)
38	4758356	42593	36	1	Flap structure-specific endonuclease 1; FEN 1
40	14741989	35244	259	9	Replication factor C (activator 1) 2 (40 kDa)
41	4506489	40556	256	13	Replication factor C (activator 1) 3 (38 kDa)
	6224979	33924	155	6	Uracil-DNA glycosylase
	11990420	154157	66	4	(AB014772) MOP-3
42	6677723	38497	117	7	Replication factor C (activator 1) 5 (36.5 kDa)
43	4506491	39682	203	6	Replication factor C (activator 1) 4 (37 kDa)
44	4506491	39682	218	11	Replication factor C (activator 1) 4 (37 kDa)
47	4758356	42593	207	12	Flap structure-specific endonuclease 1; FEN 1
50	4758356	42593	212	9	Flap structure-specific endonuclease 1; FEN 1

表 2-2 核抽出液からの PCNA カラム結合タンパク質の質量分析による解析

Gel slice number : 図 2-5 の核抽出液から切り出したゲルの番号に対応する。 gi、Mass、Total score、peptides matched、annotation は表 2-1 と同様。

Gel slice number	gi	Mass	Total score	Peptides matched	Annotation
1	13654237	469089	873	36	Protein kinase-activated, catalytic polypeptide
2	1587477	138197	97	8	TCDF1 gene
3	7428081	261392	162	15	DNA-directed DNA polymerase epsilon catalytic chain A
4	4503351	183165	92	7	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
5	4503351	183165	1216	38	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
	1709123	152858	123	15	DNA Mismatch repair protein MSH6 (MUTS-ALPHA 160-kDa SUBUNIT)
6	1709123	152858	1353	47	DNA Mismatch repair protein MSH6 (MUTS-ALPHA 160-kDa SUBUNIT)
	4503351	183165	224	8	DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1
7	7657351	148851	545	17	Myb-binding protein (P160) 1a
	1709123	152858	245	22	DNA Mismatch repair protein MSH6 (MUTS-ALPHA 160-kDa SUBUNIT)
	4505933	123635	118	5	Polymerase (DNA-directed), delta 1, catalytic subunit (125 kDa)
	7513069	134598	110	8	Hypothetical protein KIAA0690
8	3334456	128283	795	24	Replication factor C (activator 1) 1 (140 kDa)
	4505933	123635	453	16	Polymerase (DNA-directed), delta 1, catalytic subunit (125 kDa)
	2500541	141944	151	5	Nuclear DNA Helicase II (NDHII)
	13928946	143205	177	10	Segregation of mitotic chromosomes b, SMC-like 1
9	2500541	141944	971	28	Nuclear DNA Helicase II (NDHII)
	4505933	123635	840	29	Polymerase (DNA-directed), delta 1, catalytic subunit (125 kDa)
10	4505933	123635	1804	63	Polymerase (DNA-directed), delta 1, catalytic subunit (125 kDa)
	4557719	101736	126	5	DNA ligase I
11	4505249	126734	1153	45	mutS (<i>E. coli</i>) homolog 3
	13623351	108738	918	26	Protein for IMAGE:3959495; CHL 12
	4505933	123635	541	16	Polymerase (DNA-directed), delta 1, catalytic subunit (125 kDa)
	4557719	101736	320	10	DNA ligase I
12	13623351	108738	606	16	Protein for IMAGE:3959495; CHL 12
14	4557761	104743	1444	43	mutS (<i>E. coli</i>) homolog 2
18	10863945	82705	550	19	ATP-dependent DNA helicase II (Ku80)
20	3123056	54079	114	9	KIAA0039; delta 3 (66 kDa)
21	3123056	54079	794	25	KIAA0039; delta 3 (66 kDa)
	4506583	68138	111	6	Replication protein A1 (70 kDa)
23	4503841	69843	420	16	Thyroid automantigen 70 kDa (Ku antigen)
29	5453924	51289	328	11	Polymerase (DNA directed). Delta 2, regulatory subunit (50 kDa)
30	5453924	51289	625	22	Polymerase (DNA directed). Delta 2, regulatory subunit (50 kDa)
	6755382	51113	146	4	RuvB-like protein 2 (<i>Mut musculus</i>)
31	4758356	42593	198	4	Flap structure-specific endonuclease 1; FEN 1
	5453924	51289	137	4	Polymerase (DNA directed). Delta 2, regulatory subunit (50 kDa)
32	4758356	42593	568	26	Flap structure-specific endonuclease 1; FEN 1
33	4758356	42593	696	22	Flap structure-specific endonuclease 1; FEN 1
34	13129096	44844	342	9	Hypothetical protein MGC5528
35	4758356	42593	235	5	Flap structure-specific endonuclease 1; FEN 1
36	14741989	35244	251	6	Replication factor C (activator 1) 2 (40 kDa)
37	4506487	39157	416	17	Replication factor C (activator 1) 2 (40 kDa)
	4506489	40556	183	6	Replication factor C (activator 1) 3 (38 kDa)
	6224979	33924	127	4	Uracil-DNA glycosylase
38	4506489	40556	516	16	Replication factor C (activator 1) 3 (38 kDa)
	6224979	33924	164	6	Uracil-DNA glycosylase
39	6677723	38497	571	20	Replication factor C (activator 1) 5 (36.5 kDa)
40	4506491	39682	484	11	Replication factor C (activator 1) 4 (37kDa)
41	4506491	39682	277	8	Replication factor C (activator 1) 4 (37kDa)
42	12848861	30961	84	3	(AK012242)
43	13384730	23553	120	2	(NM-025364) RIKEN cDNA 1110005A23 gene
45	4885379	21865	85	6	H1 histone family

表 2-3 ウェスタンブロッティング、プロテインシーケンサー、質量分析による解析により S100 と核抽出液から見いだされた PCNA カラム結合因子の PCNA との相互作用の性質の分類

S100 (S100) と核抽出液 (Nuclear extract) から見いだされた PCNA カラム結合因子のなかで、PCNA との結合能が報告されているもの (Group 1) と PCNA と機能的な関係があるもの (Group 2)、PCNA との結合の可能性が見いだせないもの (Group 3) に分類した。Group 1 に含まれる因子を DNA ポリメラーゼ (Replication DNA polymerase)、クランプローダー (Clamp loader subunits)、DNA 連結因子 (Okazaki fragment joining functions)、DNA 修復 (DNA repair functions)、DNA のメチル化 (DNA methylation functions)、クロマチン構築 (Chromosome structure functions)、細胞周期制御 (Cell cycle regulation) の項目に分類した。ウェスタンブロッティング (WES)、質量分析 (MASS)、プロテインシーケンサー (PRO) による解析から見いだされたものを (+)、見いだされなかったものを (-) で示した。

Factors from PCNA-bound fractions	S100			Nuclear extract	
	WES	MASS	PRO	WES	MASS
Group 1					
Replication DNA polymerases					
pol delta 125	+	+		+	+
pol delta 66	+	+		+	+
pol delta 50	+	+		+	+
pol epsilon	+	-		+	+
Clamp loader subunits					
RFC140		-			+
RFC40	+	+		+	+
RFC38		+			+
RFC37		+			+
RFC36		+			+
Okazaki fragment joining functions					
DNA ligase	+	+		+	+
FEN1		+	+		+
DNA repair functions					
MSH6		+			+
MSH3		-			+
MSH2	+	+		+	+
UNG2		+			+
DNA methylation functions					
Dnmt 1	+	-		+	+
Chromosome structure functions					
CAF-1	+	-		+	-
Cell cycle regulation					
Cdk2	+	-			-
Cyclin A	+	-			-
Group 2					
CHL 12		+			+
DNAPK		-		+	+
Ku 80 (heli II)		-			+
Ku 70		-		+	+
NDH II		-			+
RPA 1		-			+
RUVBL2		-			+
Myb binding protein 1a		-			+
Group 3					
E06811			+		
AK019460		+			-
NM-006386		+			-
NON-Pou domain-containing octamer binding protein		+			-
MGC5528		+			+
BC004223		+			-
AB014772		+			-
TCDF 1 gene		-			+
KIAA0690		-			+
Segregation of mitotic chromosomes b		-			+
AK012242		-			+
NM-025364		-			+
H1 histone family		-			+

2-4 考察

2-4-1 アフィニティークロマトグラフィーの評価

ここで用いたアフィニティークロマトグラフィー以外に、タンパク質間相互作用を検出する方法にはいくつかある。実際に、PCNA 結合因子の多くは two-hybrid 法や免疫沈降法で単離されてきた。免疫沈降の場合、細胞抽出液中で形成されている PCNA と PCNA 結合因子複合体を検出することになる。しかしこの方法を用いるためには効率よく免疫沈降でき、かつ PCNA と PCNA 結合因子との相互作用で結合が妨げられない抗体が必要である。また、PCNA と安定に複合体を形成しているタンパク質に限られる。また two-hybrid 法は未知の PCNA 結合因子を検索するには有効であるが活性型 PCNA にのみ結合できる因子の検出は困難である。これらの方法と比べると、アフィニティークロマトグラフィーでは、結合活性のあるものを大過剰の PCNA との親和性を利用して選別するため、特異的な因子を効率よく濃縮、単離できる。また、直接 PCNA と結合しない因子でも、PCNA 結合因子と複合体を形成するものも同時に得ることができる。また、活性型の PCNA に特異的な因子も効率よく得ることができる。今回、PCNA カラムの利点を十分に反映し、一度のカラム操作で 20 近い既知タンパク質を含む PCNA 結合因子が得られている。問題点としては、細胞内あるいは抽出液中ですでに PCNA と安定な複合体を形成している因子は検出できないことと、リガンドにするタンパク質が PCNA のように得やすいものでないといけないこと、特異的な結合と非特異的な結合をもつタンパク質の区別を客観的に行うには十分な比較実験が必要な点があげられる。

2-4-2 質量分析の有効性

すでに、PCNA カラムとウエスタンブロッティング、プロテインシーケンサーの組み合わせによって PCNA 結合因子の同定が行われた前例があり (Loor et al., 1997, Hughes et al., 1999)、今回、同じ方法で同定を試みた。しかしながら、ウエスタンブロッティングは、抗体の特異性が高ければ高感度で検出可能であるが、解析する因子は使用できる抗体に限られ、未知の因子の同定には適さない。また、プロテインシーケンサーによる解析では、高度に精製されたタンパク質が 10 pmol 以上必要であり、網羅的解析を行うことは困難である。実際に P1~P5 および p56 についてプロテインシーケンサーによる同定を試みたが、試料作成中の収率の問題で P1、P2、P3 についてはアミノ酸配列の決定には至らなかった。質量分析による同定では、100 fmol ほどのタンパク質で同定可能であり、また、何種類かのタンパク質が混在している試料、たとえば一次元の SDS-PAGE 断片から直接解析が行える。本研究の解析はこの分析機器の特性を利用し、電気泳動ゲル内に含まれるタンパク質を網羅的に解析

することの有効性を示した好例と考える。一方で、S100 の分画の pol ϵ 、Dnmt 1、CAF-1 および核抽出液の分画の CAF-1 などのように、ウエスタンブロッティングでは検出されるが、質量分析では検出できなかった例がある (表 2-3)。これらは、ウエスタンブロッティングの感度が質量分析の感度を上まわった例と思われる。

2-4-3 PCNA カラムに結合した既知の因子

今回、PCNA カラムの分画から多数の既知の PCNA 結合因子が同定された (表 2-3 Group 1)。これまでに報告されている PCNA カラムによる分画では、仔牛胸腺の細胞質抽出液とマウス FM3A 細胞の抽出液をイオン交換カラムで分画した画分を材料としている (Loor et al., 1997、Hughes et al., 1999)。本研究では、なるべくバイアスをなくし、網羅的な解析を行うため S100 と核抽出液の両方を用いた。用いた抽出法では、操作中に複製因子がある程度、核内から細胞質に溶出し S100 に含まれるため (Stillman and Gluzman, 1985)、厳密に細胞質と核の局在を反映しない。しかし、2つの抽出液を用いた解析の比較から、PCNA 結合因子の細胞内の存在様式についての情報が得られる。たとえば、質量分析により、RFC (p140) は核抽出液のみに、その他の 4 つのサブユニットは S100 と核抽出液の両方から検出された (表 2-3)。一方、ウエスタンブロッティングの解析から、S100 に存在する RFC (p40) のうち PCNA カラムに結合した割合は非常に少ない。これに対し、核抽出液では抽出液の RFC より PCNA 溶出画分内の RFC 量の方が明らかに多く、核抽出液の RFC は PCNA カラムにより効率よく濃縮されている。これまでバキュロウイルス発現系由来の組み換え型 RFC の精製において、活性型 5 量体 RFC のみが PCNA カラムに結合することが観察されている。このことから核内では存在する RFC のかなりの割合が活性型 5 量体を形成していることを示しており、核抽出液中に存在する活性 5 量体がカラムに結合したと考えられる。このことはヒト細胞からの RFC の精製において核抽出液を使用した方がより効率よく RFC 活性が精製できることともよく一致する (Tsurimoto and Stillman, 1989)。S100 からも RFC p140 以外のサブユニットが検出されたことから、S100 中ではのこり 4 つのサブユニットが複合体を形成し、PCNA と結合する可能性がある。実際に、p36、p37、p40 の 3 つのサブユニットが複合体を形成し、PCNA と相互作用することが報告されている (Cai et al., 1997)。しかしながら、今回、CHL12 が S100 から検出されたことから、RFC p37、p36、p40、p38 は CHL12 と複合体を形成している可能性も考えられる。

MSH2 と MSH6 または MSH3 は、それぞれ MutS α または MutS β と呼ばれる複合体を形成しミスマッチ修復においてエラー鎖の識別に関与する (Acharya et al., 1996)。MSH2 は PCNA と直接結合することは報告されておらず、おそらく、MutS α 、MutS β 複合体として PCNA カラムに結合したと考えられる。MutS α と MutS β は結合す

る DNA の特異性に違いがあり (Genschel et al., 1998)、MSH3 が核抽出液からのみ見いだされたことは (表 2-3)、この結合する DNA の特異性の違いが反映されたものかもしれない。

質量分析により、S100 と核抽出液の両方から検出された既知の PCNA 結合因子についてみると、pol δ (p125) は、ウエスタンブロッティングにより S100、核抽出液では検出されなかったが、PCNA カラム溶出画分につよく検出されたことから、PCNA カラムで非常に効率よく濃縮したことになる。質量分析による解析から、P1 が pol δ (p125)、P2 が pol δ (p66)、P3 が pol δ (p50) と同定された。これらは、pol δ 複合体としてカラムに結合したものと考えられるが、実際に、イオン交換クロマトグラフィーによるさらなる精製をおこなったところ、これら 3 つの因子が同じ画分に回収され、そこに PCNA 依存ポリメラーゼ活性が存在した (結果不掲載)。pol δ (p66) は、本研究の進行中に第 3 の pol δ サブユニットとしてマウスの培養細胞および仔牛胸腺から見いだされたが、本研究室の四方により、p66 は PCNA、さらに p50 と相互作用し、pol δ の複合体形成時には p125-p50 の安定化および PCNA への結合を促進する活性を示すことが明らかにされている (Shikata et al., 2001)。

ここでは pol ϵ (p250) がウエスタンブロッティングと質量分析から、S100、核抽出液の双方で PCNA カラムに特異的に結合していることが示された。ウエスタンブロッティングによる解析から、抽出液に含まれる pol ϵ の一部しか結合しておらず、pol δ と比べると結合性が低いことがわかる。pol ϵ (p250) は p55、p17、p12 サブユニットと複合体を形成しているが、p55 を質量分析でも検出できなかった。したがって、複合体状態および活性の有無は不明である。

ウエスタンブロッティングによる解析から、サイクリン A と cdk2 は S100 のものは PCNA カラム特異的に結合した。しかし、含有量と比べると PCNA カラムから回収された量は低く、結合性はあるが PCNA 結合の特異性という点からは、特異、非特異の境界に有る因子である。特に、核抽出液由来のものは BSA カラムにも結合した (結果不掲載)。サイクリン A と cdk2 は核内では複合体として存在する (Pagano et al., 1992)。したがって、S100 ではフリーとして、核抽出液では複合体として存在し、核内の複合体は非特異的な結合がより高くなるように思われる。

2-4-4 CHL12

本研究により、見いだされた PCNA 結合因子の候補 CHL12 は出芽酵母の解析からチェックポイント、染色体接着に関与し、Rad17 とともに RFC の RFC1 と一次構造が似ていることが知られている (Mauer et al., 2001、Naiki et al., 2001)。また、Rad17 については RFC1 を除く残りの 4 つのサブユニット (RFC2-5) との相互作用が示されており、RFC1 と入れ代わって新規のクランプローダーとなることが予想されてい

る (Skibbens et al., 1999)。これらのことから、CHL12 もクランプローダーとして機能することが予想されていた。実際に、本研究室の塩見により昆虫細胞でヒト CHL12 および RFC2-5 から成る新規のクランプローダー型の複合体が再構築された。塩見は、この PCNA カラムの結果を基にして、CHL12 が RFC2-5 と複合体になった時のみ、PCNA と特異的な結合をすることを示した (Ohta et al., 2002)。この二つの研究を総合して、染色体接着因子 CHK12 が RFC2-5 と複合体を形成し、PCNA をターゲットとした新たなクランプローダーであることを初めて示すことができた。

2-4-5 PCNA と機能的な相互作用をもつ因子

PCNA カラムに結合した因子のなかで、PCNA との直接の結合は見いだされていないが、PCNA と機能的なむすびつきのある因子を Group 2 とした。そこに含まれるもののうち、Myb-binding protein 1a は出芽酵母 DNA polymerase ϕ (Sc pol ϕ) とアミノ酸配列上の相同性がある。Sc pol ϕ は最近見つけられた必須の DNA ポリメラーゼで rRNA 合成に関与する (Shimizu et al., 2002)。Sc pol ϕ は配列上に PIP モチーフを持ち、実際に PCNA により活性が促進されることが示された。ヒト細胞から PCNA 結合因子として、ヒトの Sc pol ϕ のカウンターパートが見いだされたことは、ヒトにおいても Sc pol ϕ に相当する因子が PCNA と相互作用して機能することが予想される。しかしながら、Myb-binding protein 1a は Sc pol ϕ に見られる DNA ポリメラーゼドメインを保存しておらず DNA ポリメラーゼの活性を持たないと考えられる。ヒトにおける PCNA との Myb-binding protein 1a の結合の意義についての解析は PCNA の遺伝子発現制御との関係を考える上で興味深い問題である。

DNA 修復あるいは転写に関わる因子 NDH II、RPA1、RUVBL2、DNAPK、Ku70、Ku80 は PCNA カラムから検出されたが、これらについてそのアミノ酸配列から PCNA 結合配列の検索を行ったが、明確なものは得られていない。また、PCNA との直接の結合は報告されていない。また、当研究室の解析でも DNAPK、Ku70、Ku80 と PCNA の直接の結合は見いだせなかった (結果不掲載)。したがって、他の因子を介して複合体として PCNA と結合したと考えられる。RPA1 と NDH II についてはこの研究とは別に他のグループで行われた同様の研究からも見いだされている (Loor et al., 1997)。NDH II は DNA ヘリカーゼと RNA ヘリカーゼの両方の活性を持つが、DNA 複製あるいは転写においての役割は明らかにされていない。RUVBL2 は大腸菌の DNA 組み換え因子 RuvB のホモログであり、別のホモログ RUVBL1 と複合体を形成し転写への関与が示唆されている (Makino et al., 1999)。一方、RUVBL1 は RPA のサブユニット RPA3 と相互作用することが知られており、おそらく、RPA1、RUVBL2、RUVBL1 およびその他の因子からなる転写複合体として PCNA カラムに結合したものと思われる。Ku70 は Ku80 とともに DNAPK と複合体を形成し、DNA 二重鎖切断

の修復に関与することが知られており、一方で、ラット培養細胞を用いた解析から PCNA とともに RNA ポリメラーゼ I と共精製されることが報告されている (Hannan et al., 1999)。実際に、核内で PCNA と局在を共にすることが知られており (Yaneva et al., 1991)、PCNA と機能的なつながりを持つ Ku70、Ku80 と DNAPK がなんらかの因子を介して PCNA カラムに結合したものと考えられる。

PCNA は DNA 合成反応時、RFC にロードされ、pol δ の DNA 合成反応で最初に機能した後も DNA 上に留まり、DNA 鎖の連結因子である DNA リガーゼや FEN1 の足場となる。こうした複製フォーク内の反応の連携役を果たす一方で、DNA 修復、細胞周期制御そして染色体構造維持機構と複製反応とをさまざまな因子との相互作用を通し厳密に連動させている。DNA が直接機能する DNA 複製反応の中心である PCNA を介した機能ネットワークは、これまでに明らかになった以上の広がりを持つことが予想される。今回、網羅的な PCNA 結合因子の解析により新たな PCNA 結合因子の候補 CHL12 が同定されたことで、PCNA を介した、姉妹染色分体接着と複製反応との間に存在する新しい機能ネットワークの存在を示すことができた。

第3章

ORC 複合体形成制御とその機能

3-1 序

DNA 複製開始機構は、種々のプラスミドやファージにおいて著しい多様性を示すが、イニシエーターが複製開始点の特定の塩基配列を認識して結合することによって、それに隣接する DNA 領域を開裂し、そこにヘリカーゼが導入されて、プライマー合成、DNA 合成に至るという共通のメカニズムが存在する。真核生物の染色体 DNA 複製の開始においても、大腸菌の DnaA に相当するイニシエーターが存在することが予想され、それらの機能と制御を知ることで真核生物の複製開始機構の解明につながると考えられた。その流れを受けて、複製開始点の配列を解析し、そこに結合するタンパク質を同定するという試みが酵母を中心に行われた。出芽酵母の解析では、染色体 DNA 断片を環状にして細胞に戻し、それが染色体と独立して複製し維持されるという活性（自律複製配列、autonomously replicating sequence、ARS）を目安に多くの ARS が単離された。さらに、多くの ARS 配列が実際に染色体上で複製開始点として機能していることが確認された。そして、すべての ARS に保存される 11 塩基対の必須配列（ARS consensus sequence、ACS）に結合する因子として ORC が同定された（Bell and Stillman, 1992）。このタンパク質は 6 つのサブユニットからなり、分子量の大きい順に ORC1~ORC6 と呼ばれる。ACS 配列の塩基置換が ORC 結合能と複製能を消失させることから、ORC と ACS 配列の特異的相互作用が複製開始に必須であることが示された。さらに、各サブユニットをコードする遺伝子がクローニング化され、遺伝子破壊法によりおのおのの遺伝子を欠損させることによって、それらが増殖に必須であることが示された（Bell et al., 1995）。また、温度感受性変異株を用いた解析などから、ORC の機能が DNA 複製に必須であることが明らかにされた（Micklem et al., 1993, Loo et al., 1995）。これらのことから、ORC がイニシエーターとしてレプリケーターである ACS を認識し、特異的に結合して複製開始反応に関与すると考えられた。しかしながら、*in vivo* フットプリント法やクロマチン免疫沈降法により、ORC 複合体が細胞周期を通して複製開始点に結合していることが示され（Diffley et al., 1994, Fujita et al., 1998, Tadokoro et al., 2002）、複製開始の直前にレプリケーターに結合し、開始反応を行うイニシエーターの概念には単純にはあてはまらないことから、ORC のほかに複製開始には細胞周期に制御された別の因子の関与が予想された。実際に、M 期後期から G1 期にかけて CDC6 と CDT1 に依存して MCM

が ORC の結合した複製開始領域に集合し、pre-RC を形成することが示された (Liang et al., 1997, Aparicio et al., 1997, Tanaka et al., 1997)。MCM は 6 個のサブユニット MCM2 ~ MCM7 からなり、弱い DNA ヘリカーゼ活性をもつことが示されていることから (Ishimi, 1997, You et al., 1999, Lee and Hurwitz, 2000)、DNA 複製において DNA ヘリカーゼとして機能すると考えられている。pre-RC を形成した複製開始領域から DNA 合成が開始するためには、DNA ポリメラーゼを含む多くのタンパク質群が複製開始領域に結合することが必要であるが、開始反応から伸長反応へ至る過程はまだ十分に解明されているとは言い難い。

出芽酵母で発見された ORC をはじめ、多くの因子が真核生物を通じて保存されていることから、複製開始反応は普遍的な機構により起こると予想された。しかしながら、レプリケーターの構造は生物種により大きく違っており、また、出芽酵母以外では必須コンセンサス配列はみつからないことから、出芽酵母での認識機構がそのままほかの生物種にあてはまるとは限らない。分裂酵母内で自律複製する断片は約 1kb で、出芽酵母の 100 塩基対と比べて広い領域が要求され、この領域に ORC が局在することが示されている (Ogawa et al., 1999)。一方、ショウジョウバエの約 7.7kb からなる chorion 遺伝子領域は卵形成に伴って増幅することが知られており、遺伝子増幅に必要な領域、ACE3 領域、AER-a 領域、AER-b 領域、AER-c 領域、AER-d 領域が同定されている (Delidakis and Kafatos, 1989)。約 320 塩基対の ACE3 領域は遺伝子増幅に必須であるが、複製は約 1kb 離れた AER-d 領域 (ori- β) から開始する。このように、ショウジョウバエ chorion 遺伝子レプリコンでは、必須配列と複製開始点とが離れて存在していると考えられている。また、この ACE3 領域および AER-d 領域に ORC が局在することが示されているが (Austin et al., 1999)、その結合に必須な配列は同定されていない。哺乳類細胞ではチャイニーズハムスター CHO 細胞のジヒドロ葉酸レダクターゼ遺伝子 (DHFR) 領域が 100~200 コピーに増幅している株が分離され、この遺伝子の下流に 50kb にわたる広い領域のどこからでも複製が開始する複製開始ゾーンが同定された (Vaughn et al., 1990)。さらに、このゾーンの内部に特定の複製開始点 (ori β) も同定された (Brewer and Fangman, 1987)。DHFR 遺伝子のプロモーター領域を欠失させると ori- β からの複製が減少することが示されており、複製開始領域から遠く離れた部位が複製に関与することがこの系においても示唆されている。また、ヒト細胞においては β グロビン遺伝子クラスターの、 β グロビン遺伝子上流に複製開始点 (β -globin ori) が同定された (Aladjem et al., 1995)。この領域の欠失株では複製開始が消失することから、実際に、開始する領域と開始に必要な領域はほぼ一致すると考えられるが、一方で 50kb 上流の Locus Control Region と呼ばれる領域が複製に必要なことも報告されている。哺乳類細胞では安定に保持される高い複製効率の ARS 断片が得られておらず、複製開始に必要なレプリケ

ーターとしての構造は明らかにされていないが、これらの知見から、その構造が複雑であることは容易に想像できる。一方、イニシエーターとして機能すると考えられる ORC については、ショウジョウバエの ORC2、ORC3、ORC5 遺伝子変異の解析から、DNA 複製に必要であることが示されている (Michelle and Michael, 2001, Pinto et al., 1999, Landis et al., 1997, Chesnokov et al., 2001)。また、アフリカツメガエルの卵抽出液を用いた試験管内複製系を用いた解析で ORC を除去すると DNA 複製の開始が阻害されることが示されており (Carpenter et al., 1996, Rowles et al., 1996, Romanowski et al., 1996, Carpenter and Dunphy, 1998)、これらの高等真核生物においても ORC が複製開始に機能することが示されている。さらに、ショウジョウバエの初期胚およびアフリカツメガエルの卵抽出液からは複数のサブユニットから構成される ORC 複合体が単離され (Gossen et al., 1995, Rowles et al., 1996, Romanowski et al., 1996)、出芽酵母と同様に ORC が複合体として機能することが示唆されている。また、アフリカツメガエルの解析から、ORC に依存して CDC6 が染色体に結合し、さらに ORC と CDC6 に依存して MCM が染色体と結合することが示され (Coleman et al., 1996)、出芽酵母でみられた ORC を足場とした段階的な pre-RC 形成による複製開始の制御が種を越えて保存されていると考えられる。ヒトにおいても 6 つのサブユニットに対応するタンパク質 (ORC1~6) の存在が示されているが (Tugal et al., 1998, Gavin et al., 1995, Ohtani et al., 1996, Quintana et al., 1997, Quintana et al., 1998, Ishiai et al., 1998, Dhar et al., 2000)、ヒトを含めた哺乳類細胞の ORC については、細胞内での機能はもちろん、pre-RC の構成因子である CDC6 や MCM との相互作用、さらには細胞内での ORC サブユニット間の相互作用についても明らかにされていない。

複製開始においてイニシエーターとして機能すると予想される ORC の機能の解明は、複製開始反応の理解にとどまらず、開始反応から合成反応へ至る制御機構、さらに DNA 複製と細胞周期とをつなぐ制御機構の解明に必須である。本研究では、ヒト細胞内での ORC の機能を明らかにするため、ORC の複合体形成の制御とその機能について解析を行った。

3-2 材料と方法

3-2-1 緩衝液

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

ホウ酸緩衝液: 0.2 M ホウ酸 pH 9.0

ウエスタンブロッティング用転写緩衝液 B: 25 mM Tris-HCl、192 mM Glycine、10% methanol

エタノールアミン緩衝液 B: 0.2 M 2-aminoethanol pH 8.0

3-2-2 抗体

抗 ORC1 抗体は 6×His タグを融合した ORC1 (1-698 アミノ酸) を抗原にウサギポリクローナル抗体を SIGMA GENOSYS に委託し作製した抗血清を抗原カラムで精製したものを用いた。抗 ORC2 抗体 (3B7) は MBL のマウスモノクローナル抗体を用いた。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)。抗 ORC5 抗体は GST タグを融合した ORC5 (全長) を抗原にウサギポリクローナル抗体を SIGMA GENOSYS に委託し作製した抗血清を抗原カラムで精製したものを用いた。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 MCM7 抗体 (sc9966) は Santa Cruz Biotechnology のマウスモノクローナル抗体を用いた。ヤギ抗ウサギ (IgG) 抗体とヤギ抗マウス (IgG) 抗体は BIO-RAD から購入したものを用いた。

3-2-3 抗 ORC1 抗体ビーズの作製

1ml の protein A セファロース (Amersham Biosciences) と 200 μg IgG の抗 ORC1 抗体を TBS 緩衝液中、室温で 2 時間反応させ結合させた。ビーズをホウ酸緩衝液で洗浄し、20 mM dimethyl pimelimidate dihydrochloride (SIGMA) を含むホウ酸緩衝液中、室温で 30 分反応させ、固定化した。エタノールアミン緩衝液 B で 1 回洗浄後、エタノールアミン緩衝液 B 中、室温で 2 時間インキュベートした。ビーズを TBS 緩衝液で洗浄したものを抗 ORC1 抗体ビーズ (2 μg IgG/10 μl ビーズ) とし、免疫沈降実験に用いた。前血清についても同様の操作により IgG を protein A セファロースに固定化し、コントロールビーズ (2 μg IgG/10 μl ビーズ) として免疫沈降実験に用いた。

3-2-4 培養細胞

培養細胞は HeLa S3 細胞 (ヒト子宮頸癌由来)、HepG2 細胞 (原発性肝芽細胞腫ヘパト بلاストーマ由来)、293 細胞、TERT-RPE1 細胞 (ヒト網膜色素上皮細胞株をテロメラーゼで不死化した細胞、clontech)、FLAG-ORC1 発現細胞を用いた。各々の細胞は 10 % FBS (Fetal Bovine Serum、GIBCO BRL) と 1 % Penicillin-Streptomycin (PS、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。

3 × FLAG タグを融合した ORC1 の発現細胞株 (1C2) は以下のように作製した。ORC1 の cDNA の C 末側に 3 × FLAG 配列 (5'-GACTACAAAGACCATGACGGTGATTATAAAGATGATGACATCGATTACAAGGATGACGATGACAAGATC-3') を N 末側に Kozak 配列 (5'-GCCGCCGCC-3') を付加したものを pcDNA3.1 (CLONTECH) に挿入した。得られたプラスミドを Fugene 6 (Roche Molecular Biochemical) を用いて 293 細胞にトランスフェクションした。

3-2-5 細胞同調

G1/S 期に同調した細胞を得るため、以下に示す方法を用いた。2 × 10⁶ 個の細胞を 15 cm プレートに植え継ぎ、10 % FBS、1 % PS を含む DMEM 15 ml 中で 12 時間培養した。その後、培地を 2.5 mM チミジン (SIGMA)、10 % FBS、1 % PS を含む DMEM 15 ml 中に置換して培養し、12 時間培養し、再び培地を 2.5 mM チミジン、10 % FCS、1 % PS を含む DMEM 15 ml 中に置換して 24 時間培養した。

M 期に同調した細胞を得るため、微小管の重合阻害剤である 3-(1-Anilinoethylidene)-5-benzylpyrrolidine-24-dione (TN16) (和光純薬) を使用し、以下の方法で行った。チミジンを用いた方法と同様の処理のあと、培地を 150 ng/ml TN16、10 % FCS、1 % PS を含む DMEM 15 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 回洗浄した後、10 % FBS、1 % PS を含む DMEM を加えて行った。

3-2-6 Triton X100 による細胞分画

プレートで培養した細胞を氷冷 PBS で 2 回洗浄した後、細胞濃度が 1 ~ 10 × 10⁴/ul になるように氷冷した 100 mM NaCl を含む 0.1 % TX-CSK (0.1 % TX-100mCSK) 緩衝液を加え、細胞を Cell Lifter (Costar 社) でかきとり、コニカルチューブに回収し氷上で 10 分間インキュベートした後、180 × g、4°C、3 分間遠心し可溶画分 (sup 1) と不溶画分に分画した。不溶画分に一回目の抽出時と同量の氷冷 0.1 % TX-100mCSK 緩衝液を加えて氷上で 5 分間インキュベートした後、180 × g、4°C、3 分間遠心し可

溶画分と不溶画分 (ppt 1) に分画した。

3-2-7 DNase I による細胞分画

HeLa 細胞から調整した 1×10^6 細胞相当の ppt 1 を $100 \mu\text{l}$ の氷冷した 0.1 % TX-100mCSK 緩衝液に懸濁し、ATP と DNase I (Roche Molecular Biochemicals) をそれぞれ 1 mM、1000 units/ml になるように添加した後、 25°C で 40 分間インキュベートし、 $180 \times g$ 、 4°C 、3 分間遠心し可溶画分と不溶画分に分画した。

3-2-8 タンパク質の塩による抽出

HeLa 細胞から調整した ppt 1 (1×10^7 細胞相当) を $200 \mu\text{l}$ の 300 mM NaCl を含む 0.1% TX-CSK 緩衝液に可溶化し、氷上で 30 分間インキュベートした後、 $180 \times g$ 、 4°C 、3 分間遠心し、可溶画分と不溶画分に分画した。この不溶画分に一回目と同様に 300 mM NaCl を含む 0.1 % TX-CSK 緩衝液を加え、不溶画分を可溶化し、氷上で 5 分間インキュベートした後、 $180 \times g$ 、 4°C 、3 分間遠心し可溶画分と不溶画分に分画した。可溶画分を集めて塩抽出液とし免疫沈降実験に用いた。必要に応じて NaCl 濃度を変えて抽出を行った。

3-2-9 免疫沈降

抗 ORC1 抗体ビーズを用いた免疫沈降：HeLa 細胞 (1×10^7 細胞相当) から調整した 300 mM NaCl を含む氷冷 0.1 % TX-CSK (0.1 % TX-300mCSK) 緩衝液で抽出した塩抽出液 ($200 \mu\text{l}$) を $17800 \times g$ 、10 分間、 4°C で遠心した。上清と $10 \mu\text{l}$ の抗 ORC1 抗体ビーズまたはコントロールビーズを混合し 3 時間、 4°C でインキュベートした。ビーズを 0.1 % TX-300mCSK 緩衝液で 3 回洗浄した後、 $20 \mu\text{l}$ の 0.1M グリシン、pH 2.0 でビーズ結合タンパク質を溶出した。

抗 ORC2 抗体による免疫沈降：HeLa 細胞 (5×10^6 細胞相当) から調整した 0.1 % TX-300mCSK 緩衝液で抽出した塩抽出液 ($200 \mu\text{l}$) を $17800 \times g$ 、10 分間、 4°C で遠心し、上清と抗 ORC2 抗体またはマウス IgG ($0.5 \mu\text{g}$ 、SIGMA) を混合し 2 時間、 4°C でインキュベートした。次に、 $10 \mu\text{l}$ の protein A ビーズを加え、1 時間、 4°C で攪拌した。ビーズを 0.1 % TX-300mCSK 緩衝液で 3 回洗浄した後、 $20 \mu\text{l}$ の 0.1M グリシン、pH 2.0 でビーズ結合タンパク質を溶出した。

抗 FLAG 抗体ビーズを用いた免疫沈降：293 細胞または GST-ORC1 を発現させた 293 細胞 (2×10^7 細胞相当) から調整した 0.1 % TX-300mCSK 緩衝液で抽出した塩抽出液 ($270 \mu\text{l}$) を $17800 \times g$ 、10 分間、 4°C で遠心し、上清と $10 \mu\text{l}$ の抗 FLAG 抗体ビーズ (anti-FLAG M2-agarose affinity gel, SIGMA) を混合し 2 時間、 4°C でインキュベートした。ビーズを 0.1 % TX-300mCSK 緩衝液で 3 回洗浄した後、 $100 \mu\text{l}$ の $3 \times$

FLAG ペプチド (SIGMA) を含む 0.1 % TX-300mCSK 緩衝液で結合タンパク質を溶出した。

3-2-10 SDS ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

本論文 1 章参照。

3-2-11 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転写緩衝液 B 中で 4 時間、20 V の条件でブロッティングした。以下の操作は、本論文 1 章参照。

3-2-12 ウェスタンブロッティングのシグナルの定量

ウェスタンブロッティングのシグナルの定量は KODAK ID image analysis system Ver. 3.5 (Eastman Kodak Company) を用いて定量した。

3-2-13 質量分析装置を用いたタンパク質の同定

本論文 1 章参照。

3-2-14 フローサイトメトリーによる細胞周期解析

細胞 ($\sim 1 \times 10^6$) をトリプシン処理した後、1.5 ml のエッペンドルフチューブに回収して遠心し上清を除き、200 μ l のフロー試薬 (50 mM sodium citrate、10 % Triton X-100、1.6 mg / ml propidium iodide) を加え懸濁し室温、暗条件下で 10 分間静置した。RNase A を 1 μ g/ml になるように加え室温、暗条件下で 30 分間反応させた。propidium iodide の蛍光強度をファックスキャン (Becton Dickinson) を用いて解析した。

3-2-15 プロモデオキシウリジン (BrdU) の細胞への取り込みと抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色による細胞周期解析

カバーガラスを入れた 10 cm プレートを用いて細胞を G1/S 期または M 期に同調した。同調した細胞をリリースし、細胞回収の 30 分前に培地中に BrdU (終濃度 10 μ M) を加えた。30 分後、カバーガラスを取り出し、PBS で 2 回洗浄した。細胞の DNA に取り込まれた BrdU の検出は 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I (Roche) を用いた。

3-2-16 siRNA を用いた解析

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'-UAGUUUGGCATCACUGGAGTT-3'), Lamin A の siRNA オリゴ (Lamin Aa : 5'-CUGGACUUCCAGAAGAACATT-3'、Lamin AB : 5'-UGUUCUUCUGGAAGUCCAGTT-3'), Luciferase の siRNA オリゴは日本バイオサービスに委託し作製した。 3×10^5 個の HeLa 細胞を 6 cm プレートにまき、2 ml の 10 % FBS を含む DME で 37°C、5 % CO₂ 条件下で 24 時間培養した。4 μ l の oligofectAMINE (Invitrogen) と 32 μ l の Opti-MEM 培地 (GIBCOBRL) を混合し、室温で 10 分間静置した。この溶液と 20 μ M のアニーリングしたオリゴを 340 μ l の Opti-MEM で希釈したものを混合し室温で 20 分間静置した後、細胞に加え軽く混合した。37°C、5 % CO₂ 条件下で 48 時間培養後、細胞を回収した。

3-3 結果

3-3-1 ORC サブユニットの染色体および核構造との相互作用の解析

ヒト ORC サブユニットの細胞内局在を調べるため、非同調 HeLa 細胞について非イオン性界面活性剤 (Triton X100) と DNase I による分画を行った (図 3-1)。Triton 分画による不溶画分は染色体に結合しているタンパク質を含むと考えられている。一方、DNase I 分画による可溶画分は、MCM やヒストンなど染色体 DNA に結合しているタンパク質を含み、不溶画分は核構造あるいは特殊な染色体 DNA に結合しているタンパク質を含むと考えられている (Fujita et al., 1999)。全細胞抽出液、および Triton 分画の可溶画分と不溶画分について ORC1、ORC 2、ORC 3、ORC 4、ORC 5 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。その結果、これらのすべての ORC サブユニットの大部分が Triton 不溶画分に存在した (図 3-1 Triton)。このことから、各 ORC サブユニットは染色体と結合していると考えられる。DNase I 分画では、大部分の ORC1 が不溶画分に存在し、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 は半分量が可溶画分に存在した (図 3-1 DNase I)。これらから、染色体に結合している ORC1 は大部分が核構造とも相互作用しており、一方、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 は単に染色体に結合しているものと核構造とも相互作用するものと、少なくとも 2 つの存在様式があることが予想された。さらに、Triton 不溶性の ORC サブユニットの塩に対する抽出性を調べるため、Triton 不溶画分について 100 mM から 500 mM の NaCl による分画を行った (図 3-1 NaCl)。その結果、ORC1 は 200 mM の NaCl では可溶化せず、300 mM の NaCl で可溶化した。一方、ORC2、ORC 3、ORC 4、ORC 5 は 200 mM で約半分量が可溶化し、300 mM でほぼ全量が可溶化した。DNase I と NaCl 分画にみられる ORC1 と他の ORC サブユニットの挙動の違いは、核内での局在が異なることを反映したものと考えられた。

3-3-2 ORC1 と他の ORC サブユニットとの相互作用の解析

ORC1 から ORC5 のすべてサブユニットが染色体と相互作用することが示されたことから (図 3-1、Triton)、出芽酵母と同様に複合体を形成し染色体上で機能することが予想される。そこで、ヒト細胞において ORC サブユニットが相互作用して複合体を形成しているか否か検討するために、非同調 HeLa 細胞の 300 mM NaCl 抽出液から抗 ORC1 抗体を用いて免疫沈降を行った。最初に、免疫沈降画分に含まれるタンパク質について質量分析による同定を試みた。免疫沈降画分に含まれるタンパク質を SDS-PAGE により分離し、CBB 染色で検出した (図 3-2 A)。前血清 IgG (cont.) を用いた免疫沈降の沈降画分と比較して、抗 ORC1 抗体を用いた免疫沈降に特異的に強いバンドが数個みられた (図 3-2 A、1~4)。これらのバンドを含むゲル片を切

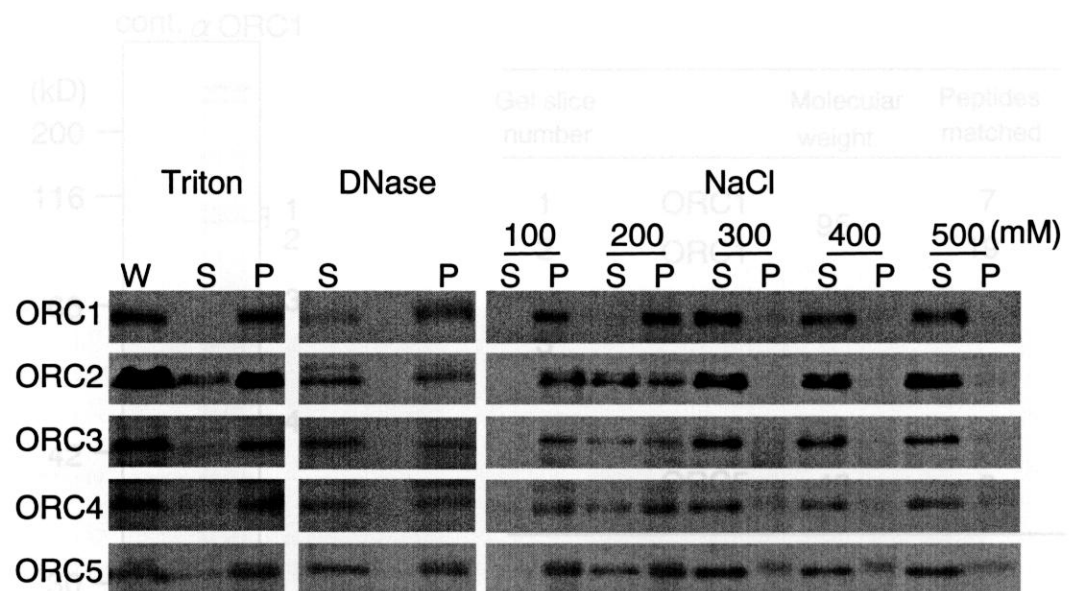
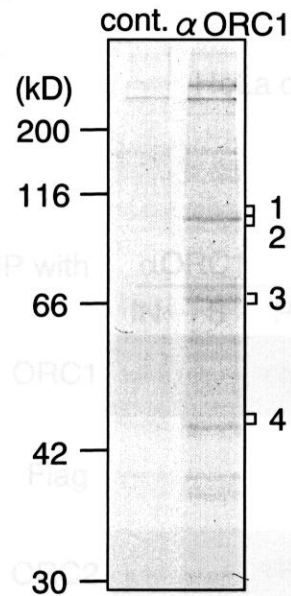


図3-1. ORCサブユニットのTriton、DNase I、およびNaClによる抽出

非同調 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)。Triton不溶画分について、DNase Iあるいは100、200、300、400、500 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 (DNase I、NaCl)。全細胞抽出液 (W)、それぞれの分画の可溶画分 (S)、不溶画分 (P) についてORC1、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。各レーンについて 1×10^5 細胞 相当分を用いた。

A



B

Gel slice number		Molecular weight	Peptides matched
1	ORC1	95	7
2	ORC1		19
3	ORC2	63	10
	ORC3	78	8
4	ORC4	48	1
	ORC5	48	3

図3-2. 非同調細胞からの抗ORC1抗体を用いた免疫沈降（質量分析装置を用いた解析）

A：非同調HeLa細胞の300 mM NaCl 抽出液から抗ORC1抗体ビーズ（ α ORC1）またはコントロールビーズ（cont.）を用いて免疫沈降を行い、沈殿画分をSDS-PAGE（12.5 % ゲル）しタンパク質をCBB染色で検出した。図中に示したゲル片（1～4）を切り出し、質量分析装置を用いた解析の試料を作製した。

B：Aに示したゲル片から調整した試料を質量分析装置によりタンパク質の同定を行った。

Gel slice number：Aのゲル片の番号に対応する。Molecular weight：ORCサブユニットの分子量を示す。peptides matched：同定されたペプチド断片数を示す。

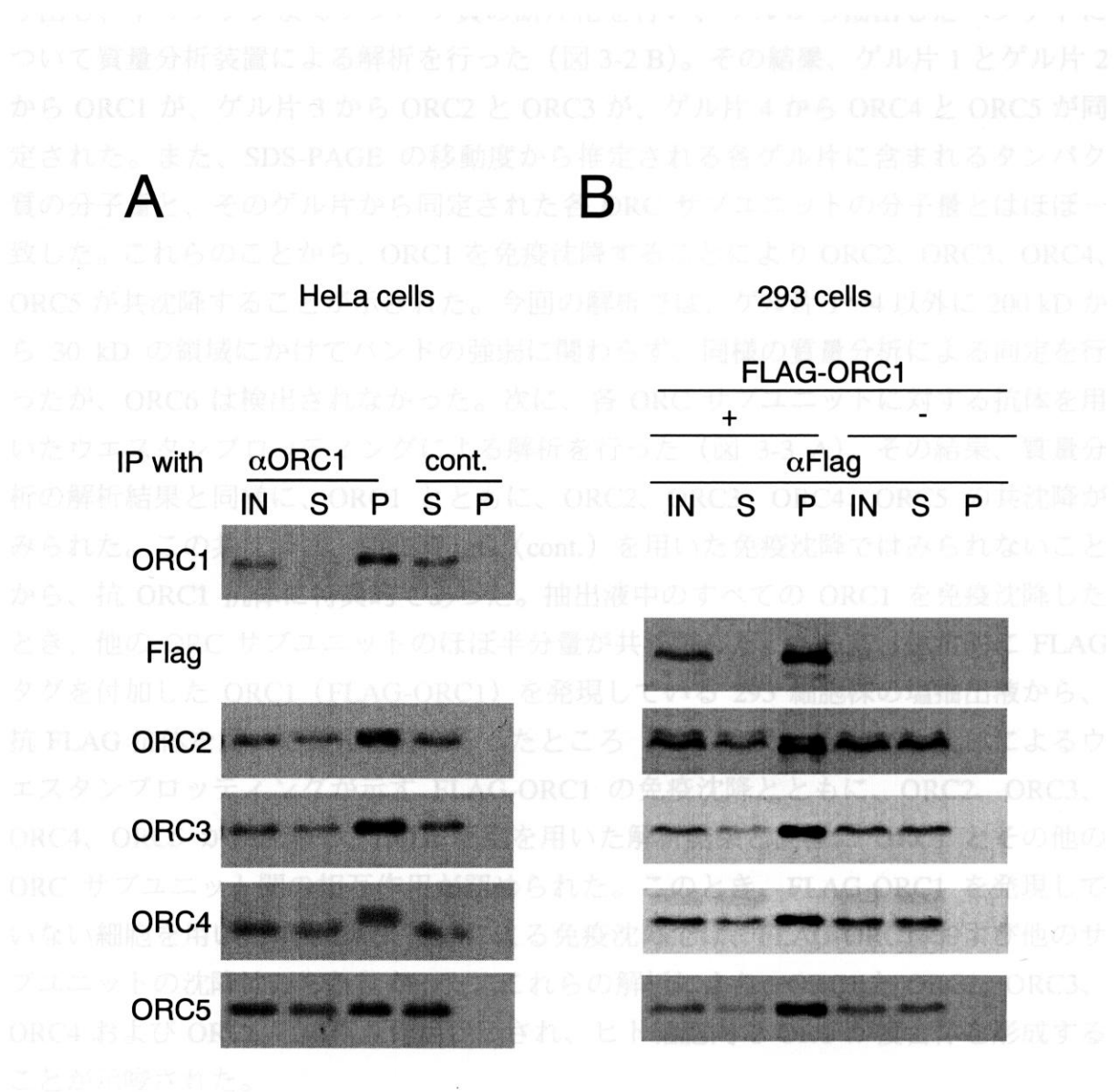


図3-3. 非同調細胞からの抗ORC1抗体と抗FLAG抗体を用いた免疫沈降（ウエスタンブロッティングによる解析）

A：非同調HeLa細胞の300 mM NaCl 抽出液から抗ORC1抗体ビーズ（ α ORC1）またはコントロールビーズ（cont.）を用いて免疫沈降を行った。

B：FLAG-ORC1発現細胞（+）または293細胞（-）の300 mM NaCl 抽出液から抗FLAG抗体ビーズ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ORC1、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。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。

り出し、トリプシンによるタンパク質の断片化を行い、ゲルから抽出したペプチドについて質量分析装置による解析を行った（図 3-2 B）。その結果、ゲル片 1 とゲル片 2 から ORC1 が、ゲル片 3 から ORC2 と ORC3 が、ゲル片 4 から ORC4 と ORC5 が同定された。また、SDS-PAGE の移動度から推定される各ゲル片に含まれるタンパク質の分子量と、そのゲル片から同定された各 ORC サブユニットの分子量とはほぼ一致した。これらのことから、ORC1 を免疫沈降することにより ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 が共沈降することが示された。今回の解析では、ゲル片 1~4 以外に 200 kD から 30 kD の領域にかけてバンドの強弱に関わらず、同様の質量分析による同定を行ったが、ORC6 は検出されなかった。次に、各 ORC サブユニットに対する抗体を用いたウエスタンブロッティングによる解析を行った（図 3-3 A）。その結果、質量分析の解析結果と同様に、ORC1 とともに、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 の共沈降がみられた。この共沈降は、前血清 IgG (cont.) を用いた免疫沈降ではみられないことから、抗 ORC1 抗体に特異的であった。抽出液中のすべての ORC1 を免疫沈降したとき、他の ORC サブユニットのほぼ半分量が共沈降した。さらに、恒常的に FLAG タグを付加した ORC1 (FLAG-ORC1) を発現している 293 細胞株の塩抽出液から、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ（図 3-3 B）、抗 FLAG 抗体によるウエスタンブロッティングが示す FLAG-ORC1 の免疫沈降とともに、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 が共沈降し、HeLa 細胞を用いた解析結果と同様に ORC1 とその他の ORC サブユニット間の相互作用が認められた。このとき、FLAG-ORC1 を発現していない細胞を用いた抗 FLAG 抗体による免疫沈降では、FLAG-ORC1 および他のサブユニットの沈降はみられなかった。これらの解析により、ORC1 と ORC2、ORC3、ORC4 および ORC5 との相互作用が示され、ヒト細胞内で ORC が複合体を形成することが示唆された。

3-3-3 細胞周期を通した ORC1 量の変化の解析

出芽酵母では、各 ORC サブユニットは細胞周期を通じて存在し、安定な複合体を形成していることが知られている。そこで、ヒト細胞内の各 ORC サブユニットの存在量について細胞周期を通して解析を行った。まず、HeLa 細胞を微小管の重合阻害剤 TN16 により M 期に同調した（図 3-4）。同調からリリースした後、図に示した時間に細胞を回収し、これらの細胞の全細胞抽出液について、各 ORC サブユニット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。その結果、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 は細胞周期を通じてほぼ一定量が存在した。一方、ORC1 はリリース後 6h から増加しはじめ、9h をピークにその後減少した。FACS と BrdU 取り込み細胞の割合から、染色体 DNA の合成は 6h から 9h の間に開始していると考えられる。したがって、細胞内の ORC1 量は G1 期に増加しはじめ、G1/S 期に最大に達すると

考えられる。また、BrdU 取り込み細胞の割合が最も多く FACS 解析で S 期のプロファイルを示す 12h から 15h にかけて ORC1 量の減少がみられた。また、細胞周期における ORC1 の量の変動と G1 期サイクリン (E) および S 期サイクリン (A) の量の変動の時期とを比較したところ、ORC1 はサイクリン E より早い時期に増加し、サイクリン A の増加する時期に減少した。

次に、HeLa 細胞で観察された ORC1 の量の変動がヒト細胞において一般的に見られる現象かを検討するために、HepG2 細胞を M 期に同調してリリースし同様の解析を行った (図 3-5)。FACS、BrdU 取り込み細胞の割合、ウエスタンブロッティングの解析の結果、HeLa 細胞と同様に、細胞周期を通じて ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 の量に変動はなく、ORC1 の量は G1 期 (3h) に入ると増加しはじめ、G1 後期から G1/S 期 (6h-9h) にピークに達し、S 期に入ると減少した。また、ORC1 の量の増加する時期はサイクリン E の増加に先行し、減少する時期はサイクリン A の増加する時期と一致した。次に、ORC1 の量の変動が TN16 による M 期への同調法に依存する可能性を考慮して、HeLa 細胞をチミジンにより S 期に同調しリリースした同調細胞集団を用いて解析を行った (図 3-6)。FACS、BrdU 取り込み細胞の割合、ウエスタンブロッティングの解析の結果、M 期からリリースした同調細胞集団と同様に、細胞周期を通じて ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 の量に変動はなく、ORC1 の量はリリース後 12h に増加しはじめ、BrdU 取り込み細胞の割合が最も高くなる 18h に先行して 15h をピークに減少した。ORC1 の量の増加する時期は、サイクリン E の増加に先行し、その減少する時期はサイクリン A の増加する時期と同じであった。つぎに、HepG2 細胞について同様の解析を行った (図 3-7)。FACS、BrdU 取り込み細胞の割合、ウエスタンブロッティングの解析の結果、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 の量は、HeLa 細胞と同様に細胞周期を通じて変動せず、一方、ORC1 はリリース後 6h から増加しはじめ、12h にピークに至り減少した。また、ORC1 量のピークは BrdU 取り込み細胞の割合およびサイクリン E の量がピークに達する 15h に先行していた。これらチミジンにより同調した HeLa 細胞と HepG2 細胞の解析は、ORC1 が G1 期で増加し S 期で減少するという M 期に同調した細胞の解析の結果と一致した。チミジンを用いた S 期同調では HeLa 細胞の場合も HepG2 細胞の場合も 0h で ORC1 量は低いレベルにあった。これは、細胞がチミジンによる同調により長時間にわたり S 期にとどまるため、ORC1 が減少したものと考えられる。

これまで増殖を繰り返す細胞について解析を行ってきたが、休止細胞およびそこから増殖へ向かう時の ORC1 量を観察するため、テロメアーゼで不死化したヒト網膜色素上皮細胞の TERT-RPE1 細胞を血清飢餓により G0 期に同調し、血清の添加によりリリースした細胞集団について解析を行った (図 3-8)。血清飢餓の状態の細胞では ORC1 の発現は見られなかった。リリース後、ORC1 量は徐々に増加し、BrdU

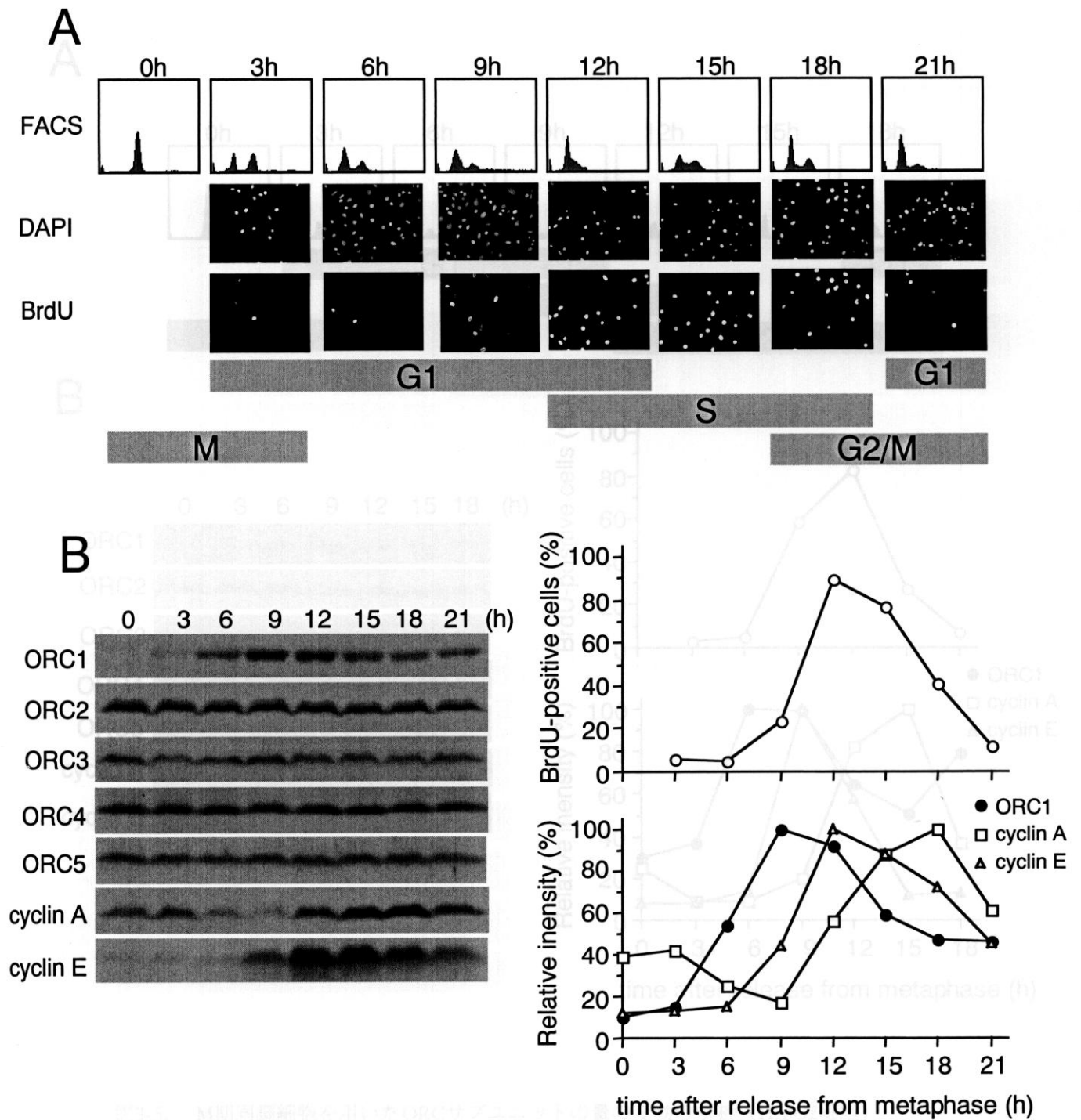


図3-4. M期同調細胞を用いたORCサブユニットの量の変動の解析 (HeLa細胞)

A: 微小管の重合阻害剤によりHeLa細胞をM期に同調し、リリースした細胞集団についてのFACSパターン(上)とDAPIによる染色(中)およびBrdUの免疫染色(下)。BrdUを取り込んだ細胞の割合をBにグラフで示した。

B: 同調細胞各回収時間の細胞から調整した全細胞抽出液についてORC1、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5、cyclin A、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い(左パネル)、ORC1、cyclin A、cyclin Eのシグナル強度を定量し、ピークを100として右下のグラフに示した。AのBrdU取り込み細胞の割合を右上のグラフに示した。

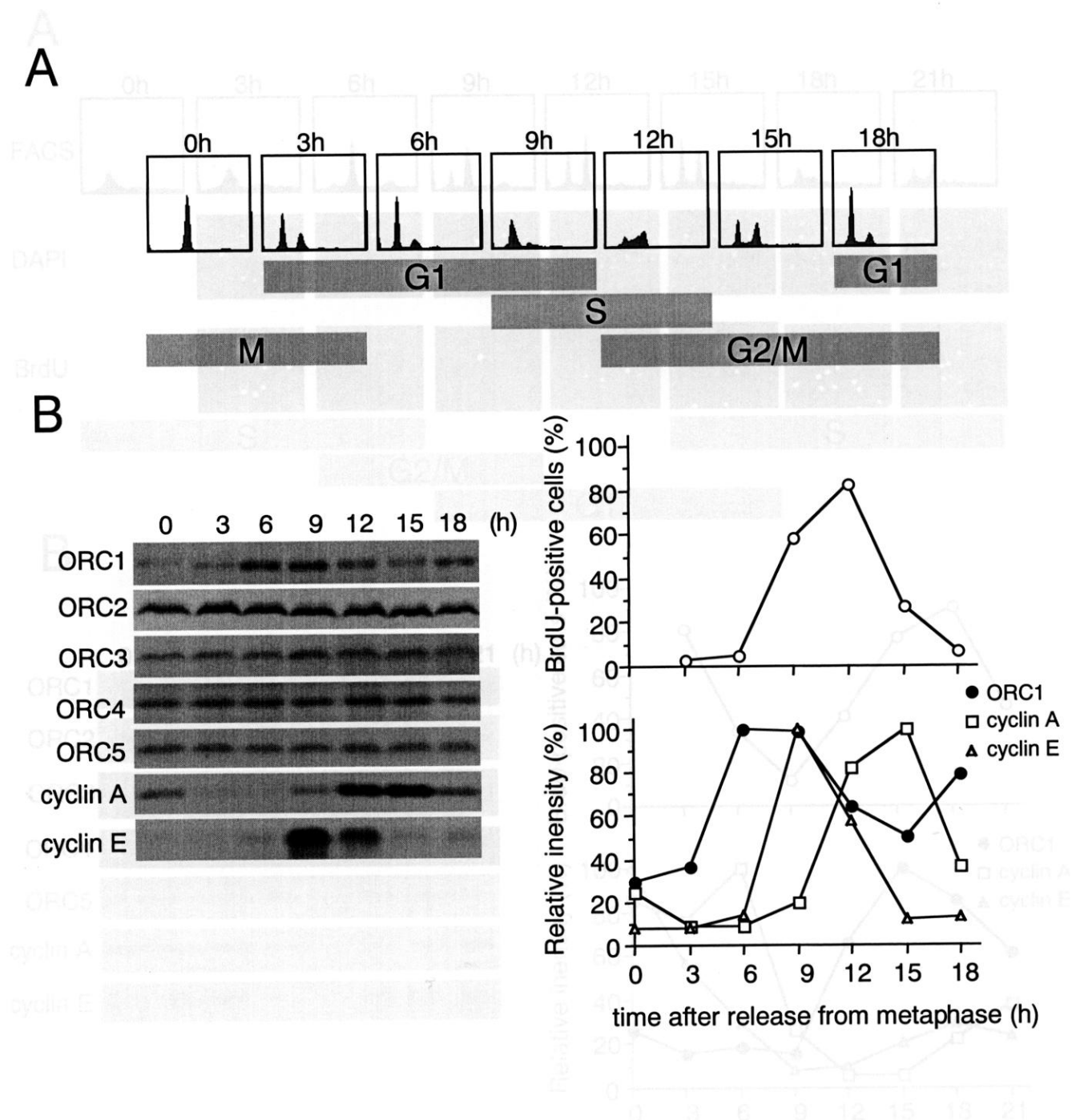


図3-5. M期同調細胞を用いたORCサブユニットの量の変動の解析 (HepG2細胞)

A: 微小管の重合阻害剤によりHepG2細胞をM期に同調し、リリースした細胞集団についてのFACSパターン。

B: 同調細胞各回収時間の細胞から調製した全細胞抽出液についてORC1、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5、cyclin A、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い (左パネル)、BrdU取り込み細胞の割合 (右上グラフ) およびORC1、cyclin A、cyclin Eのシグナル強度の定量結果 (右下グラフ) を図3-4と同様に示した。

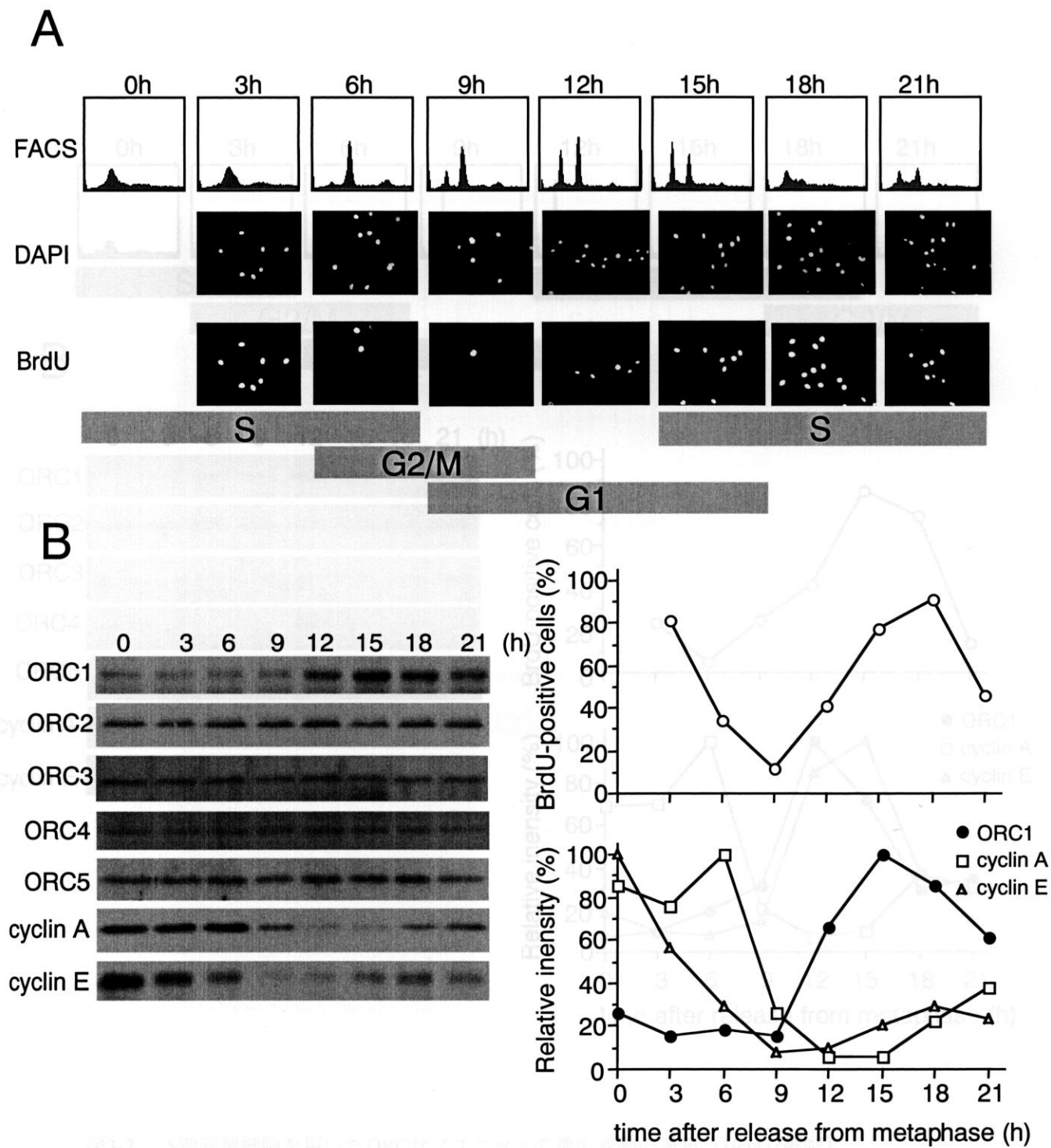


図3-6. S期同調細胞を用いたORCサブユニットの量の変動の解析 (HeLa細胞)

A: チミジンによりHeLa細胞をS期に同調し、リリースした細胞集団についてのFACSパターン(上)とDAPIによる染色(中)および細胞のDNAに取り込まれたBrdUの免疫染色(下)。BrdUを取り込んだ細胞の割合をBにグラフで示した。

B: 同調細胞各回収時間の細胞から調製した全細胞抽出液についてORC1、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5、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い(左パネル)、BrdU取り込み細胞の割合(右上グラフ)およびORC1、cyclin A、cyclin Eのシグナル強度の定量結果(右下グラフ)を図3-4と同様に示した。

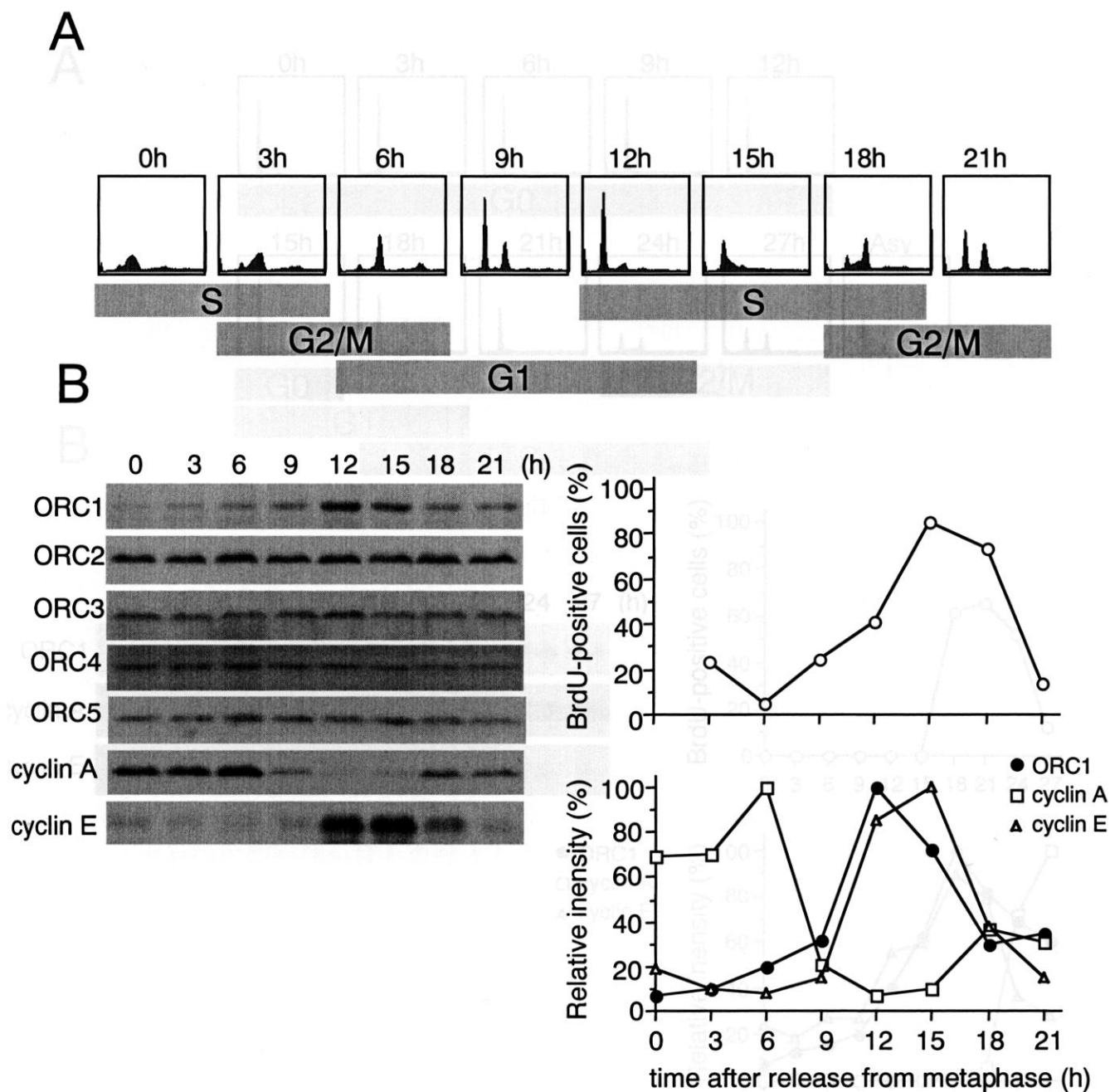


図3-7. S期同調細胞を用いたORCサブユニットの量の変動の解析 (HepG2細胞)

A: チミジンによりHepG2細胞をS期に同調し、リリースした細胞集団についてのFACSパターン。

B: 同調細胞各回収時間の細胞から調整した全細胞抽出液についてORC1、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5、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い (左パネル)、BrdU取り込み細胞の割合 (右上グラフ) およびORC1、cyclin A、cyclin Eのシグナル強度の定量結果 (右下グラフ) を図3-4と同様に示した。

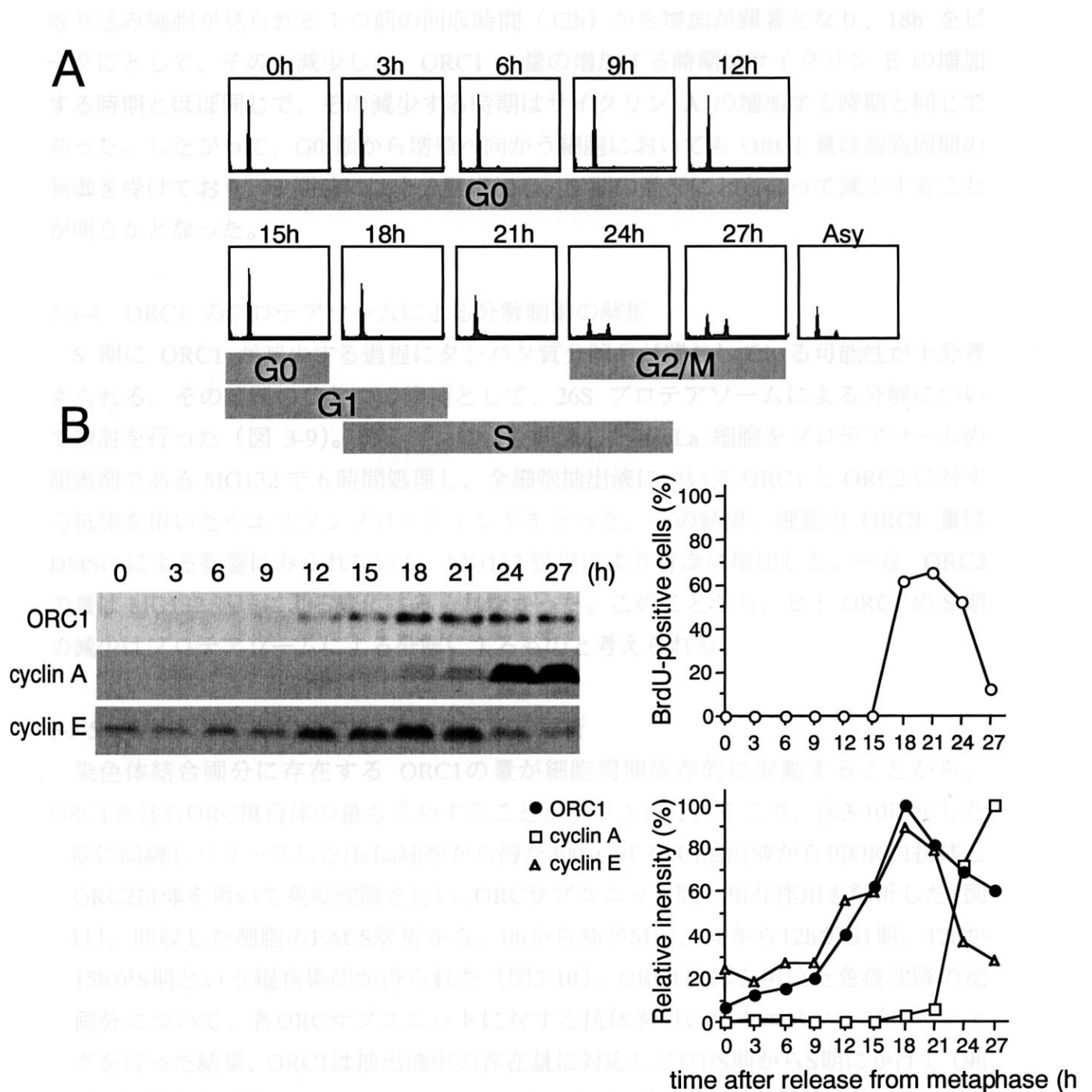


図3-8. G0期からのORCサブユニットの量の変動の解析 (TERT-RPE1細胞)

A: 血清飢餓によりTERT-RPE1細胞をG0期に同調し、リリースした細胞集団についてのFACSパターン。

B: 同調細胞各回収時間の細胞から調整した全細胞抽出液についてORC1、cyclin A、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い (左パネル)、BrdU取り込み細胞の割合 (右上グラフ) およびORC1、cyclin A、cyclin Eのシグナル強度の定量結果 (右下グラフ) を図3-4と同様に示した。

取り込み細胞が見られる1つ前の回収時間(12h)から増加が顕著となり、18hをピークとして、その後減少した。ORC1の量の増加する時期はサイクリンEの増加する時期とほぼ同じで、その減少する時期はサイクリンAの増加する時期と同じであった。したがって、G0期から増殖へ向かう細胞においてもORC1量は細胞周期の制御を受けており、S期前には十分量増加し、S期の進行にともなって減少することが明らかとなった。

3-3-4 ORC1のプロテアソームによる分解制御の解析

S期にORC1が減少する過程にタンパク質分解系が関与している可能性が十分考えられる。その経路のひとつの候補として、26Sプロテアソームによる分解について検討を行った(図3-9)。チミジンにより同調したHeLa細胞をプロテアソームの阻害剤であるMG132で6時間処理し、全細胞抽出液についてORC1と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。その結果、細胞のORC1量はDMSOによる影響はみられないが、MG132処理により有為に増加した。一方、ORC2の量はMG132処理による変化はみられなかった。このことから、ヒトORC1のS期の減少はプロテアソームによる分解によるものと考えられる。

3-3-5 細胞周期依存的なORC複合体形成の解析

染色体結合画分に存在するORC1の量が細胞周期依存的に変動することから、ORC1を含むORC複合体の量も変動することが予想される。そこで、図3-10に示したM期に同調しリリースしたHeLa細胞から得た300 mM NaCl抽出液から抗ORC1抗体と抗ORC2抗体を用いて免疫沈降を行い、ORCサブユニット間の相互作用を解析した(図3-11)。回収した細胞のFACS解析から、0hから3hがM期、3hから12hがG1期、12hから15hがS期という細胞集団が得られた(図3-10)。ORC1抗体を用いた免疫沈降の沈降画分について、各ORCサブユニット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結果、ORC1は抽出液中の存在量に対応してG1/S期からS期にかけて(9h、12h)多く免疫沈降され、ORC2、ORC3およびORC4はORC1の沈降量に対応してG1期からG1/S期にかけて(9h、12h)多く共沈降した。一方、抗ORC2抗体を用いた免疫沈降の結果、ORC2は細胞周期を通じてほぼ一定量が免疫沈降され、ORC3も細胞周期を通じてほぼ一定量が共沈降した。このときORC1は抽出液中の存在量に対応して、G1期からG1/S期にかけて(9h、12h)共沈降する量が増加した。ORC4とORC5は、細胞周期を通じて細胞内に一定量存在するのに対し(図3-10)、ORC1の共沈降の量と対応するようにG1期からG1/S期にかけて(9h、12h)多く共沈降した。これらのことから、細胞周期を通してORC2-3複合体は安定に存在し、ORC4やORC5と相互作用していると考えられる。また、G1期からS期にかけてORC1の量が増加すると

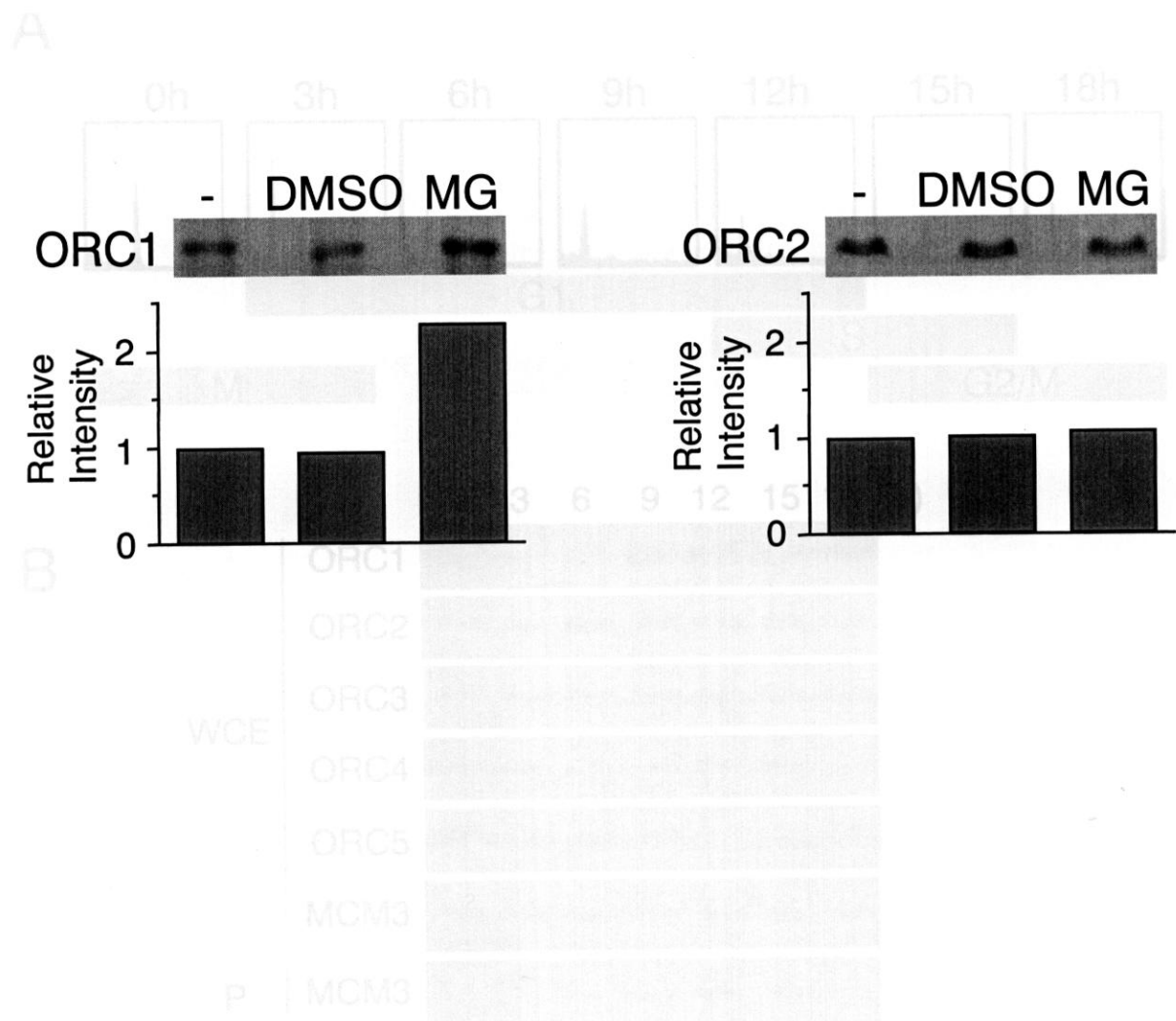


図3-9. 26Sプロテアソーム依存的なORC1の分解
 チミジンによりS期に同調したHeLa細胞を26Sプロテアソームの阻害剤MG132で6時間処理した。未処理 (-) の細胞とDMSO (DMSO)、MG132 (MG) で処理した細胞の全細胞抽出液についてORC1、ORC2に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行い（上パネル、ORC1、ORC2）、シグナル強度を定量し、未処理のORC1あるいはORC2量を1として下のグラフに示した。

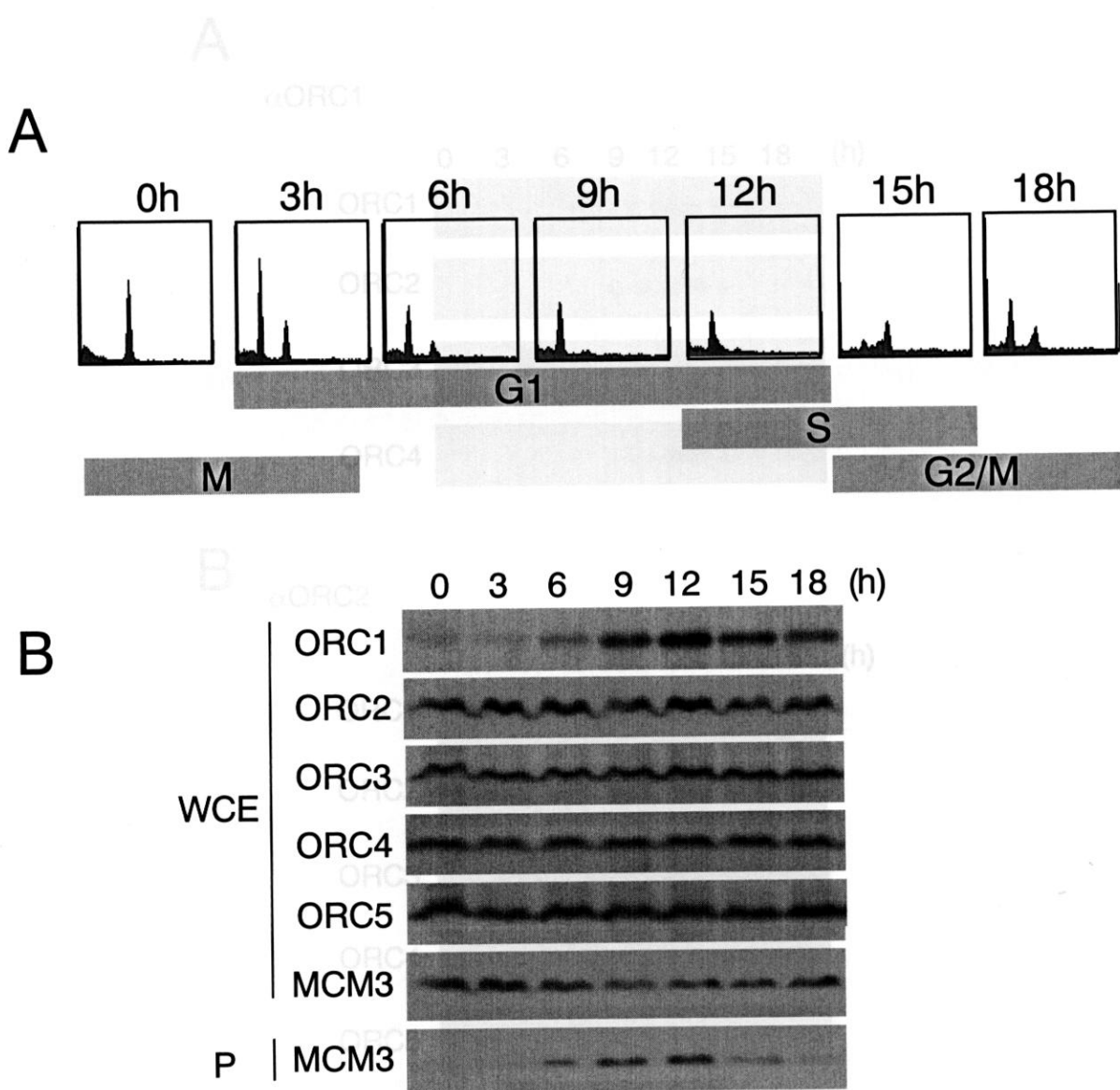


図3-10. ORCサブユニットとMCM3の細胞周期依存的な量の変化

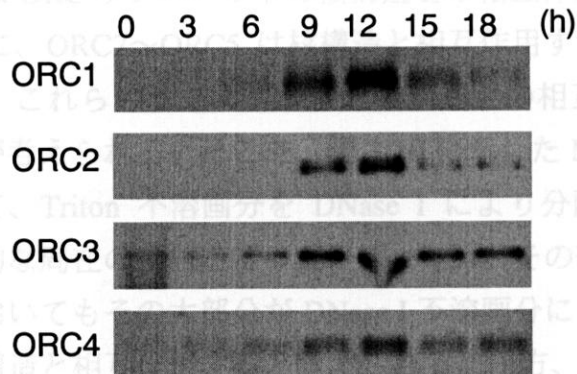
A: 微小管の重合阻害剤によりHeLa細胞をM期に同調し、リリースした細胞集団についてのFACSパターン

B: 同調細胞各回収時間の細胞についてTritonによる分画を行った。全細胞抽出液(WCE)についてはORC1、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5、MCM3に対する抗体を用いて、不溶画分(P)についてMCM3に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

CIを含むORC複合体が形成されることが考えられる。そして、ORC4およびORC5とC2-3複合体との相互作用は、ORC1が複合体に入ることにより安定性が増すと考
られる。

A

α ORC1



B

α ORC2

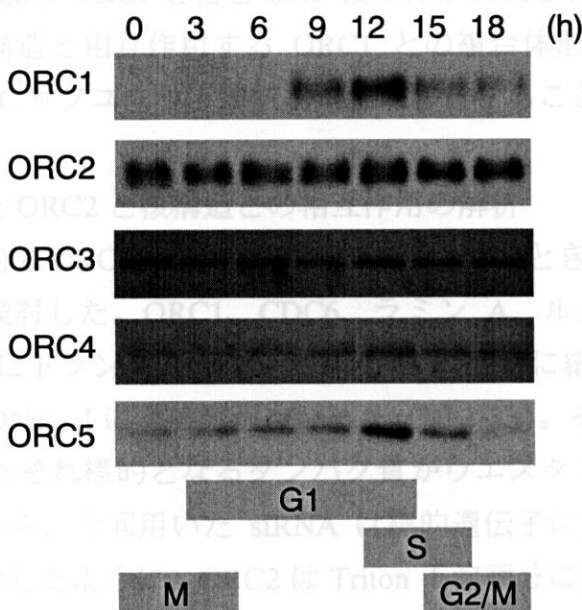


図3-11. 同調細胞の塩抽出液からの抗ORC1抗体および抗ORC2抗体による免疫沈降

図3-10に示したM期に同調しリリースしたHeLa細胞の各回収時間の300mM NaCl抽出液から抗ORC1抗体ビーズ (A) と抗ORC2抗体 (B) を用いて免疫沈降を行った。各時間の免疫沈降の沈殿画分についてORC1、ORC2、ORC3、ORC4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。BについてはORC5の検出も併せて行った。下に示した細胞周期は図3-10に示したFACS解析から決定した。

ORC1を含むORC複合体が形成されると考えられる。そして、ORC4およびORC5とORC2-3複合体との相互作用は、ORC1が複合体に入ることにより安定性が増すと考えられる。

3-3-6 細胞周期依存的な ORC サブユニットの核構造との相互作用

図 3-1 で示したように、ORC2～ORC5 は核構造と相互作用するものとし、ないものとが存在することから、これらのサブユニットと核構造との相互作用が細胞周期で制御されている可能性が考えられる。そこで、図 3-10 に示した M 期からリリースした同調細胞集団について、Triton 不溶画分を DNase I により分画し、ORC1、ORC2 について細胞周期依存的な局在の検討を行った (図 3-12)。その結果、ORC1 は検出できるどの観察時間においてもその大部分が DNase I 不溶画分に存在することから、細胞周期に関係なく核構造と相互作用すると考えられる。一方、ORC2 は M 期から G1 期 (0h から 6h) では大部分が DNase I 可溶画分に存在するが、その後 12h をピークに DNase I 不溶画分に存在するものが出現した。この ORC2 と核構造が相互作用する時期は、ORC1 が増加し ORC1 を含む ORC 複合体が形成される時期と一致した。これらのことから、核構造と相互作用する ORC1 との複合体形成によって、ORC2 をはじめとする他の ORC サブユニットが核構造上に移行することが予想された。

3-3-7 ORC1 に依存した ORC2 と核構造との相互作用の解析

siRNA を用いて細胞内の ORC1 の量を人工的に減少させたときの他の ORC サブユニットの局在について検討した。ORC1、CDC6、ラミン A、ルシフェラーゼに対する siRNA を HeLa 細胞にトランスフェクション後 48 時間目に細胞を回収し、Triton による分画、さらには DNase I による分画を行った (図 3-13)。それぞれの siRNA で細胞を処理すると、それぞれ標的となるタンパク質がウエスタンブロッティングで検出されなくなることから、今回用いた siRNA は標的遺伝子に特異的に機能すると考えられる。図 3-1 に示したように、ORC2 は Triton 不溶画分に存在するが、この局在は ORC1 の量を siRNA により人工的に減少させても変わらなかった。したがって、ORC2 と染色体との相互作用は ORC1 に依存しないことが示された (図 3-13 A)。一方、DNase I 不溶画分に存在する ORC2 は細胞内の ORC1 を減少させることにより可溶化した (図 3-13 B)。したがって、ORC2 と核構造との相互作用は ORC1 との相互作用を介したものと考えられる。

ヒト細胞において、CDC6 は ORC1 と同様のヌクレアーゼに耐性な核構造と相互作用していることが報告されている (Fujita et al., 1999)。実際に、CDC6 の局在を解析したところ、細胞内のほとんどが Triton 不溶画分に存在し、さらに Triton 不溶画分のすべての CDC6 は DNase I 耐性となったことから、ORC1 と同様に核構造と相互

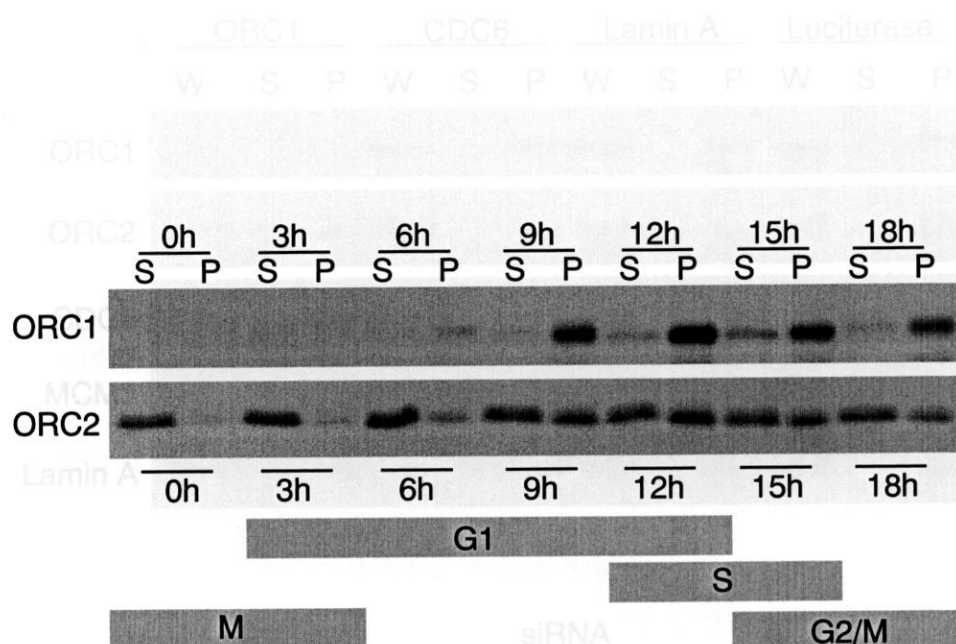


図3-12. 細胞周期依存的なORCサブユニットと核構造との相互作用

図3-10に示したM期に同調しリリースしたHeLa細胞の各回収時間のTriton不溶画分についてDNase Iによる分画を行った。可溶画分 (S) と不溶画分 (P) についてORC1、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。下に示した細胞周期は図3-10に示したFACS解析から決定した。

図3-13A ORC1およびCDC6に対するsiRNA処理による「リタゲダウン」の影響

A: ORC1、CDC6、Lamin A、Luciferaseに対するsiRNAをHeLa細胞にトランスフェクトし、48時間後に細胞を回収してTritonによる抽出により分画し、全細胞抽出液 (W)、可溶画分 (S)、不溶画分 (P) についてORC1、ORC2、CDC6、MCM3、Lamin A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。

B: AのTriton不溶画分を更にDNase Iで処理した後、可溶画分 (S) と不溶画分 (P) に分画し、ORC1、ORC2、CDC6、Lamin A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。

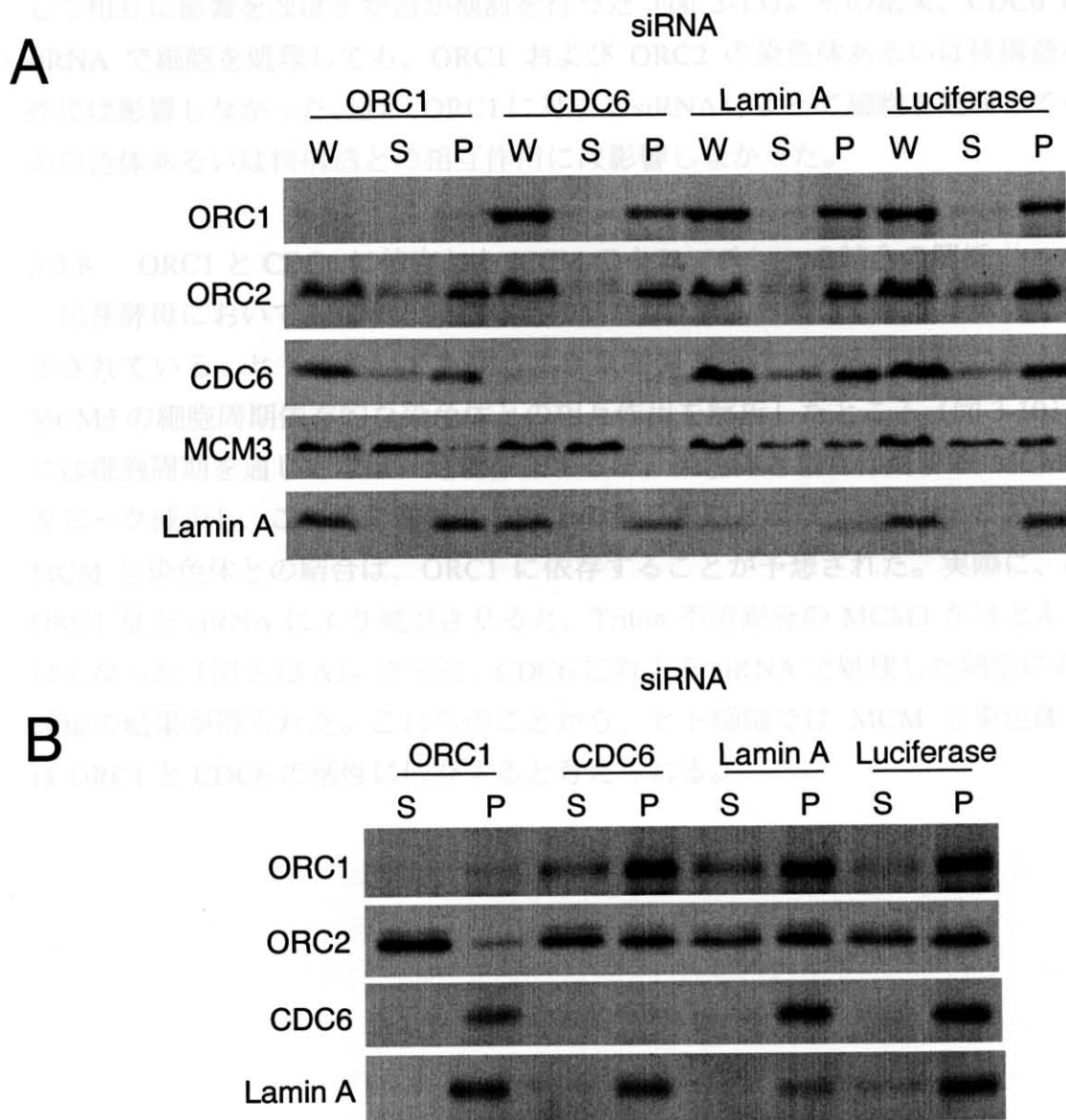


図3-13. ORC1あるいはCDC6に対するsiRNA処理によるノックダウンの影響

- A : ORC1、CDC6、Lamin A、Luciferaseに対するsiRNAをHeLa細胞にトランスフェクションし、48時間後に細胞を回収してTritonによる抽出により分画し、全細胞抽出液（W）、可溶画分（S）、不溶画分（P）についてORC1、ORC2、CDC6、MCM3、Lamin A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。
- B : Aの Triton不溶画分を更にDNase Iで処理した後、可溶画分（S）と不溶画分（P）に分画しORC1、ORC2、CDC6、Lamin A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。

作用していることが示された (図 3-13)。そこで、CDC6 および ORC の局在性に対して相互に影響を及ぼすか否か検討を行った (図 3-13)。その結果、CDC6 に対する siRNA で細胞を処理しても、ORC1 および ORC2 の染色体あるいは核構造への局在性には影響しなかった。逆に、ORC1 に対する siRNA によって細胞を処理しても、CDC6 の染色体あるいは核構造との相互作用には影響しなかった。

3-3-8 ORC1 と CDC6 に依存した MCM のクロマチンへの結合の解析

出芽酵母において MCM と染色体との結合は ORC および CDC6 に依存することが示されている。ヒトにおいても同じような制御を受けている可能性が考えられる。MCM3 の細胞周期依存的な染色体との相互作用を解析したところ (図 3-10)、細胞内には細胞周期を通じてほぼ一定量存在するが、染色体と相互作用する MCM3 は 12h をピーク減少し、この量の増減は ORC1 の量の変動とほぼ一致した。このことから、MCM と染色体との結合は、ORC1 に依存することが予想された。実際に、細胞内の ORC1 量を siRNA により減退させると、Triton 不溶画分の MCM3 がほとんどみられなくなった (図 3-13 A)。さらに、CDC6 に対する siRNA で処理した細胞においても、同様の結果が得られた。これらのことから、ヒト細胞では MCM と染色体との結合は ORC1 と CDC6 の活性に依存すると考えられる。

3-4 考察

近年、ORCをはじめとする複製開始因子のヒトホモログがクローニングされ、複製開始機構が真核生物全般に保存されていることが示唆されている。しかしながら、配列レベルの相同性は必ずしも機能的な相同性を示すものではなく、その意味ではヒト細胞における ORC の機能について未知の点が多い。また、ヒト ORC サブユニットはそれぞれ独立して発見され、解析されてきた経緯から、ORC の各サブユニットの細胞内での局在、発現量、複合体形成について系統的に解析されていないのが現状である。したがって、ヒト細胞内での ORC 複合体の機能を理解する第一段階として、全てのサブユニットについて同じ細胞を用いて、同一の条件でこれらの解析を行う必要があると考えられる。本研究において同じ細胞の同じ分画を用いて ORC1～ORC5 の細胞内局在を解析したところ、細胞内に存在する ORC1～5 のすべてのサブユニットが核に存在し染色体と相互作用することが予想された。このことは出芽酵母と同様に ORC が核内で機能することを示唆している。また、NaCl による ORC サブユニットの抽出性を検討したところ、ORC1 は他の ORC に比べて NaCl 耐性を示したことから、ORC1 は他の ORC サブユニットとは異なる核内配置をされていることが予想された。また、DNase I による分画を行ったところ、ORC2～ORC5 については染色体 DNA とともにその一部が可溶化するが、ORC1 の可溶化は全く見られなかった。この処理により、ヒストンや部分的に MCM はほとんど可溶化されることから (Fujita et al., 1997)、この不溶画分に存在する因子は単に染色体 DNA と相互作用しているのではなく、他の核内のタンパク質あるいは RNA からなる構造体 (核構造) と相互作用していることが予想される。したがって、全ての ORC1 および他の ORC サブユニットの一部は核内の何らかの構造と相互作用していることが示唆された。

ヒトの ORC の全てのサブユニットは染色体上に存在することから、他の生物種と同様に複合体として染色体と相互作用していることが十分考えられる。本研究において、HeLa 細胞抽出液から抗 ORC1 抗体を用いた免疫沈降を行ったところ、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 の共沈降が確認され、少なくとも ORC1、ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 が複合体として細胞内に存在し得ることが明らかとなった。しかしながら、ORC1 の免疫沈降産物からは、ORC6 は検出されなかった。これに関連して、FLAG タグを付加した ORC6 を発現させたヒト 293 細胞の抽出液から、抗 FLAG 抗体、抗 ORC1 抗体、抗 ORC2 抗体を用いた免疫沈降を行ったが、ORC6 と ORC1、ORC2 との相互作用はみられなかった (結果不掲載)。出芽酵母の ORC6 は ORC 複合体の機能に必要であるが (Li and Herskowitz, 1993)、ORC6 を欠いた ORC 複合体は安定に存在することが知られている (Lee and Bell, 1997)。また、ショウジョウバエの ORC

は、ORC6 を欠いても複合体として存在し得るが、複製開始点に特異的に結合することができないことが知られている (Chesnokov et al., 2001)。これらのことから、ORC6 は他の ORC サブユニットとの相互作用は弱い、ORC 複合体が機能する上で必要不可欠な因子であることが予想される。これらの知見を考慮すると、ヒトにおいても他のサブユニットとの相互作用が弱い可能性が考えられる。実際に、抗 ORC2 抗体を用いた免疫沈降で ORC6 は共沈降しないこと (Dhar and Dutta, 2000, Vashee et al., 2001)、バキュロウイルススタンパク質発現系の解析から、ORC6 と ORC1-5 複合体との相互作用は非常に弱いこと (Vashee et al., 2001) が報告されている。最近、ORC6 は動原体の機能に関与することが示された (Prasanth et al., 2002)。ヒトの ORC6 はショウジョウバエとの相同性によりクローン化されており (Dhar and Dutta, 2000) 出芽酵母の ORC6 との相同性はほとんど見いだされていない。したがって、ORC6 はセントロメアタンパク質であり、ORC 複合体を形成する真の ORC6 をコードする他の遺伝子産物が存在する可能性も考えられる。

出芽酵母では、複製開始点の数とほぼ同じ分子数の ORC が細胞内に存在することが知られている (Rowley et al., 1995)。HeLa 細胞抽出液から抗 ORC1 抗体を用いた免疫沈降産物の CBB 染色 (図 3-2) の定量結果と、ウェスタンブロッティングの結果 (図 3-3 A) より求めた免疫沈降の効率から計算した細胞内の ORC サブユニットの分子数は、ORC1 が 1.5×10^4 、ORC2 が 1.1×10^4 、ORC3 が 9.5×10^3 、ORC4 が 7.7×10^3 、ORC5 は 5×10^3 であった。他のグループからも HeLa 細胞の ORC2 および CHO 細胞の ORC1 と ORC2 についてほぼ同じ結果が報告されている (Kreitz et al., 2001, Natale et al., 2000)。哺乳類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、動物細胞では複製開始点とほぼ同数の ORC 複合体が存在すると予想される。抗 ORC1 抗体による免疫沈降では、抽出液中の ORC1 の全量が免疫沈降されるとき、ORC2~ORC5 は半分量の共沈降がみられた。このことは、細胞周期の限られた時期に ORC1 が存在し、ORC2-ORC5 複合体と相互作用することと矛盾しない。

本研究により、ORC1 の細胞内の量が G1 期に増加し、G1/S 期をピークとして S 期の進行とともに減少することが明らかとなった。MG132 により ORC1 の分解が阻害されることから、ORC1 の S 期における分解は 26S プロテアソームの分解経路によって行われていると考えられる。最近、Stillman のグループから、ORC1 はユビキチン化されており、そのユビキチン化に Skp2 が関与していることが示されている (Mendez et al., 2002)。したがって、ORC1 の量的な制御は Skp2 依存的に行われていることが予想される。また、恒常的に ORC1 を発現させた細胞においても、ORC1 の変動がみられること (異との共同、結果不掲載) から、少なくとも HeLa 細胞のような細胞分裂をくり返す細胞では、ORC1 の分解が ORC1 の量の主な制御機構にな

っていると考えられる。一方で、血清飢餓からリリースした細胞と同調 HeLa 細胞を用いた解析から、ORC1 の mRNA の発現誘導は E2F に依存することが示されている (Ohtani et al., 1996, Saha et al., 1998)。本研究により、血清飢餓により G0 期に同調した細胞には ORC1 はタンパクレベルでも存在していないことが明らかとなった。この時期に ORC1 の発現が転写レベルで抑えられていることは、細胞が G0 期の状態を維持するために重要なことなのかもしれない。ショウジョウバエの解析から、休止細胞で ORC1 を発現させるだけで増殖サイクルに進行することが知られている。したがって、E2F による ORC1 の発現誘導の重要性は、休止細胞が活動を再開するときに必要な ORC1 をすみやかに発現することにあるものと考えられる。

細胞周期を通して安定な複合体をとる出芽酵母とは対照的に、ヒト ORC 複合体形成は ORC1 の量に依存して制御され、G1/S 期をピークに一過的に形成することが示された (図 3-14)。細胞内には ORC1 を含む複合体と ORC2-5 からなる複合体が存在すると考えられる。ORC2、ORC3、ORC4、ORC5 については細胞周期を通してほぼ一定量が存在することから、この ORC2-5 複合体は細胞周期を通して存在するものと考えられる。しかしながら、ORC2-5 複合体は安定なものではなく、ORC2 と ORC3 は細胞周期を通して安定に相互作用しているが、ORC4 と ORC5 の相互作用は ORC1 の量の増加とともに強くなることが示唆された (図 3-11)。このことは、バキュロウイルスタンパク質発現系の解析から、ORC2 と ORC3 は安定な複合体をとり、さらに ORC1 が複合体となるためには ORC2~ORC5 の全てが必要なことが示されていること (Vashee et al., 2001) と矛盾しない結果である。これまで、ヒト ORC と複製開始点との相互作用は示されていなかったが、最近の、クロマチン免疫沈降実験から、ORC2 と ORC3 が Epstein-Barr ウイルスの oriP あるいはヒト MCM4 遺伝子領域内の複製開始点に細胞周期を通して結合することが見いだされた (Ladenburger et al, 2002)。一方、このとき ORC1 は G1 期にのみ結合することが合わせて示されている。これら ORC の挙動が本研究で得られた ORC と類似することから、細胞内において ORC2~ORC5 は複合体として核内で複製開始点に結合していると考えられる。おそらく ORC2-5 複合体のみで、出芽酵母の ORC が持つ複製開始点の認識と結合能を持つと考えられる。実際に、ORC1 を siRNA で細胞内から ORC1 を除いても、ORC2 は染色体結合画分に存在した。一方で、ORC1 が細胞内に存在しないと MCM は染色体に結合できないことが示されたことから、ORC1 を含む ORC 複合体が MCM を染色体上にローディングする機能を持ち、ORC2-5 複合体にはその活性はないものと考えられる。ORC1 を含む ORC 複合体は S 期に入ると急速に少なくなることから、MCM のリローディングによる再複製の防止機構として有効であると考えられる。また、出芽酵母の複製開始点の解析から、各細胞周期ごとに機能する複製開始点もあれば、ごくまれにしか活性化されない開始点もあることが知られている (Lin and Kowalski,

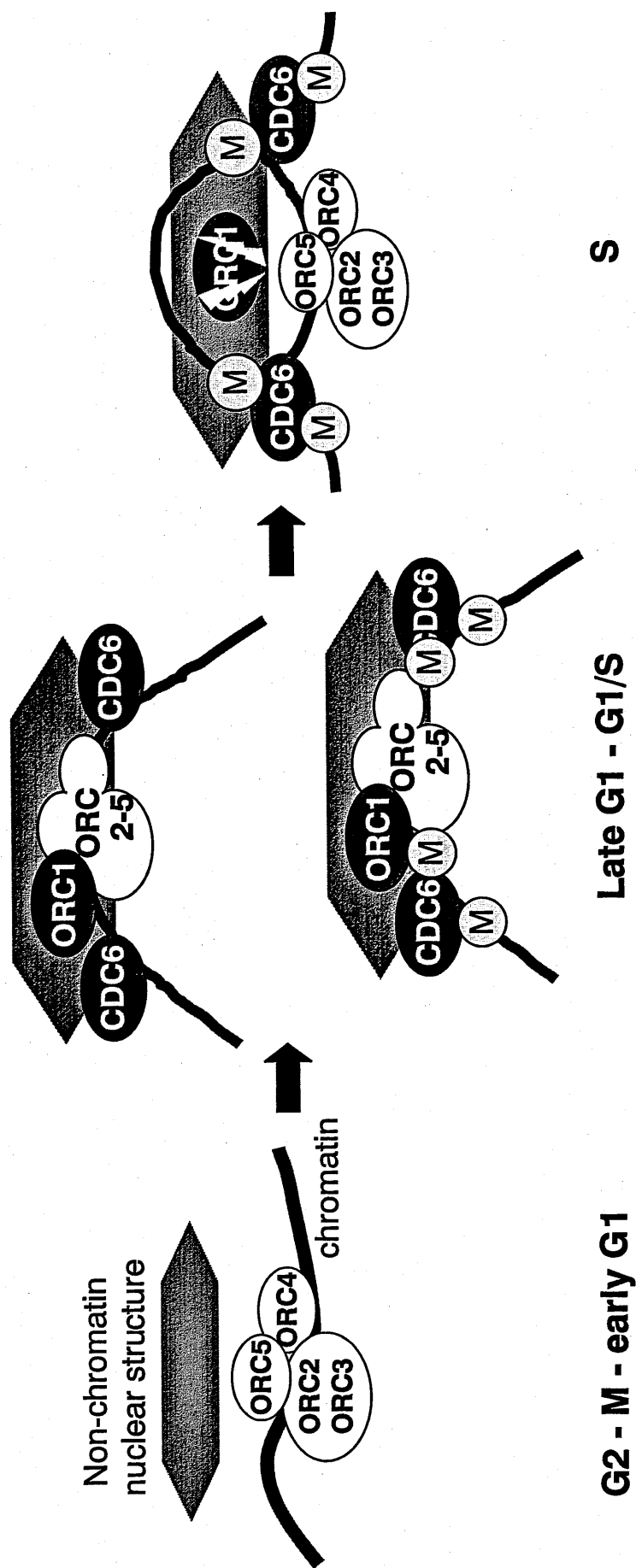


図3-14. ヒトORCの複合体形成とその機能
 ORC2-5複合体は細胞周期を通じて染色体DNA (chromatin) に結合している。G1/S期に ORC1の増加とともに ORC1を含む ORC2-5複合体が形成される (Late G1-G1/S)。この複合体形成により、ORC2-5を含むORC複合体が核構造上 (Non-chromatin nuclear structure) に移行する。つづいて、MCMがORCとCDC6依存的にクロマチン上へ移行する。S期 (S) の複製開始にともない ORC1が、26S プロテアソーム分解経路により分解され、ORC2-5複合体は核構造上からはなれる。

1997)。このメカニズムについては十分理解されていないが、ヒトにおいては ORC1 と ORC2-5 複合体との相互作用が、どの複製開始点を活性化するか決定する制御機構のひとつとして働いているのかもしれない。

複製開始点の核内配置は、それぞれの複製開始点の開始時期と密接に関係することが知られている (Dijkwel and Hamlin, 1995)。また、アフリカツメガエルの抽出液の試験管内複製系を用いた解析から、核ラミナの構成因子であるラミン B3 を卵抽出液から除くと、DNA 合成も起こらないことから、核構造が DNA 複製に必要であることが示されている (Laskey et al., 1996)。これらのことは、複製の開始とその制御において核内での配置や核構造との相互作用が重要な役割をしていることを示している。本研究により、ORC1 が核構造と相互作用すること、ORC1 と複合体を形成することにより ORC2~ORC5 が核構造と相互作用することが明らかとなった。もし ORC2~ORC5 が複製開始点と相互作用しているならば、複製開始点も ORC1 依存的に G1/S 期に核構造と相互作用するものと考えられる。実際に、最近、チャイニーズハムスター CHO 細胞の DHFR 遺伝子領域の複製開始点 $\text{ori-}\beta$ (Pelizon et al., 1996) と HeLa 細胞の β グロビン遺伝子上流の複製開始点 (Aladjem et al., 1995) が G1 後期から S 期初期に核構造と相互作用することが報告されている (Djeliova et al., 2001)。さらに核構造上には、多数の転写因子からなる転写ファクトリーが存在し、間期には核全体に散らばっているが G1 後期に集合して S 期に入ると複製ファクトリーと共局在することが知られている (Hassan et al., 1994)。さらに、染色体レベルで遺伝子発現が抑えられているヘテロクロマチン領域は S 期中期、後期に複製することが知られている。これらのことから、複製開始点の核内配置と転写には密接な共役関係が存在すると予想される。ORC1 と他の ORC サブユニットとの複合体の形成による、複製開始領域の核構造への移行は、複製開始制御のみならず高次機能発現制御のメカニズムを内包していると考えられる。

本研究により、ヒト細胞において CDC6 は出芽酵母やアフリカツメガエルと同様に、ORC とともに MCM の染色体へのローディングに必要であることを示すことができた。一方で、CDC6 は ORC1 および ORC2 の染色体への結合、核構造への結合には必要でないことから、ORC サブユニットの局在や ORC 複合体形成には関与していないと考えられる。また、CDC6 の局在は ORC1 に依存しないことから、アフリカツメガエルの報告とは異なり、ORC 複合体に相互作用して複製開始点あるいは核構造と相互作用しているのではないと考えられる。これらのことを考え合わせると、ORC 複合体と CDC6 はそれぞれ独立して複製開始点あるいはその近傍に相互作用して、協同して MCM のローディングに関与しているものと考えられる。出芽酵母や分裂酵母の CDC6 は G1 期に一過的に細胞内に存在することから、複製開始のリミッティングファクターであろうと考えられている (Drury et al., 1997, Elsasser et al.,

1999, Jallepalli et al., 1998)。実際に、分裂酵母では CDC6 を細胞内で過剰に発現させると同一細胞周期に過剰な複製が引き起こされることから、CDC6 の量的な調節は細胞周期においてただ一度の複製を保障する重要なメカニズムであると信じられている (Nishitani and Nurse, 1995)。しかしながら、動物細胞では CDC6 の S 期で分解されることなく一定量存在することが知られている (Saha et al., 1998, Jiang et al., 1999, Fujita et al., 1999)。本研究で明らかとなった、ヒト細胞における ORC1 の細胞周期依存的な量的な制御は酵母の CDC6 の量的な制御に替わるものである。

本研究により、ヒト細胞では ORC1 の量的な制御による ORC 複合体の形成が複製開始誘導ステップの 1 つとして働くことを示すことができた。同様に、シヨウジョウバエの ORC1 量は、細胞周期で変動することが報告されている (Asano and Wharton, 1999)。酵母ではこのような制御は存在しないことから、ORC1 の量的な制御は単なる複製開始の制御に留まらず、動物細胞に特有な増殖制御と遺伝子の発現制御を繰り返して複雑な形態形成を厳密に行うために、大事な役割を果たしていると考えられる。

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東京医科歯科大学の木村宏博士、国立遺伝学研究所の柴原慶一博士、ハーバード大学の Anindya Dutta 博士、そして有益なる助言をいただいた京都大学の五島剛太博士に心から感謝いたします。

そして、本研究のため直接ご指導いただき、多大なご助力をいただきました吉川寛名誉教授、釣本敏樹助教授、小布施力史助手に心から感謝の意を表わします。

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に厚くお礼申し上げます。

参考文献

- Acharya, S., Wilson, T., Gradia, S., Kane, M. F., Guerrette, S., Marsischky, G. T., Kolodner, R., and Fishel, R. (1996) hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 13629-13634
- Aladjem, M. I., Groudine, M., Brody, L. L., Dieken, E. S., Fournier, R. E., Wahl, G. M., and Epner EM. (1995) Participation of the human beta-globin locus control region in initiation of DNA replication. *Science* 270, 815-819
- Aparicio, O. M., Weinstein, D. M., and Bell, S. P. (1997) Components and dynamics of DNA replication complexes in *S. cerevisiae*: redistribution of MCM proteins and Cdc45p during S phase. *Cell* 91, 59-69
- Asano, M., and Wharton, R. P. (1999) E2F mediates developmental and cell cycle regulation of ORC1 in *Drosophila*. *EMBO J.* 18, 2435-2448
- Austin, R. J., Orr-Weaver, T. L., Bell, S. P. (1999) *Drosophila* ORC specifically binds to ACE3, an origin of DNA replication control element. *Genes Dev.* 13, 2639-2649
- Bell, S. P., and Stillman, B. (1992) ATP-dependent recognition of eukaryotic origins of DNA replication by a multiprotein complex. *Nature* 357, 128-134
- Bell, S. P., Mitchell, J., Leber, J., Kobayashi, R., and Stillman, B. (1995) The multidomain structure of Orc1p reveals similarity to regulators of DNA replication and transcriptional silencing. *Cell* 83, 563-568
- Brewer, B. J., and Fangman, W. L. (1987) The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell.* 51, 463-471
- Bravo, R., and Celis, J. E. (1980) A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol.* 84, 795-802
- Cai, J., Gibbs, E., Uhimann, F., Phillips, B., Yao, N., O'Donnell, M., and Hurwitz, J. (1997) A

complex consisting of human replication factor C p40, p37, and p36 subunits is a DNA-dependent ATPase and intermediate in the assembly of the holoenzyme. *J. Biol. Chem.* 272, 18974-18981

Carpenter, P. B., Mueller, P. R., and Dunphy, W. G. (1996) Role for a *Xenopus* ORC2-related protein in controlling DNA replication. *Nature* 379, 357-360

Carpenter, P. B., and Dunphy, W. G. (1998) Identification of a novel 81-kDa component of the *Xenopus* origin recognition complex. *J. Biol. Chem.* 273, 24891-24897

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

Coleman, T. R., Carpenter, P. B., and Dunphy, W. G. (1996) The *Xenopus* Cdc6 protein is essential for the initiation of a single round of DNA replication in cell-free extracts. *Cell.* 87, 53-63

Delidakis, C., and Kafatos, F.C. (1989) Amplification enhancers and replication origins in the autosomal chorion gene cluster of *Drosophila*. *EMBO J.* 8, 891-901

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

Dhar, S. K., and Dutta, A. (2000) Identification and Characterization of the Human ORC6 Homolog. *J. Biol. Chem.* 275, 34983-34988

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

Dijkwel, P.A., and Hamlin, J. L. (1995) Origins of replication and the nuclear matrix: the DHFR domain as a paradigm. *Int Rev Cytol.* 162A, 455-484

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

- Fujita, M., Hori, Y., Shirahige, K., Tsurimoto, T., Yoshikawa, H., and Obuse, C. (1998) Cell cycle dependent topological changes of chromosomal replication. *Genes Cells*. 3, 737-749
- Fujita, M., Kiyono, T., Hayashi, Y., and Ishibashi, M. (1997) In vivo interaction of human MCM heterohexameric complexes with chromatin. Possible involvement of ATP. *J. Biol. Chem.* 272, 10928-10935
- Fujita, M., Yamada, C., Goto, H., Yokoyama, N., Kuzushima, K., Inagaki, M., and Tsurumi, T. (1999) Cell cycle regulation of human CDC6 protein. Intracellular localization, interaction with the human mcm complex, and CDC2 kinase-mediated hyperphosphorylation. *Biol. Chem.* 274, 25927-25932
- Gavin, K. A., Hidaka, M., and Stillman, B. (1995) Conserved Initiator Proteins in Eukaryotes. *Science* 270, 1667-1671
- Genschel, J., Littman, S. J., Drummond, J. T., and Modrich, P. (1998) Isolation of MutSb from human cells and comparison of the Mismatch repair specificities of MutSb and MutSa. *J. Biol. Chem.* 273, 19895-19901
- Gossen, M., Pak, D. T., Hansen, S. K., Acharya, J. K., and Botchan, M. R. (1995) A *Drosophila* homolog of the yeast origin recognition complex. *Science* 270, 1674-1677
- Gulbis, J. M., Kelman, Z., Hurwitz, J., O'Donnell, M., and Kuriyan, J. (1996) Structure of the C-terminal region of p21^{WAF1/CIP1} complexed with human PCNA. *Cell* 87, 297-306
- Hannan, R. D., Cavanaugh, A., Hempel, W. M., Moss, T., and Rothblum, L. (1999) Identification of a mammalian RNA polymerase I holoenzyme containing components of the DNA repair / replication system. *Nucl. Ac. Res.* 27, 3720-3727
- Haracska, L., Unk, I., Johnson, R. E., Phillips, B. B., Hurwitz, J., Prakash, L., and Prakash, S. (2002) Stimulation of DNA synthesis activity of human DNA polymerase kappa by PCNA. *Mol Cell Biol.* 22, 784-791
- Haracska, L., Johnson, R. E., Unk, I., Phillips, B. B., Hurwitz, J., Prakash, L., and Prakash, S. (2001a) Targeting of human DNA polymerase iota to the replication machinery via

interaction with PCNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98, 14256-14261

Haracska, L., Johnson, R. E., Unk, I., Phillips, B., Hurwitz, J., Prakash, L., and Prakash, S. (2001b) Physical and functional interactions of human DNA polymerase ϵ with PCNA. *Mol Cell Biol.* 21, 7199-7206

Hassan, A. B., Errington, R. J., White, N. S., Jackson, D. A., and Cook, P. R. (1994) Replication and transcription sites are colocalized in human cells. *J Cell Sci.* 107, 425-434

Hughes, P., Tratner, I., Ducoux, M., Piard, K., and Baldacci, G. (1999) Isolation and identification of the third subunit of mammalian DNA polymerase δ by PCNA-affinity chromatography of mouse FM3A cell extracts. *Nucleic Acids Res.* 27, 2108-2114

Iida, T., Suetake, I., Tajima, S., Morioka, H., Ohta, S., Obuse, C., Tsurimoto, T. (2002) PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes Cells.* 7, 997-1007

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

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) Isolation of human and fission yeast homologues of the budding yeast origin recognition complex subunit ORC5: human homologue (ORC5L) maps to 7q22. *Genomics* 46, 294-298

Jallepalli, P. V., Tien, D., and Kelly, T. J. (1998) *sud1(+)* targets cyclin-dependent kinase-phosphorylated Cdc18 and Rum1 proteins for degradation and stops unwanted diploidization in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 8159-8164

Jiang, W., Wells, N. J., and Hunter, T. (1999) Multistep regulation of DNA replication by Cdk phosphorylation of HsCdc6. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 6193-6198

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

- Kornberg, A., and Baker, T. A. (1992) DNA Replication, 2nd Ed. W. H. Freeman, New York
- Kuriyan, J., and O'Donnell, M. (1993) Sliding clamps of DNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 234, 915-925
- Kreitz, S., Ritzi, M., Baack, M., and Knippers, R. (2001) The human origin recognition complex protein 1 dissociates from chromatin during S phase in HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 276, 6337-6342
- Krishna, T. S., Kong, X. -P., Gary, S., Burgers, P.M., and Kuriyan, J. (1994) Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* 79, 1233-1243
- Ladenburger, E. M., Keller, C., and Knippers, R. (2002) Identification of a binding region for human origin recognition complex proteins 1 and 2 that coincides with an origin of DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1036-1048
- Landis, G., Kelley, R., Spradling, A. C., and Tower, J. (1997) The k43 gene, required for chorion gene amplification and diploid cell chromosome replication, encodes the *Drosophila* homolog of yeast origin recognition complex subunit 2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 3888-3892
- Laskey, R. A., Gorlich, D., Madine, M. A., Makkerh, J. P., and Romanowski, P. (1996) Regulatory roles of the nuclear envelope. *Exp Cell Res.* 229, 204-211
- Lee, J. K., and Hurwitz, J. (2000) Isolation and characterization of various complexes of the minichromosome maintenance proteins of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem.* 275, 18871-18878
- Lee, D. G., and Bell, S. P. (1997) Architecture of the yeast origin recognition complex bound to origins of DNA replication. *Mol Cell Biol.* 17, 7159-7168
- Li, J. J., and Herskowitz, I. (1993) Isolation of ORC6, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science.* 262, 1870-1874

- Lin, S., and Kowalski, D. (1997) Functional equivalency and diversity of cis-acting elements among yeast replication origins. *Mol Cell Biol.* 17, 5473-5484
- Liang, C., and Stillman, B. (1997) Persistent initiation of DNA replication and chromatin-bound MCM proteins during the cell cycle in *cdc6* mutants. *Genes Dev.* 11, 3375-3386
- Loo, S., Fox, C. A., Rine, J., Kobayashi, R., Stillman, B., and Bell, S. P. (1995) The origin recognition complex in silencing, cell cycle progression, and DNA replication. *Mol. Cell Biol.* 16, 741-756
- Loor, G., Zhang, S-J., Zhang, P., Toomey, N. L., and Lee, M. Y. W. T. (1997) Identification of DNA replication and cell cycle proteins that interact with PCNA. *Nucleic Acids Res.* 25, 5041-5046
- Makino, Y., Kanemaki, M., Kurokawa, Y., Koji, T., and Tamura, T. (1999) A Rat RuvB-like Protein, TIP49a, Is a Germ Cell-enriched Novel DNA Helicase. *J. Biol. Chem.* 274, 15329-15335
- Mayer, M. L., Gygi, S. P., Aebersold, R., and Hieter, P. (2001) Identification of RFC (Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p):An alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*. *Mol. Cell.* 7, 959-970
- Mendez, J., Zou-Yang, X. H., Kim, S. Y., Hidaka, M., Tansey, W. P., and Stillman B. (2002) Human origin recognition complex large subunit is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after initiation of DNA replication. *Mol. Cell* 9, 481-491
- Michelle, F. P., and Michael, R. B. (2001) Orc mutants arrest in metaphase with abnormally condensed chromosomes. *Development* 128, 1697-1707
- Micklem, G., Rowley, A., Harwood, J., Nasmyth, K., and Diffley, J. F. (1993) Yeast origin recognition complex is involved in DNA replication and transcriptional silencing. *Nature* 366, 87-89
- Natale, D. A, Li, C. J., Sun, W. H., and DePamphilis, M. L. (2000) Selective instability of Orc1 protein accounts for the absence of functional origin recognition complexes during the

M-G(1) transition in mammals. *EMBO J.* 19, 2728-2738

Naiki, T., Kondo, T., Nakada, D., Matsumoto, K., and Sugimoto, K. (2001) Chl12 (Ctf18) forms a novel replication factor C-related complex and functions redundantly with Rad24 in the DNA replication checkpoint pathway. *Mol. Cell. Biol.* 21, 5838-5845

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

Ogawa, Y., Takahashi, T., and Masukata, H. (1999) Association of fission yeast Orp1 and Mcm6 proteins with chromosomal replication origins. *Mol Cell Biol.* 19, 7228-7236

Ohta, S., Shiomi, Y., Sugimoto, K., Obuse, C., and Tsurimoto, T. (2002) A proteomics approach to identify proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding proteins in human cell lysates. Identification of the human CHL12/RFCs2-5 complex as a novel PCNA-binding protein. *Biol Chem.* 277, 40362-40367

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

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

Pagano, M., Pepperkok, F. V., Ansorge, W. and Draetta, G. (1992). Cyclin A is required at two points in the human cell cycle. *EMBO*, 11, 961-971

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

Prasanth, S. G., Prasanth, K. V., and Stillman, B. (2002) Orc6 involved in DNA replication, chromosome segregation, and cytokinesis. *Science* 297, 1026-1031

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) *latheo* encodes a subunit of the origin recognition complex and disrupts neuronal proliferation and adult olfactory memory when mutant. *Neuron* 23, 45-54

Prelich, G., Tan, C.-K., Kostura, M., Mathews, M.B., So, A.G., Downey, K.M., and Stillman, B. (1987) Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-delta auxiliary protein. *Nature* 326, 517-519

Quintana, D. G., Hou, Z., Thome, K. C., Hendricks, M., Saha, P., and Dutta, A. (1997) Identification of HsORC4, a Member of the Human Origin of Replication Recognition Complex *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) ORC5L, a New Member of the Human Origin Recognition Complex, Is Deleted in Uterine Leiomyomas and Malignant Myeloid Diseases. *J. Biol. Chem.* 273, 27137-27145

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

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

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

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

Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O., and Mann, M. (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal. Chem.* 68, 850-858

Shibahara K, and Stillman B. (1999) Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell*. 19; 575-585

Shikata, K., Ohta, S., Yamada, K., Obuse, C., Yoshikawa, H., and Tsurimoto, T. (2001) The human homologue of fission Yeast cdc27, p66, is a component of active human DNA polymerase delta. *J Biochem*. 129, 699-708

Shimizu, K., Kawasaki, Y., Hiraga, S., Tawaramoto, M., Nakashima, N., and Sugino, A. (2002) The fifth essential DNA polymerase phi in *Saccharomyces cerevisiae* is localized to the nucleolus and plays an important role in synthesis of rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99, 9133-9138

Skibbens, R. V., Corson, L. B., Koshland, D., and Hieter, P. (1999) Ctf7p is essential for sister chromatid cohesion and links mitotic chromosome structure to the DNA replication machinery. *Genes Dev*. 13, 307-319

Smith, S., and Stillman, B. (1991) Immunological characterization of chromatin assembly factor I, a human cell factor required for chromatin assembly during DNA replication in vitro. *J. Biol. Chem*. 266, 12041-12047

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

Tadokoro, R., Fujita, M., Miura, H., Shirahige, K., Yoshikawa, H., Tsurimoto, T., and Obuse, C. (2002) Scheduled Conversion of Replication Complex Architecture at Replication Origins of *Saccharomyces cerevisiae* during the Cell Cycle. *J. Biol. Chem*. 277, 15881-15889

Takagi, H., Tajima, S., and Asano, A. (1995) Overexpression of DNA methyltransferase in myoblast cells accelerates myotube formation. *Eur J Biochem*. 231, 282-291

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

Tsurimoto, T., and Stillman, B. (1989). Purification of a cellular replication factor, RF-C, that

is required for coordinated synthesis of leading and lagging strand during simian virus 40 DNA replication in vitro, *Mol. Cell. Biol.*, 9, 609-619

Tsurimoto, T. and Stillman B. (1990) Functional of replication factor C and proliferating-cell nuclear antigen : functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 1023-1027

Tsurimoto, T. (1999) PCNA binding proteins. *Front Biosci.* 4, 849-858

Tugal, T., Zou, Y. X., Gavin, K., Pappin, D., Canas, B., Kobayashi, R., Hunt, T., and Stillman, B. (1998) The Orc4p and Orc5p subunits of the *Xenopus* and human origin recognition complex are related to Orc1p and Cdc6p. *J. Biol. Chem.* 273, 32421-32429

Vashee, S., Simancek, P., and Challberg, M. D. and Kelly, T. J. (2001) Assembly of the human origin recognition complex. *J. Biol. Chem.* 276, 26666-26673

You, Z., Komamura, Y., and Ishimi, Y. (1999) Biochemical analysis of the intrinsic Mcm4-Mcm6-mcm7 DNA helicase activity. *Mol Cell Biol.* 1999 19, 8003-8015.

Vaughn, J. P., Dijkwel, P.A., and Hamlin, J.L. (1990) Replication initiates in a broad zone in the amplified CHO dihydrofolate reductase domain. *Cell.* 61, 1075-1087.

Waga, S., and Stillman, B. (1998) The DNA replication fork in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem* 67, 721-751

Walton, L. F., and Bonita, J. B. (1992) A question of time replication origins of eukaryotic chromosomes. *Cell* 71, 363-366

Warbrick, E., Heatherington, W., Lane., D. P. Glover DM.(1998) PCNA binding proteins in *Drosophila melanogaster* :the analysis of a conserved PCNA binding domain. *Nucleic Acids Res.* 26, 3925-3932.

Yaneva, M. and Jhiang, S. (1991) Eexpression of the Ku protein during cell proliferation. *Biochem Biophys Acta.* 1090, 181-187

Zhang, Z., Shibahara, K., and Stillman, B.(2000) PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature.*;408, 221-225.

資料

Satoshi Ohta, Yasushi Shiomi, Katsunori Sugimoto, Chikashi Obuse, and Toshiki Tsurimoto (2002) A proteomics approach to identify proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-binding proteins in human cell lysates. *J. Biol Chem.* **277**, 40362-40367

Koh Shikata, Satoshi Ohta, Kouichi Yamada, Chikashi Obuse, Hiroshi Yoshikawa, and Toshiki Tsurimoto (2001) The human homologue of fission yeast cdc27, p66, is a component of active human DNA polymerase δ . *J. Biochem.* **129**, 699-708

Tetsuo Iida, Isao Suetake, Shoji Tajima, Hiroshi Morioka, Satoshi Ohta, Chikashi, Obuse, and Toshiki Tsurimoto (2002) PCNA clamp facilitates action of DNA cytosine methyltransferase 1 on hemimethylated DNA. *Genes to Cells.* **7**, 997-1007