

所属 (主指導官)	動物分子遺伝学講座 (加藤 順也 教授)		
氏名	塩見 泰史	提出	平成 15 年 1 月 7 日
題目	ゲノム情報の維持伝達に要求されるクランプ・クランプローダー系の再構築と機能解析		

ゲノム情報の安定な維持伝達は DNA の複製と修復、染色体の再構築と分配、といった細胞周期の進行に特有な反応を担った数多くのタンパク質の巧妙なクロストークの上に成り立っている。最近のゲノム生物学の進展によって、ゲノム情報の安定な維持伝達に関与する因子の反応機構には、機能的な類縁性だけでなく幾つか共有の基本原理の存在が明らかになってきた。たとえば真核生物では相互に高い類似性を持つ複数のクランプ・クランプローダー系が存在し、複製反応を軸としたゲノムの情報維持機構の分子集合の中核として機能していると考えられている。本研究では、それらの反応機構の特異性と機能的連携を明らかにすることを目的として、ヒト由来のクランプ・クランプローダー系の再構築と機能解析を行った。

まず、複製フォークで DNA ポリメラーゼ δ/ϵ の補助因子として機能し、クランプ・クランプローダー系の代表である PCNA (増殖細胞核抗原)、RFC (複製因子 C) について解析した。バキュロウイルス発現系を用いて再構築したヒト RFC による PCNA のローディング機構の解析では生化学的な解析に加えて、新たに電子顕微鏡観察による分子構造解析を導入した。その結果、RFC が U 字型の複合体であること、およびその構造が ATP 加水分解依存的に変化することを示した。この解析によりリング構造の PCNA が、結合した RFC の構造変化を駆動力として一時的に開環し DNA にローディングする機構が説明された。

当初、クランプ・クランプローダー系は DNA ポリメラーゼの補助因子に特有のしくみと考えられたが、チェックポイント応答、染色体接着等に関与する因子にクランプ・クランプローダーに相当すると予想されるものが見いだされてきた。そこで、PCNA-RFC の解析法をこれらに適用し、新規のクランプ・クランプローダー系の証明、機能解析を行った。

DNA 傷害、複製停止チェックポイント応答に必須な因子である分裂酵母、ヒトの RAD9、HUS1、RAD1 (出芽酵母 DDC1、MEC3、RAD17 に相当) は PCNA 類似タンパク質をコードしており、お互いに相互作用する。そこでこれらは Rad9/Hus1/Rad1 (Rad9-1-1) と呼ばれる複合体を形成し新規クランプとして機能すると考えられた。一方、同じチェックポイント経路に属する分裂酵母、ヒトの RAD17 (出芽酵母 RAD24) は RFC ファミリーに属し、

RFC の 4 つの小サブユニットと Rad17-RFC と呼ばれる複合体を形成し、Rad9-1-1 に対応するクランプローダーと考えられた。RFC 同様、バキュロウイルス発現系を用いて再構築し精製された Rad17-RFC は、予想されたように Rad9-1-1 と特異的な結合を示した。さらにプライマー／鋳型 DNA との結合および ATPase 活性を有するがそれぞれの活性は RFC の 1/5 および 1/3 であり、しかも RFC と異なりその ATPase 活性は DNA やクランプの Rad9-1-1 を添加してもほとんど促進されなかった。また実際に Rad17-RFC による Rad9-1-1 の DNA へのローディング活性を検出することはできなかった。これに対して電子顕微鏡観察による構造解析では Rad9-1-1、Rad17-RFC は PCNA、RFC とほとんど同一の分子構造をしていることを明らかにした。以上の結果から、Rad9-1-1 と Rad17-RFC は、第二のクランプ・クランプローダー系であることが強く示唆された。しかしそのローダー活性を発揮するためには、プライマー／鋳型 DNA 以外の特異的に結合する DNA 構造、あるいは未同定の必須因子の添加、あるいは関与する因子の翻訳後修飾が必要と考えられる。このことから、Rad9-1-1 と Rad17-RFC は、特定の DNA 基質、あるいは DNA 傷害応答による蛋白質修飾系によって機能制御を受けるクランプ・クランプローダー系であることが示唆され、チェックポイント応答機構を考える上で興味深い機能系である。

第三のクランプ・クランプローダー系としてやはり RFC ファミリーに属する CHL12/CTF18 (ヒト CHL12) が見いだされた。CHL12/CTF18 は DNA 複製後の姉妹染色体接着に必須な出芽酵母の遺伝子として同定されている。まず、ヒト Chl12 も Rad17 と同様 RFC の 4 つの小サブユニットと共発現して Chl12-RFC と呼ばれる複合体を形成することを明らかにした。一方、この複合体の標的クランプは明らかにされていなかったが、当研究室で行われた PCNA 結合タンパク質のプロテオミクス解析の結果から、新規 PCNA 結合タンパク質として Chl12 が発見された。そこで、再構築した Chl12-RFC 複合体と PCNA との結合を解析した結果、Chl12-RFC 複合体が PCNA と特異的に結合することを明らかにした。また再構築した Chl12-RFC のプライマー／鋳型 DNA との結合活性は RFC の 1/5 であったが、RFC と同様の比活性の ATPase 活性を有し、その活性は DNA、PCNA の添加により促進された。さらに、RFC の 1/6 の比活性ではあるが、Chl12-RFC は ATP 依存的な PCNA の DNA ローディング活性を示した。以上の結果から、Chl12-RFC は、機能する反応系は異なるが、第二の PCNA ロードラーであることを初めてその活性から直接に証明した。今後、いかなる状況で PCNA ロードラーが RFC と Chl12-RFC の間で使い分けられているのか、あるいは、ロードラーが異なったとき、ロードされた PCNA の機能にどのような違いがあるのか、など複製フォークと姉妹染色体接着の間の機能連携について興味深いアプローチが可能である。

ゲノム情報の維持伝達に要求される
クランプ・クランプローダー系の再構築と機能解析

塩見 泰史

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7日提出

目次

第1章 序論

第2章 DNA複製で機能するクランプローダー、RFCによるPCNAクランプローディング機構の解析

2-1 序

2-2 材料と方法

2-3 結果

2-4 考察

第3章 新規クランプ・クランプローダー系タンパク質発現系の構築と、複合体形成

3-1 序

3-2 材料と方法

3-3 結果

3-4 考察

第4章 チェックポイント応答のクランプ・クランプローダー、Rad9-1-1とRad17-RFCの精製と機能解析

4-1 序

4-2 材料と方法

4-3 結果

4-4 考察

第5章 娘染色体接着で機能するクランプローダー、Chl12-RFCの精製と機能解析

5-1 序

5-2 材料と方法

5-3 結果

5-4 考察

第6章 3つのクランプ・クランプローダー系の活性の比較

6-1 序

6-2 材料と方法

6-3 結果

6-4 考察

第7章 総合考察

謝辞

参考文献

参考資料

ATP-dependent structural change of the eukaryotic clamp-loader protein, replication factor C.

Shiomi Y, Usukura J, Masamura Y, Takeyasu K, Nakayama Y, Obuse C, Yoshikawa H, Tsurimoto T.

Proc Natl Acad Sci U S A 2000 Dec 19;97(26):14127-32

Clamp and clamp loader structures of the human checkpoint protein complexes, Rad9-1-1 and Rad17-RFC.

Shiomi Y, Shinozaki A, Nakada D, Sugimoto K, Usukura J, Obuse C, Tsurimoto T. Genes Cells. 2002 Aug;7(8):861-8.

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.

Ohta S, Shiomi Y, Sugimoto K, Obuse C, Tsurimoto T.

J Biol Chem. 2002 Oct 25;277(43):40362-7.

第 1 章 序論

すべての生物の生命の維持と種の保存のためには自己の情報を安定に保持し、その情報を正確に子孫に伝達する必要がある。自己の情報とは 4 つの塩基によって DNA に記されたゲノム情報である。このゲノム情報は DNA の複製と修復、染色体の修飾や再構築と分配、といった細胞周期進行にともなった特有な反応によって安定かつ正確に維持伝達される。このため、これらの反応に特有の機能を担った数多くのタンパク質が存在し、これらの巧妙なクロストークの上にゲノム情報の維持伝達が行われている。なかでも、DNA 複製はゲノム情報の維持伝達機構の最も根幹を支える反応機構であり、その研究は生命現象の本質を知るために必要不可欠である。

DNA 複製時には、多様な因子がレプリソームとよばれる複合体を形成し、協調的に DNA 上を移動しながら新鎖 DNA を合成する (Benkovic et al., 2001)。この DNA 伸長反応が行われる部位では、複製途中の DNA とレプリソームが複製フォークと呼ばれる構造をとる (Stillman, 1994)。この複製フォークを構成するタンパク質群は、フォークの先導となるヘリカーゼ、プライマーを合成するプライマーゼ、DNA 合成そのものを行う DNA ポリメラーゼホロ酵素、DNA 合成後にラギング鎖を連続的な DNA 鎖に連結する酵素から成る。このフォークで直接 DNA 複製を行う DNA ポリメラーゼの活性は、クランプとクランプローダーと呼ばれる 2 種類の補助タンパク質によって制御されている。これらクランプとクランプローダーは大腸菌から酵母、ヒトに至るまで高度にその機能が保存され、複製に関与する DNA ポリメラーゼのプロセッシビティーを促進する機能を持つ。その結果、これらはリーディング鎖の長く連続的な DNA 合成を可能にし、ラギング鎖での効率の良い DNA ポリメラーゼのプライマー末端への結合を支えている (Bambara et al., 1997 ; Waga and stillman, 1998)。この観点から、クランプとクランプローダーは複製フォークの進行にとって必須の因子であるといえる。

クランプとクランプローダー

クランプは大腸菌の DNA ポリメラーゼ III の β サブユニット、T4 ファージの gp45、古細菌、真核生物の増殖細胞核抗原 (PCNA) というように生物種を超えて存在する。大腸菌の β サブユニットは単一サブユニットの二量体として、gp45、PCNA は三量体として形成される。これらのクランプを構成するタンパク質は、アミノ酸配列レベルでは相互に類縁性が低いにも関わらず (O'Donnell et al., 1993)、その立体構造は全て特徴的なリング構造をとっている (Hingorani and O'Donnell, 2000 ; Bruck

and O'Donnell, 2001 ; Jeruzalmi et al., 2002)。私が解析対象にしたヒト PCNA は、分子量 29kDa のサブユニットの三量体から成る複合体で、特徴的なリング構造を持つことが X 線結晶構造解析で示されている (Krishna et al., 1994)。このリング中央の穴は二本鎖 DNA を通すのに十分な約 3nm の直径を持ち、一度 DNA と結合するとその上を自由にすべることができる。そのため、DNA スライディングクランプとも呼ばれる。この PCNA は DNA ポリメラーゼ(Pol) δ と結合して、そのプロセシビティ因子として機能する。この Pol δ の補助因子の機能に加えて、PCNA は Gadd45 (growth arrest and DNA damage 45)、サイクリン D、p21、MSH (MutS homologue) ファミリータンパク質や CAF-1 (chromatin assembly factor-1) など様々な機能を担う蛋白質と結合することが明らかにされており (Umar et al., 1996 ; Fujise et al., 2000 ; Smith et al., 1994 ; Xiong et al., 1992 ; Shibahara et al., 1999)、Dnmt 1 (DNA cytosine methyltransferase 1) などの因子については、PCNA によりその活性が促進されることが報告されている (Iida et al., 2002)。したがって、PCNA は複製反応から DNA 傷害応答、ミスマッチ修復、DNA 修飾や染色体再構成などのゲノム情報の維持伝達に重要な反応においても中枢的な機能を担うことが示されている。PCNA がこのような機能をするには、当然 DNA 上に結合していなければならないが、そのためには PCNA の閉じたリング構造を一時的に開く必要がある。しかしながら、PCNA それ自身にはこの機能はなく、特定のクランプローダーという因子がこの反応を触媒する。

クランプローダーも大腸菌の γ 複合体、T4 ファージの gp44/62 複合体、古細菌、真核生物の replication factor C (複製因子 C、RFC) というようにそれぞれのクランプに対応して生物種を超えて存在する (Trakselis and Benkovic, 2001 ; Mossi and Hubscher, 1998 ; Ellison and Stillman, 2001 ; O'Donnell et al., 2001)。PCNA のクランプローダー、RFC は AAA+クラス ATPase ファミリー (Neuwalde et al., 1999 ; Vale, 1999 ; Ogura and Wilkinson, 2001) に属する 5 つのヘテロなサブユニット (ヒトでは p140、p40、p38、p37、p36。酵母ではそれぞれ RFC1、RFC4、RFC5、RFC2、RFC3 に相当する) から構成される 5 量体である。RFC は DNA と PCNA に依存して促進される ATPase 活性と、鋳型 DNA 上のプライマー 3' 末端に特異的に結合する活性を持ち、ATP 依存的に PCNA を鋳型 DNA にロードする。この PCNA の DNA へのローディング時に、RFC が PCNA リングを一時的に開く際には、RFC 自身が ATP 依存的に構造変化し、これを駆動力としてリング構造を開環することが予想された。本研究ではこれを証明するため、従来の生化学的解析法に加えて電子顕微鏡、原子間力顕微鏡を用いた分子形態の直接観察法を試みた。その結果、RFC の 5 つのサブユニットがリング状に集合した U 字型の構造を持ち、この構造が ATP 加水分解依存的に C 字構造に大きく変化することを示すことができた (Shiomi et al., 2000)。

これにより、RFC の構造変化を駆動力として結合した PCNA のリング構造が一時的に開環し DNA にローディングする機構を説明することができた。

クランプとクランプローダーの多様性

当初、クランプ・クランプローダー系は DNA 複製で機能する PCNA と RFC に特有のしくみと考えられたが、DNA 傷害や DNA 複製停止時のチェックポイント応答、また、複製終了後に形成された 2 つの娘染色体どうしの接着に関与する因子にクランプ・クランプローダーに相当するものが見いだされてきた (図 1)。

DNA 傷害、DNA 複製停止チェックポイント応答で機能する因子として分裂酵母の *RAD9*、*HUS1*、*RAD1* (出芽酵母 *DDC1*、*MEC3*、*RAD17*) が同定された (Weinert et al., 1994; Rowley et al., 1992; Murray et al., 1991; Kostrub et al., 1997; Zhou and Elledge, 2000; O'Connell et al., 2000; Boddy and Russell, 2001)。これらの遺伝子はヒトに至まで高度に保存されており (Dean et al., 1998)、PCNA の類縁タンパク質をコードしている (Thelen et al., 1999; Venclovas and Thelen, 2000)。これらは互いに相互作用し複合体を形成することが示され (Volkmer and Karnitz, 1999; Caspari et al., 2000; St Onge et al., 1999; Kondo et al., 1999)、さらに、この相互作用は Rad9 のアミノ末端 (N 末端) と Rad1 の カルボキシル末端 (C 末端)、Rad1 の N 末端と Hus1 の C 末端、Hus1 の N 末端と Rad9 の C 末端といった head-to-tail 様式であることが再構成系を用いて示された (Burtelow et al., 2001)。そこでこれらは Rad9/Hus1/Rad1 (Rad9-1-1) と呼ばれる複合体を形成し、チェックポイント応答における新規クランプとして機能すると考えられた。一方、同じチェックポイント経路に属する分裂酵母、ヒトの *RAD17* (出芽酵母 *RAD24*) は AAA+ ATPase ファミリーに属する RFC 類縁タンパク質をコードしており (Griffiths et al., 1995)、RFC の 4 つの小サブユニットと Rad17-RFC と呼ばれる複合体を形成することが示された (Green et al., 2000; Naiki et al., 2000; Kai et al., 2001)。したがって、この複合体が Rad9-1-1 クランプに対応するクランプローダーと考えられ、DNA 傷害、DNA 複製停止チェックポイント応答においても、DNA 複製の PCNA-RFC のようなクランプ・クランプローダー系が存在すると考えられるようになった (Rauen et al., 2000; Venclovas and Thelen, 2000; Melo et al., 2001; Zou et al., 2002)。

さらに、DNA 複製後の姉妹染色体接着に必須な出芽酵母の遺伝子として、*CHL12/CTF18* (ヒト *CHL12*) が見い出された (Kouprina et al., 1994; Spencer et al., 1990)。また、*CHL12* は、DNA 複製停止チェックポイントへの関与も示されている (Naiki et al., 2001)。この遺伝子も AAA+ ATPase ファミリーに属する RFC 類縁タンパク質をコードしており、Rad17 と同様に RFC の 4 つの小サブユニットと Chl12-RFC と呼ばれる新規クランプローダー様複合体を形成することが示唆された

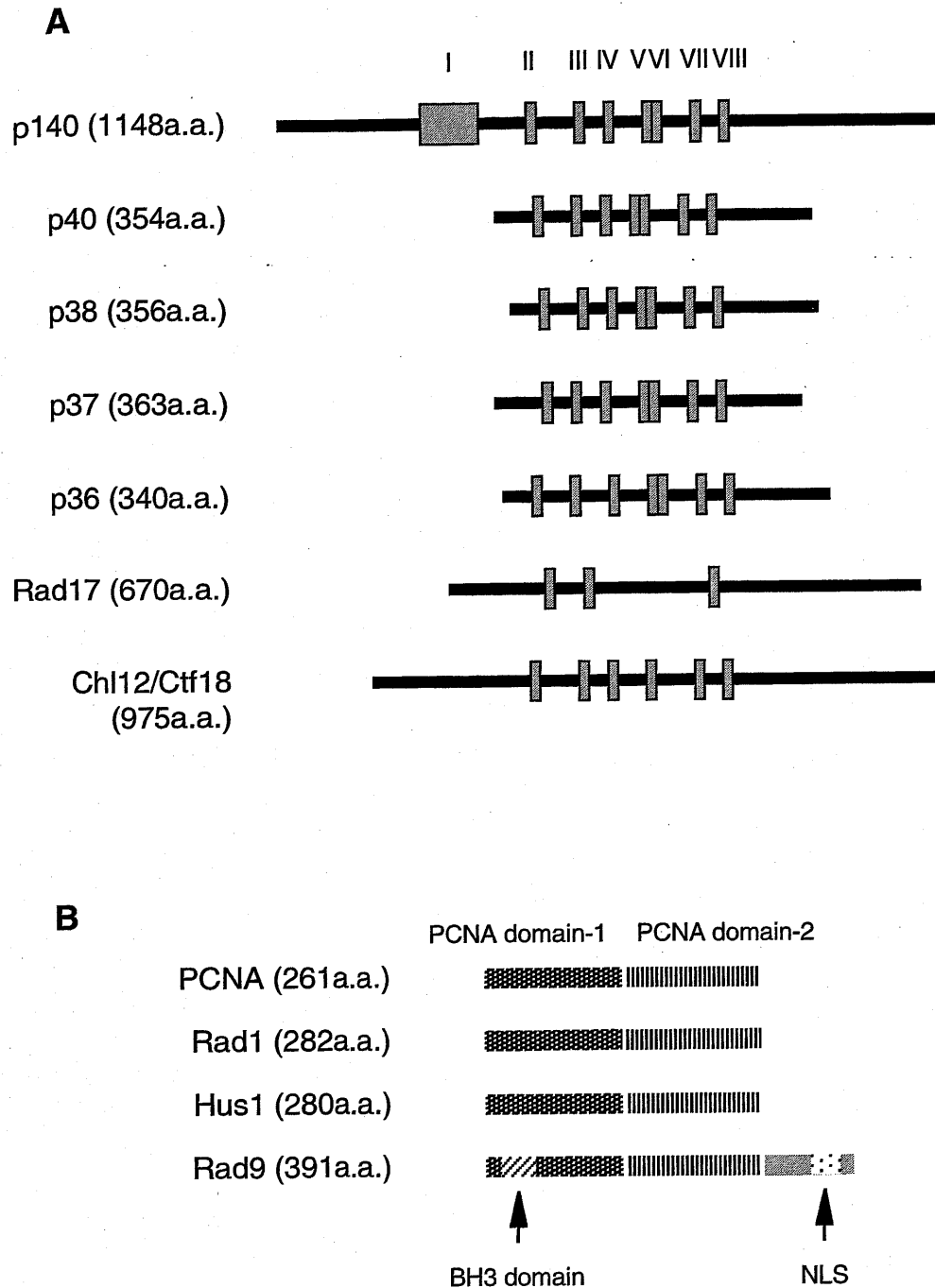


図1 真核生物に保存される、RFC類縁タンパク質とPCNA類縁タンパク質

(A) RFCファミリータンパク質。5つのRFCサブユニットに高度に保存されるRFC box II-VIIIを示した。RFC box I (DNA ligaseモチーフ) はp140のみに存在する。これらのモチーフのうち、Rad17にはbox II、III、VIIIが、Chl12にはbox VIを除くbox II-VIIIが高度に保存されている。(B) PCNAファミリータンパク質。Rad1、Hus1、Rad9はほぼすべての領域がPCNA類似ドメイン1、および、2からなる。Rad9はこれに加えて、アポトーシス制御因子と相互作用するBH3 (bcl2-homology 3) ドメイン、および、核移行シグナル (NLS) を持つ。

(Hanna et al., 2001 ; Naiki et al., 2001)。この Chl12-RFC 複合体に対するクランプは明らかでなかったが、姉妹染色体接着反応でもクランプ・クランプローダー系が存在すると考えられるようになった。

本研究では、このように細胞内で複数存在すると考えられるクランプ・クランプローダー系のそれぞれの反応機構の特異性と機能的連携を明らかにすることを目的として、ヒト由来のクランプ・クランプローダー系を再構築し、PCNA-RFC の解析に用いた生化学活性や分子構造の解析を行った。これらの解析結果から、DNA複製から染色体分配に至るゲノム情報の安定な維持伝達機構における多様なクランプ・クランプローダー系の役割の基本原理を明らかにすることをめざした。

バキュロウイルス発現系を用いて再構築し精製された Rad17-RFC は、Rad9-1-1 と特異的な結合、プライマー／鋳型 DNA との結合および ATPase 活性を示したが、Rad9-1-1 を DNA へローディングすることはできなかった。これに対して電子顕微鏡観察による構造解析では Rad9-1-1、Rad17-RFC がそれぞれ PCNA、RFC と同一の分子構造をしていることを明らかにした (Shiomi et al., 2002)。以上の結果から、Rad9-1-1 と Rad17-RFC は、第二のクランプ-クランプローダー系であることが強く示唆された。

第三のクランプローダーと考えられる Chl12-RFC は PCNA との特異的な結合、プライマー／鋳型 DNA との結合、および、ATPase 活性を示した。さらに、Chl12-RFC は ATP 依存的に PCNA を DNA にローディングする活性を有し、Chl12-RFC が第二の PCNA ローダーであることを初めて直接に証明した。

第2章

DNA 複製で機能するクランプローダー、RFC による PCNA クランプローディング機構の解析

2-1 序

真核生物の複製フォークでは、多数の蛋白質が機能的な複合体を形成しリーディング、ラギング鎖の合成を効率良く行っている。この複合体の構成因子の一つ PCNA は、複製反応からその後のミスマッチ修復、DNA 修飾や染色体再構成に至るまで中枢的な機能を担っている。PCNA がこのように機能するには DNA に結合している必要があり、そのためにはリング構造が一時的に開かれなければならない。しかし PCNA それ自身にその機能はなく、この反応はクランプローダーである RFC と ATP のエネルギーによって触媒される (Waga and stillman, 1998)。現在までに、大腸菌のクランプローダー、 γ 複合体の解析で、ATP 結合によって γ 複合体のコンフォメーションが変化することが示されている (Hingorani et al., 1998)。したがって、RFC でも γ 複合体と同様に ATP 依存的な構造変化が強く示唆される。そこで、この ATP 依存的構造変化を介した PCNA の DNA へのローディング機構を明らかにする目的で、PCNA ローダーである RFC を生化学的解析と電子顕微鏡、原子間力顕微鏡を用いた分子形態の直接観察により解析した。

2-2 材料と方法

タンパク質の検出と定量

タンパク質の定量は Bovine Serum Albumin (BSA ; Takara) を標準タンパク質として、ブラッドフォード法による Protein Assay Kit (Bio-Rad, CA, USA) を用いて行った。また、SDS-PAGE の CBB、銀染色あるいはウエスタンブロッティングによるバンドの定量は、KODAK 1D image analysis system Ver. 3.5 (Eastman Kodak Company, NY, USA) を用いて行った。

SDS-PAGE

タンパク試料を等量の 2×Laemmli SDS サンプルバッファー [0.1M Tris-HCl (pH6.8)、0.2M DTT、4% SDS、0.1%BPB、20% glycerol] に加えて、95℃で5分間加熱した後、12.5%、15%ポリアクリルアミドゲル、または、4-20%ポリアクリルアミドゲル (テフコ、東京) で電気泳動を行った。タンパク質の検出は CBB (Rapid

Stain CBB Kit、ナカライ)、または、銀染色(第一化学薬品、東京)で行った。

ウェスタンブロッティング

タンパク質試料を SDS-PAGE で分離した後、PVDF 膜 (Hybond-P ; Amersham bioscience) にセミドライ転写装置 (BIO CRAFT) を用いて転写バッファー (0.1M Tris-HCl, 192mM glycine, pH 8.3) 中で 1 時間、3mA/cm² の条件で転写した。1% スキムミルク (雪印、札幌) を含むトリスバッファー (TBS ; 30mM Tris, 0.2M NaCl, pH7.5) で 30 分間 PVDF 膜をブロッキングした後、1% スキムミルクを含む TBS 中で一次抗体と反応させた。TBS で PVDF 膜を洗浄した後、1% スキムミルクを含む TBS 中で peroxidase 標識された二次抗体と反応させた。TBS で PVDF 膜を洗浄した後、抗体と反応したタンパク質は ECL system (Amersham Biosciences, NJ, USA) を用いて X 線フィルム (富士フィルム、東京) に感光させ可視化した。

PCNA の精製

ヒト PCNA は、T7 フェージプロモーター下流に PCNA の cDNA を組み込こんだ pT7-PCNA を保持する大腸菌で発現させ、Fukuda ら (Fukuda et al., 1995) の方法で精製を行った。

RFC 発現系の作成

RFCp140 の cDNA が組み込まれたバキュロウイルスは、当研究室に在籍した辻本 (未発表 ; 辻本、修士論文、1997) が作成した pBacPAK9-p140 プラスミドから、BacPAK Baculovirus Expression System (CLONTECH, CA, USA) を用いて作成した。RFC p36 と p38、および、p37 と p40 の組み合わせで cDNA が組み込まれた pFASTBAC-DUAL プラスミドは当研究室に在籍した鈴木 (未発表、1999) が作成し、これらから BAC-TO-BAC Baculovirus Expression Systems (LIFE TECHNOLOGIES, MD, USA) を用いてバキュロウイルスを作成した。

バキュロウイルスによる昆虫細胞でのタンパク質の発現

昆虫細胞 Sf9 は 27°C でスピナーフラスコ (BELLCO, NJ, USA) を使い、10% Fetal Bovine Serum (LIFE TECHNOLOGIES) と 1% Penicillin-Streptomycin (5000units/ml, Invitrogen, NY, USA) を含む Grace's 昆虫細胞培地 (GIBCO, NY, USA) 中で浮遊培養により維持、継代した。目的とする蛋白質を Sf9 中で発現する際には 1.5×10^7 個の Sf9 細胞を 150mm² dish に接着させ、各サブユニットの cDNA が組み込まれたバキュロウイルスの感染細胞の培養上清 (各 0.5ml、最終体積は Grace's 培地でメスアップして 3ml) を 1 時間共感染させた後、27°C で 60 時間培養した。感染した

Sf9 細胞は Cell Lifter (Corning, NY, USA) を用いて回収し、0℃で TD バッファー [25mM Tris-HCl (pH7.4)、0.136M NaCl、6.7mM KCl、0.7mM Na₂HPO₄] で洗浄した。150mm² dish 1 枚の感染細胞当たり、0.8ml の B バッファー [50mM Tris-HCl (pH8.0)、0.15M NaCl、1mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、10% glycerol、1mM PMSF (phenylmethylsulphonyl fluoride)、20 μg/ml Leupeptin、10mM DTT (dithiothreitol ; FLAG タグを付加したタンパク質の発現では DTT は加えない)] に懸濁し、最終濃度 0.5% の NP-40 (Nonidet P-40、ナカライ、東京) を加え、ボルテックスで 30 秒間激しく攪拌して細胞を破碎し、0℃で 20 分間静置した。その後、最終濃度 0.5M の NaCl を加え、さらに 0℃で 20 分間静置した。この後、33,000rpm、30 分間、4℃で遠心し (70Ti rotor、Beckman、CA、USA) 細胞抽出液を得た。

RFC の精製

昆虫細胞で発現させたヒト RFC の精製は、Gerik ら (Gerik et al., 1997) の方法を改変して作成した PCNA-agarose カラム (Ohta et al., 2002) を用いて、以下の方法で行った。操作は特記のない限り 0-4℃で行い、全てのバッファーには終濃度 1mM DTT、0.1mM PMSF、2 μg/ml Leupeptin を添加した。5 つの RFC サブユニットを共発現させた昆虫細胞抽出液を B バッファー (0.5% NP-40、0.5M NaCl) で平衡化した DEAE Sephacel (Amersham Biosciences) カラムで除核酸した後、この分画を 10mM MgCl₂ を加えた PCNA バッファー [25mM HEPES-NaOH (pH7.5)、10% glycerol、0.5% NP-40] で最終塩濃度が 125mM になるように希釈した。これを 5mM MgCl₂、2mM ATP、125mM NaCl を加えた PCNA バッファーで平衡化した PCNA カラムにロードした後、5mM MgCl₂、2mM ATP、0.4M NaCl、2mM ATP、0.4M NaCl を加えた PCNA バッファーでカラムを洗浄した。カラムに結合した RFC は、10mM EDTA、1M NaCl を加えた PCNA バッファーを用いて室温で段階的に溶出した。RFC が含まれる分画をプールし 0.2M NaCl になるように 0M NaCl の P-cell バッファー [25mM HEPES-NaOH (pH7.5)、10% glycerol、1mM EDTA、0.1% NP-40] で希釈して、0.2M NaCl の P-cell バッファーで平衡化した phospho cellulose (Whatman, UK) カラムにロードした。カラムを 0.4M NaCl の P-cell バッファーで洗浄したのち、結合した RFC を 0.66M NaCl の P-cell バッファーで溶出した。得られた RFC を含む画分の 100 μl を 0.1M NaCl を含む H バッファー [25mM HEPES-NaOH (pH7.5)、1mM EDTA、0.01% NP-40] で調製した 2.2ml の 15-35%グリセロール密度勾配遠心で 50,000 rpm、4℃で 14 時間遠心した (TLS55 rotor、Beckman)。ボトムから 100 μl ずつ分画回収し、精製 RFC を得た。

プロテアーゼによる RFC の部分分解産物の解析

10mM HEPES-NaOH (pH7.5)、10mM MgCl₂、130mM NaCl、ヌクレオチド未添加、または、1mM の ATP、ATP γ S、ADP 添加の各条件の反応液 10 μ l 中で 300ng の RFC を室温で 5 分間ブレインキュベートした後、各 15ng の Lys-C エンドプロテアーゼ (30U/mg、V5131 ; Promega、WI、USA)、または、トリプシン (T-8658 ; Sigma、MO、USA) を加えて室温で 60 分間インキュベートした。5 μ l の 2 $\times$ NuPAGE LDS サンプルバッファー (NOVEX、CA、USA) の添加で反応を止め、95 $^{\circ}$ C で 5 分間インキュベートした後、NuPAGE MES SDS 泳動バッファー (NOVEX) 中で 4-12% ポリアクリルアミドゲル (Bis-Tris SDS NuPAGE ゲル、NOVEX) で分解産物の分離、銀染色を行った。

未変性ゲル電気泳動によるゲルシフトアッセイ

上記プロテアーゼ処理と同じ反応条件で、10ng の RFC を室温で 5 分間インキュベートした。その後、最終濃度 0.1% のグルタルアルデヒド (TAAB laboratories) を加えて室温で 3 分間インキュベートした。10 μ l の未変性ゲル泳動バッファー [0.1M Tris-HCl (pH8.0)、0.1% bromo phenol blue、50% glycerol] を加えて反応を止め、Tris-Glycine バッファー (25mM Tris、192mM glycine、pH8.3) 中の未変性 4% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動、銀染色を行った。

透過型電子顕微鏡による分子構造の観察

電子顕微鏡観察に用いるタンパク質のグルタルアルデヒドによる固定は以下の方法で行った。10mM HEPES-NaOH (pH7.5)、10mM MgCl₂、130mM NaCl、ヌクレオチド未添加、または、1mM の ATP 添加の各条件の反応液 10 μ l 中で約 30ng の RFC を室温で 5 分間インキュベートした後、最終濃度 0.1% のグルタルアルデヒド (TAAB laboratories) を加えて室温で 3 分間インキュベートした。反応は最終濃度 0.1M Tris-HCl (pH7.9) を加えて停止させ、透析バッファー [10mM HEPES-NaOH (pH7.5)、0.01% NP-40、50mM NaCl] に対して VM メンブレン (MILLIPORE、MA、USA) 上で 4 $^{\circ}$ C で 1 時間透析した。PCNA-RFC 複合体の調製も同様の方法で行った。電子顕微鏡観察を行うためのタンパク質に対する低角度回転白金蒸着は、Usukura ら (Usukura et al., 2000) の方法で行った。白金蒸着したサンプルは透過型電子顕微鏡 (H-7100、日立、東京) で観察、撮影した。撮影したフィルムは Polascan 45 フィルムスキャナ (Polaroid、MA、USA) でデジタル化し、Adobe Photoshop (Adobe systems、CA、USA) で大きさの計測等の画像処理を行った。

原子間力顕微鏡による分子構造の観察

原子間力顕微鏡観察に用いるカーボンナノチューブプローブは Nishijima ら

(Nishijima et al., 1999 ; Akita et al., 1999) によって作成された。電子顕微鏡観察と同様の方法で RFC をグルタルアルデヒド固定した後、観察と画像解析は Hohmura ら (Hohmura et al., 2000) の方法で行った。

2-3 結果

プロテアーゼによる部分分解と未変性ゲル電気泳動による RFC の構造変化の解析

予想される構造変化が RFC に起こる際には、RFC を構成する 5 つのサブユニットのコンホメーションが変化すると考えられる。この RFC のコンホメーションの変化を、プロテアーゼに対する感受性の違いとしてとらえようと考えた。そこでトリプシン、Lys-C エンドプロテアーゼを用いて各ヌクレオチドを添加した時の RFC のプロテアーゼに対する感受性の変化を解析した (図 2-1、A)。各 15ng のトリプシン、または、Lys-C エンドプロテアーゼで室温で 60 分間 RFC を処理することで、p140 が完全に消失するのに対し RFC2-5 のバンドはほとんどが処理前と同じであり、p140 が優先的に分解されることがわかった (lane 2-9)。Lys-C エンドプロテアーゼ処理ではヌクレオチド未添加の条件下で、他の条件と比較して RFC2-5 の感受性が高くこれらのバンド強度が減少し、同時にこれらに由来すると考えられる 17kDa と 21kDa のバンドが付加的に現れた (lane 2)。この結果から、RFC の Lys-C エンドプロテアーゼ感受性がヌクレオチド未添加の条件で他の条件とは異なっていることが示された。一方、トリプシン処理では ATP の添加特異的に、他の条件下では見られる p140 に由来したと考えられる 50kDa の位置のバンドが消え、その分解に由来したと考えられる 21kDa の位置のバンドが付加的に現れた (lane 7)。この結果から、RFC のトリプシン感受性が ATP 添加で他の条件とは異なっていることが示された。以上の結果を合わせて考えると、ヌクレオチド未添加、ATP 添加、ATP γ S または ADP 添加の 3 つの条件下でプロテアーゼ感受性が変化するような RFC の構造変化が起きていることが示唆された。

この結果をより強固なものにするため、未変性ゲル電気泳動を用いて各ヌクレオチド添加時の RFC の泳動度の変化を解析した (図 2-1、B)。何も処理しない RFC を未変性ゲルで電気泳動すると RFC はスマアーになった (データ未掲載)。これは泳動中に RFC の分子構造がゆらぐためと考え、電気泳動前にグルタルアルデヒドで化学固定した。この結果、RFC のバンドの検出が可能になった。この条件で、ヌクレオチド添加、未添加の RFC を比較すると、銀染色像およびそのシグナル強度の定量が示すように、ATP を添加した RFC が未添加のものと比較して泳動度が

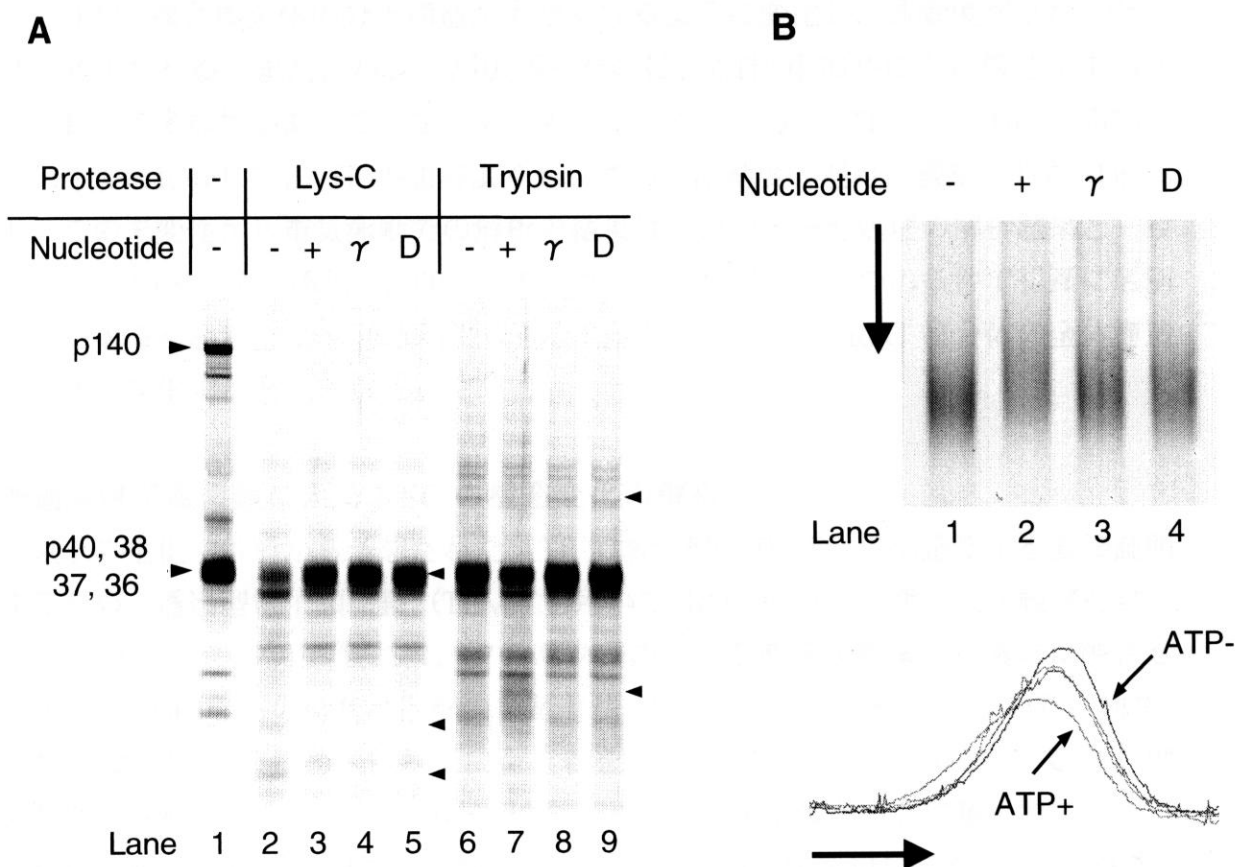


図2-1 RFCのATP依存的な構造変化の生化学解析

(A) Lys-Cエンドプロテアーゼ (lane 2-5)、トリプシン (lane 6-9) によるRFCの部分分解産物の電気泳動。分解前のRFCの各サブユニットの泳動位置をlane 1に示した。この泳動条件で、RFC2-5は分離しない。パネル上部には、部分分解時に添加した各ヌクレオチドを示した。Lys-Cエンドプロテアーゼによる分解で、ヌクレオチド未添加の条件で他の条件とは異なるバンドパターンが確認できた位置をlane 5の左側に矢印で示した。同様に、トリプシンによる分解でATP添加の条件で他の条件とは異なるバンドパターンが確認できた位置をlane 9の左側に矢印で示した。(B) 未変性ゲル電気泳動による、各ヌクレオチド添加時のRFCの泳動度の比較。パネル上部にしめしたヌクレオチド未添加、添加の条件下でRFCをグルタルアルデヒド固定した後、未変性ゲルで電気泳動を行った。また、このバンド強度にもとづいた泳動プロファイルパネル下部に示した。ヌクレオチド未添加、ATP、ATP γ S、ADP添加の各条件の泳動プロファイルはそれぞれ黒、赤、緑、青で示した。ATP添加の条件でバンドが上部にシフトした結果から、ATPの添加によりRFCが大きくなる構造変化が起きたことが示された。図中の-、+、 γ 、Dはそれぞれヌクレオチド未添加、ATP、ATP γ S、ADP添加を示す。パネルBの矢印は泳動方向を示す。

遅くなり、また、バンドが広がる傾向がみられた (lane 2)。これは、ATP 添加により RFC 複合体全体の分子構造が大きくなるように変化し、泳動度が下がったためと考えられる。また、バンドが広がったのは、ATP 添加時にとる構造が未添加と比較して多様性があることを示すと考えられる。一方、ATP γ S、ADP の添加でも未添加と比較して、ATP 添加時よりも小さいが泳動度の遅れが観察された (lane 3, 4)。この未変性ゲル電気泳動での解析の結果はプロテアーゼ処理の解析結果と一致し、ATP の未添加、添加、ATP γ S または ADP 添加時の 3 つの条件で相互に区別できる構造をとり、ATP 添加時には他と比較して明らかに RFC 複合体の全体構造が大きく変化すると考えられる。

透過型電子顕微鏡による RFC の構造変化の解析

以上の生化学解析から予想された ATP 加水分解時の RFC の構造変化を直接証明するため、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて RFC の分子形態の直接観察を試みた。TEM のサンプル調製には、タンパク質の分子形態を観察像に正確に反映させるため、Usukura らの低角度回転白金蒸着法 (Usukura et al., 2000) を用いた。通常、TEM で観察を行うための試料に白金蒸着を行う場合、サンプル面に対して 6-7 度の角度から蒸着するが、この方法ではタンパク質分子全体が白金に覆われてしまうためにその分子形状は観察できない。実際に、この方法を用いて行われた PCNA と RFC の観察では、これらの分子は単なる粒子の固まりとしか観察されていない (Podust et al., 1995 ; Keller et al., 1999)。これに対し、本解析で用いた低角度回転白金蒸着法はサンプル面に対して 2 度という低角度から蒸着を行うために、白金は主にサンプルの側面に蒸着されて分子の形状を強調させて観察することができる。また、分子の形状の電子顕微鏡観察に良く用いられる負染色法と比較して、高いコントラストで分子イメージを観察できるメリットがある。実際にこの方法を用いて、DNA 複製開始に機能する分裂酵母の MCM 複合体が解析され、その中央に穴をもつリング構造が明らかにされている (Adachi et al., 1997)。

はじめにこの方法を用いて、X 線結晶構造解析でそのすでにその構造が明らかにされている PCNA (Krishna et al., 1994) について解析した (図 2-2)。低倍率の観察では均一な大きさの単粒子が観察でき (図 1-2, A)、その直径は $18 \pm 1.8 \text{ nm}$ ($n=190$) と計測された。X 線結晶解析から推測された PCNA の直径は 8nm なので、白金蒸着のために約 2.3 倍の大きさの像として観察された。さらに、高倍率の観察では、PCNA のサブユニットに相当すると考えられる 3 つのユニットから成るリング構造を明確に観察できた (図 2-2, B-D)。これは低角度回転白金蒸着と TEM による分子形状観察が、分子量 100kDa 程度の蛋白質の構造の解析に十分な分解能を有することを示している。

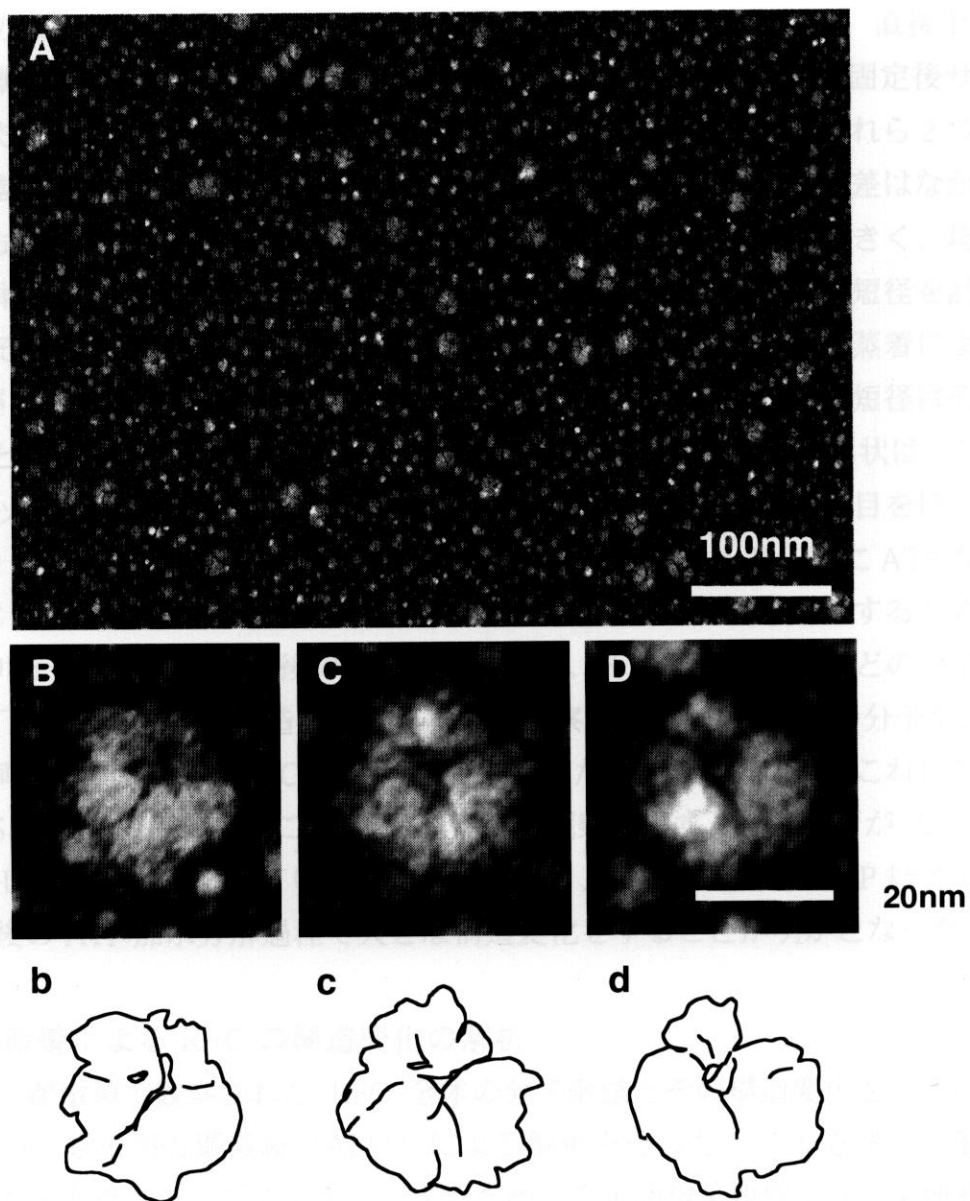


図2-2 低角度回転白金蒸着にもとづいたPCNAの透過型電子顕微鏡（TEM）観察

（A）低角度回転白金蒸着したPCNAの低倍率での代表的な観察像。（B-D）高倍率でのPCNAの観察像。B-Dの観察像の輪郭を型取りしたものを、b-dとして示した。

次にこの方法で、ATP 非存在下の RFC の観察を行った。この際には、直接 RFC のサンプル調製を行ったものと (図 2-3)、グルタルアルデヒドによる固定後サンプル調製したもの (図 2-4、A-I) の双方の観察を行った。この結果、これら 2 つのサンプル調製条件での観察像でタンパク質分子の大きさ、形状に大きな差はなかった。双方の試料での観察での低倍率の観察で、RFC は PCNA よりも大きく、均一で楕円状の単粒子として観察できた (図 2-3、A)。この粒子像の長径と短径を計測した結果、それぞれ $33 \pm 3.2 \text{ nm}$ と $28 \pm 2.9 \text{ nm}$ ($n=183$) であった。白金蒸着によって PCNA が 2.3 倍に観察されることから、RFC の実際の分子の長径と短径はそれぞれ 15nm と 12nm と推測された。次に、高倍率での観察した RFC の形状は、5 つのサブユニットがリング状に並んだ形態をとり、その長軸に沿って切れ目を持つ構造 (U 字型) をとることが明かとなった (図 1-3 B-D、図 1-4 A-I)。次に ATP 存在下での RFC を観察した。この時は予想される一時的な構造変化を観察するため、グルタルアルデヒドによる固定後の試料を観察した。その結果、ほとんどの分子が ATP 非存在下と同じ U 字型構造をしている中、観察数 192 個中 16 個の分子が、U 字型構造が両側に開いた構造 (C 字型) をとっていた (図 1-4、J-N)。これに対して、ATP γ S、ADP の添加ではこの C 字型構造は観察できず、ほとんどが ATP 未添加と同じ U 字型構造をとっていた。このことから、RFC は単なる ATP 結合ではなく、その後の ATP 加水分解過程で大きな構造変化をすることが明かとなった。

原子間力顕微鏡による RFC の構造変化の解析

次に、電子顕微鏡で観察された RFC 全体の分子形態とその構造変化をさらに明確にするため、原子間力顕微鏡 (AFM) による解析を行った。この方法は、溶液中の分子を直接走査プローブでスキャンするため、電子顕微鏡観察よりも生理的条件下に近い分子形態の観察が可能である (Shao et al., 1995)。さらに AFM では、TEM では得られない分子の高さの情報を得ることができ、分子の立体形状を捉えることが可能である。はじめに、AFM で一般に用いられるシリコン結晶の走査プローブ (図 2-5、A) で PCNA の観察を行った。その結果、円盤状の分子形態が観察できたが、その解像度は電子顕微鏡での観察には及ばなかった (図 2-5、D)。そこで、AFM の解像度を高めるため、カーボンナノチューブを走査プローブに用いた (図 2-5、B と C)。このカーボンナノチューブの直径は約 5nm であり、一般に用いられる走査プローブ (約 15-20nm) よりも細く、より高い解像度が期待できた。このプローブによる PCNA の観察の結果、電子顕微鏡観察の結果と同様に、中央に穴を持つ 3 つのユニットから成るリング構造が観察できた (図 2-5、E-G)。そこで同様の方法で ATP 非存在下でグルタルアルデヒド固定した RFC の観察を行った。まず、広範囲のスキャンでは単一の大きさにそろった粒子として RFC が観察された (図

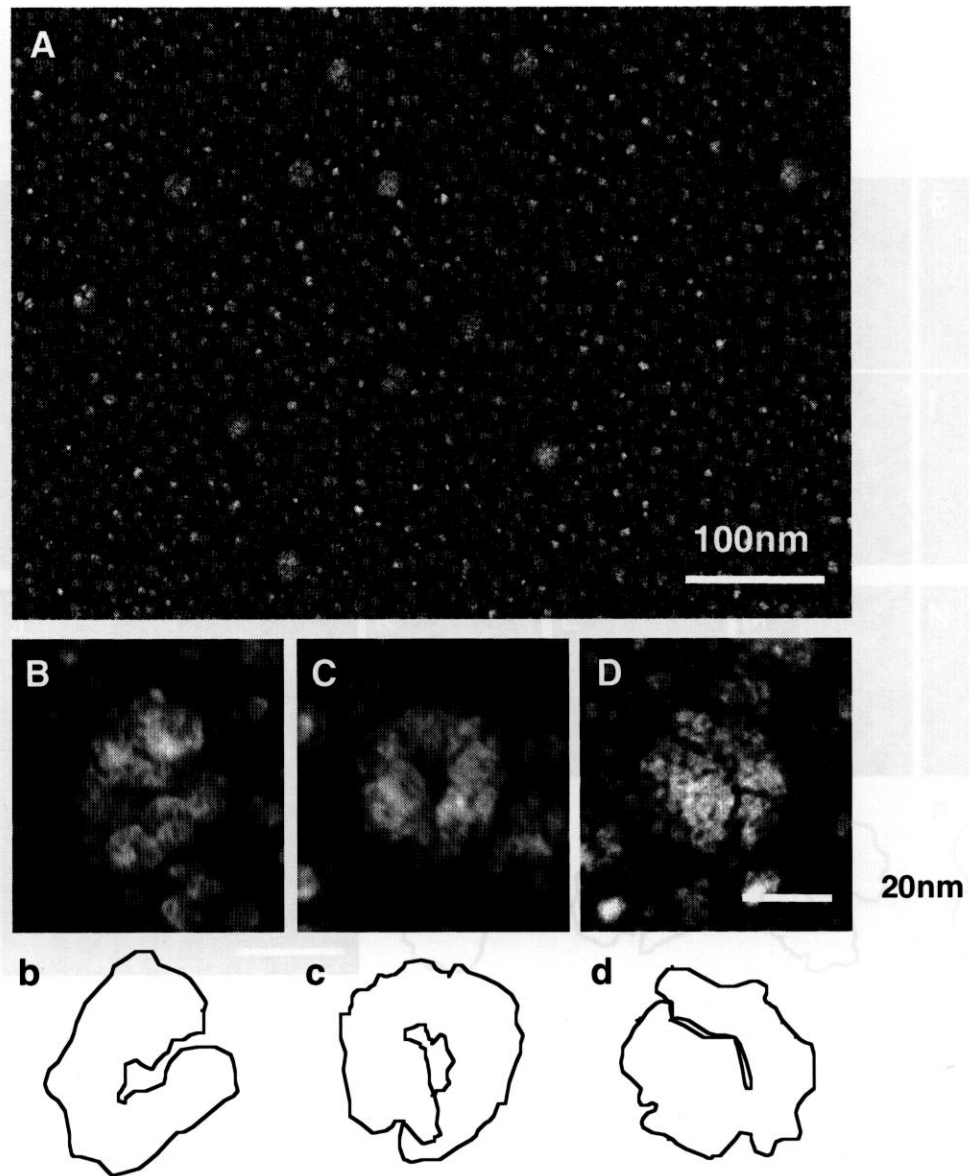


図2-3 低角度回転白金蒸着による、RFCのATP非存在下でのTEM観察

ATP非存在下でのRFCを低角度回転白金蒸着した、低倍率（A）と高倍率（B-D）での代表的な観察像。B-Dの観察像の輪郭を型取りしたものをb-dとして示した。

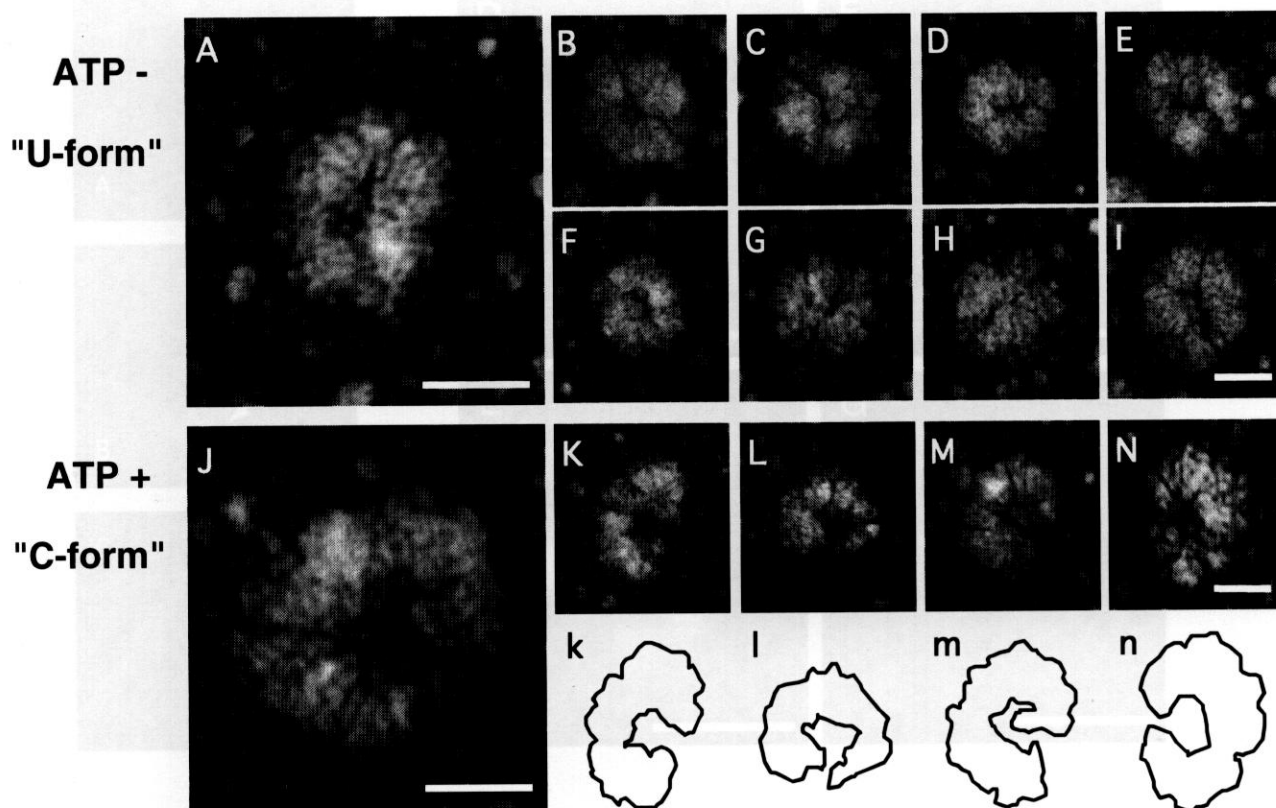


図2-4 RFCのATP非存在下、存在下でのTEM観察像の比較

ATP非存在下 (A-I)、存在下 (J-N) でRFCをグルタルアルデヒドで固定した後、それぞれ低角度回転白金蒸着したRFCの代表的な観察像。K-Nの観察像の輪郭を型取りしたものをk-nとして示した。スケールバーは20nm。

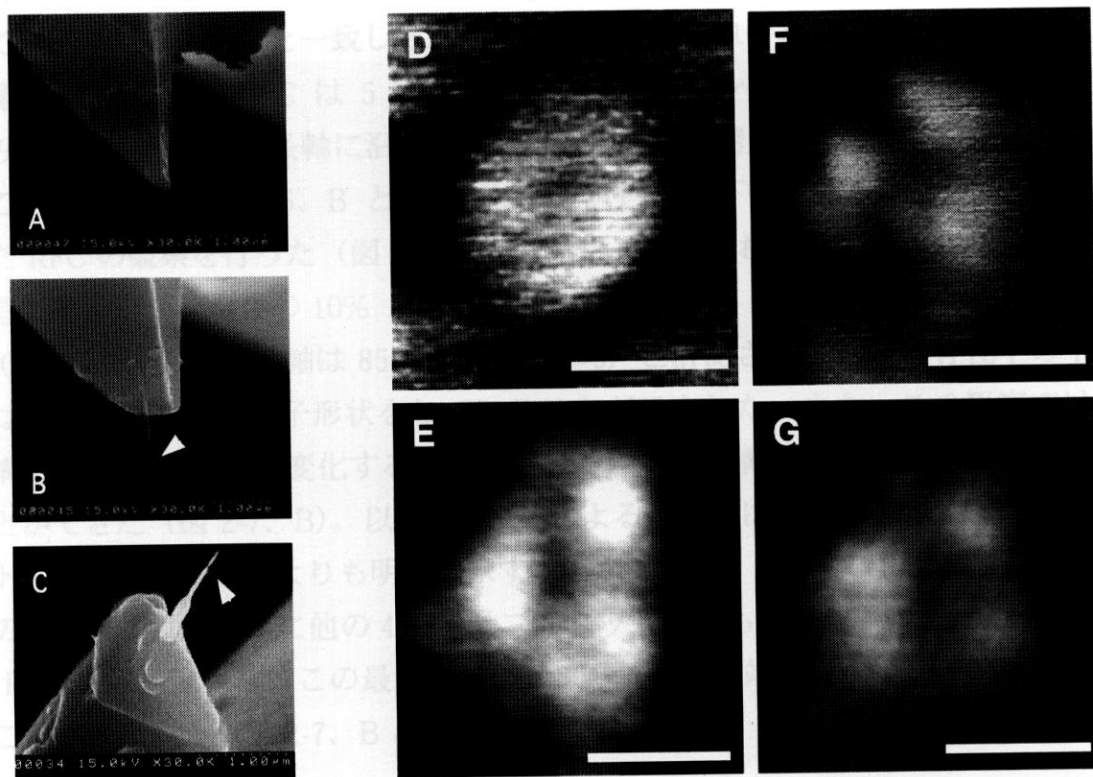


図2-5 原子間力顕微鏡（AFM）によるPCNAの観察

AFMで一般的に用いられる、シリコン結晶で作製された走査プローブ（A、 $\phi=20\text{nm}$ ）と、カーボンナノチューブで作製された走査プローブ（BとCの矢印、 $\phi=5\text{nm}$ ）の走査型電子顕微鏡写真。シリコン結晶走査プローブで観察したPCNA（D）とカーボンナノチューブ走査プローブで観察したPCNA（E-G）。スケールバーは20nm。

2-6, A)。この粒子像の長径は、 $59.0 \pm 7.0 \text{ nm}$ ($n=98$) と計測された。この長さは、電子顕微鏡解析結果から推測された RFC の実際の長径 15 nm の分子を、約 5 nm の走査プローブを用いて観察した時に Takeyasu ら (Takeyasu et al., 1996) の方法に従って求められる予測値と一致した。これらの粒子をそれぞれ個別にスキャンした高解像度の観察像で、RFC は 5 つのサブユニットがリング状にならび、電顕観察でもみられたようにその長軸に沿って切れ目を持つ分子構造を形成していることを示すことができた (図 2-6, B と C)。次に、ATP 存在下でグルタルアルデヒド固定した RFC の観察を行った (図 2-7)。この結果、観察される分子のほとんどが U 字構造であったが、全体の 10% (観察数 50 個中 5 個) が C 字構造をとっていた。この C 字構造の最も長い軸は $85.1 \pm 1.9 \text{ nm}$ ($n=5$) と計測され、ATP 非存在下の RFC とは明らかに異なる分子形状をしていることが示された。また、この観察では U 字構造から C 字構造に変化する途中段階と考えられる構造を示す RFC も観察することができた (図 2-7, B)。以上の AFM による観察では、RFC の 5 つのサブユニットの配置を電顕観察よりも明確に示すことができた。さらに、5 つのサブユニットの内の 1 つは明らかに他の 4 つのサブユニットよりも大きく観察され、C 字構造の RFC の観察像からはこの最も大きいサブユニットが端から 2 番目に位置していることが示された (図 2-7, B と D)。

PCNA-RFC 複合体の構造解析

以上の生化学解析と TEM、AFM による分子の直接観察による構造解析の結果から、RFC の ATP 加水分解依存的な構造変化が明確に示された。そこで、次にこの RFC の U 字型から C 字型への構造変化が、PCNA ローディング機構でどのように機能するのかを明らかにするため、PCNA-RFC 複合体の電子顕微鏡観察を行った (図 2-8)。この観察は PCNA と RFC を混合し、それぞれ ATP 非存在下、存在下でグルタルアルデヒド固定したものをを用いた。その結果、それぞれの条件下で PCNA 単独、RFC 単独の観察でみられたものよりも明らかに大きな分子が存在した (図 2-8, A と D)。したがって、これが PCNA-RFC 複合体と考えられた。これらの分子の長径と短径は ATP 未添加で $37.1 \pm 2.9 \text{ nm}$ と $28.9 \pm 4.9 \text{ nm}$ ($n=10$, 図 2-8, B と C)、ATP 添加で $44.2 \pm 3.7 \text{ nm}$ と $28.9 \pm 3.6 \text{ nm}$ ($n=10$, 図 2-8, E と F) と計測され、ATP 非存在下と存在下で異なる形状の複合体を形成していることが推測された。それぞれの条件で観察した PCNA と RFC の複合体と考えられる分子イメージは、このままではどの部分が PCNA であり、どれが RFC であるのか明確に示すことができないが、この分子イメージの輪郭を RFC 単独で観察した分子イメージの輪郭とを重ね合わせて比較することで、それぞれの区分を推定することができた。ATP 未添加の PCNA-RFC 複合体の輪郭像の一部に対して、RFC の U 字型構造を重ねることがで

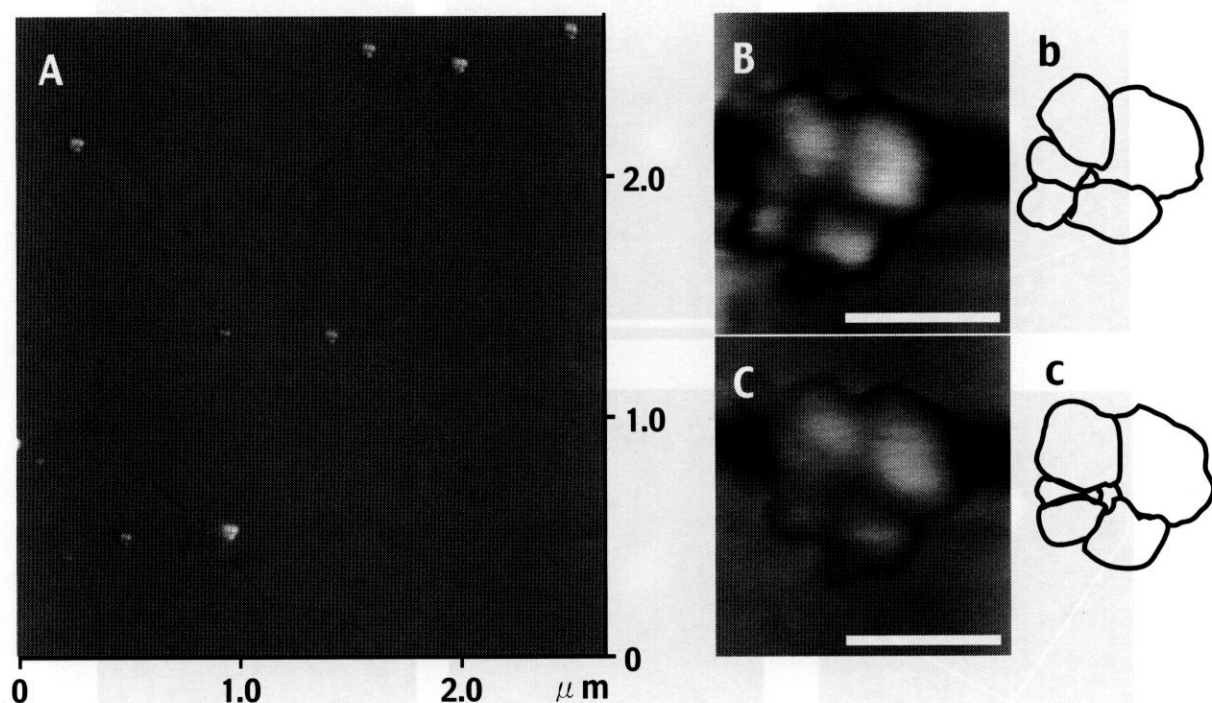


図2-6 AFMによるATP非存在下でのRFCの観察

ATP非存在下でグルタルアルデヒド固定したRFCの、カーボンナノチューブ走査プローブでのAFM観察。(A) 広範囲のスキャンの代表的な観察イメージ。(BとC) RFCの高倍率での代表的な観察イメージ。BとCの観察像の輪郭を型取りしたものをbとcとして示した。スケールバーは50nm。

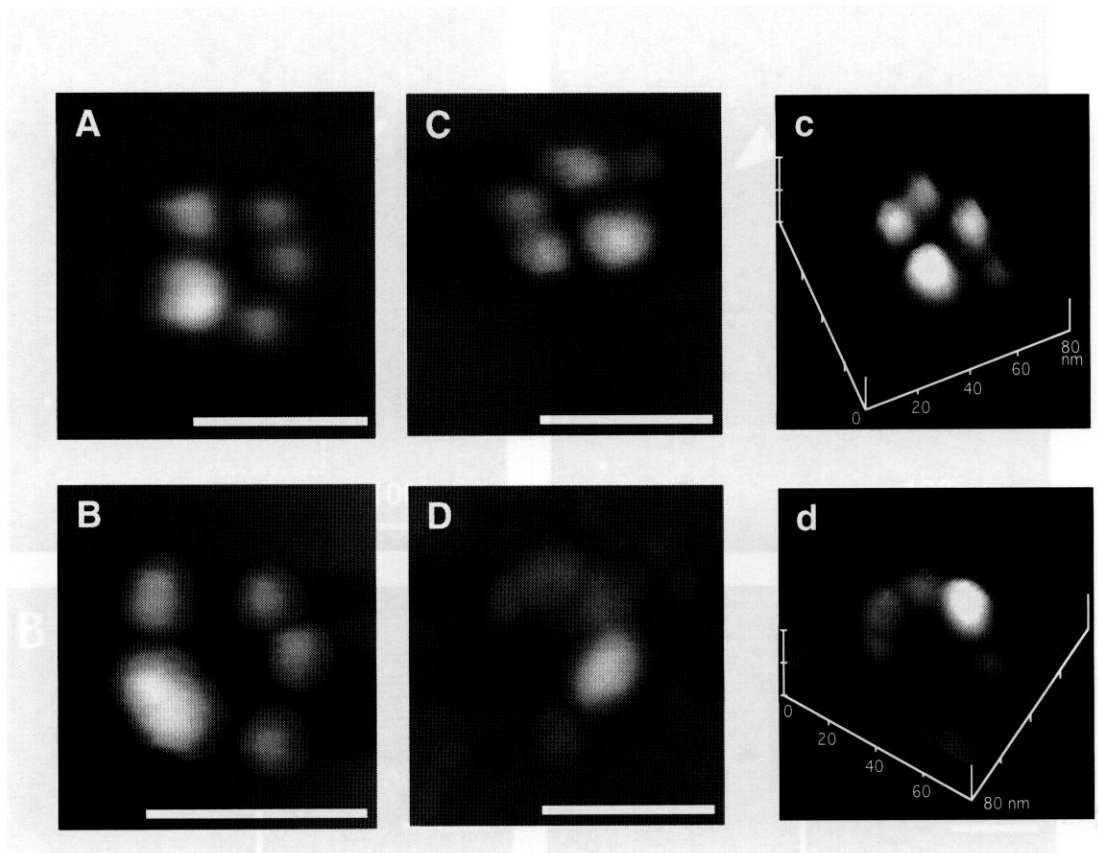


図2-7 AFMによるATP存在下でのRFCの観察

RFCをATP存在下でグルタルアルデヒド固定し、カーボンナノチューブプローブで観察を行った。この観察で見い出されたRFCのU字型構造（AとC）とC字型構造（D）、およびU字型からC字型に変化する中間体と考えられる構造（B）。CとDについては、立体表示したものをcとdとして示した。スケールバーは50nm。

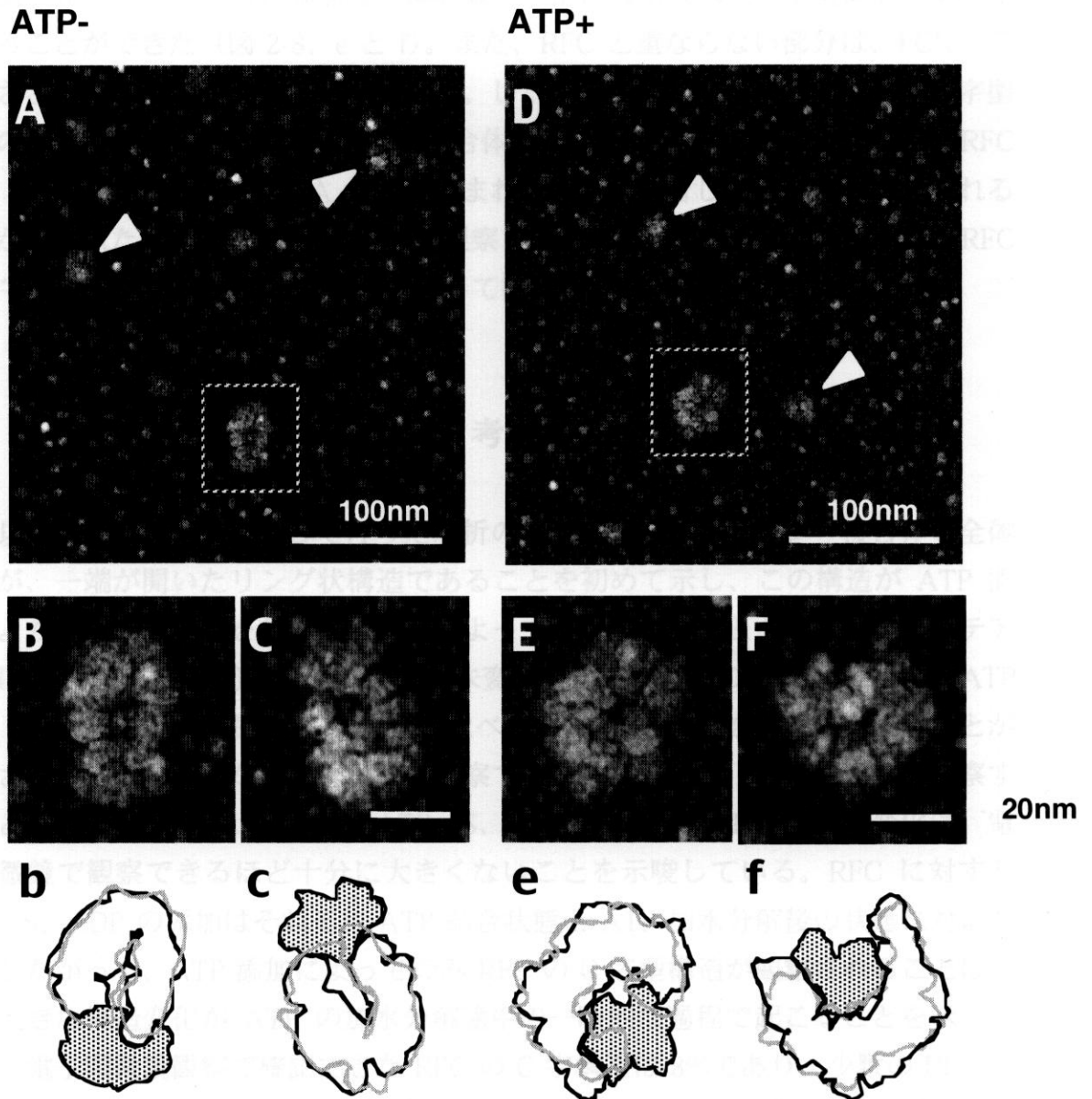


図2-8 PCNA-RFC複合体のATP非存在下、存在下でのTEM観察像の比較

PCNAとRFCをATP非存在下(A)、存在下(D)でグルタルアルデヒド固定を行った後、それぞれ低角度回転白金蒸着したサンプルの低倍率での代表的な観察像。矢印はその大きさと形態からPCNA単独と判断できるものを示す。観察像には、この単独で存在するPCNAよりも明らかに大きな図中の破線で囲んだ構造体を確認でき、これがPCNA-RFC複合体であると考えられた。PCNA-RFC複合体の高倍率での観察像(BとC; ATP非存在下、EとF; ATP存在下)と、これらの輪郭を型取ったものをそれぞれbとc、eとfで示した。この複合体中で大きさ、形態からPCNAと考えられるものを影付けして、RFCに相当するもの実線で示した。また、RFC単独の観察で見られたRFCのU字構造(図1-4のBとD)の輪郭線をbとcに、RFCのC字構造(図1-4のJ)の輪郭線をeとfに重ね合わせて灰色で示した。

き (図 2-8、b と c)、ATP 添加時の輪郭像の一部には RFC の C 字型構造を重ね合わせることができた (図 2-8、e と f)。また、RFC と重ならない部分は、PCNA の大きさと形状に対応させることができた。したがって、ATP 非存在下では U 字型構造の RFC の先に PCNA が結合した複合体を形成し、ATP 添加時には開いた RFC の C 字型構造の中央に PCNA が包み込まれるように結合した複合体が形成されることが示された。また、ATP 存在下で観察された PCNA-RFC 複合体は全て、RFC の C 字構造に PCNA が結合したものとして観察された。

2-4 考察

以上の RFC を対象として行った解析の結果、クランプローダー複合体の全体構造が、一端が開いたリング状構造であることを初めて示し、この構造が ATP 添加により変化することを分子構造観察によって直接に示すことができた。プロテアーゼによる RFC の部分分解、および、未変性ゲル電気泳動の解析結果からは ATP γ S、ADP の添加時にも ATP 未添加に比べ RFC は構造変化を起こしていることが示唆された。しかしながら、分子構造観察ではこれらの条件下で構造変化を観察することはできなかった。これは、ATP γ S、ADP 添加時の RFC の構造変化は、電子顕微鏡で観察できるほど十分に大きくないことを示唆している。RFC に対する ATP γ S、ADP の添加はそれぞれ ATP 結合状態と ATP 加水分解後の状態に対応する。したがって、ATP 添加によってのみ RFC の C 字型構造が観察されることは、この大きな構造変化が ATP の加水分解途中の一時的な過程で起こることを示している。電子顕微鏡観察で確認できた RFC の C 字構造は 8%であり、少数の RFC しか構造変化を起こしていないようにも考えられるが、これは明確に C 字型と判断できるものしかカウントしておらず、構造変化の割合を過少評価していると思われる。実際に、ATP 添加時には U 字構造とは異なるあいまいなイメージが全体の半数近く観察されている。この結果は、RFC の ATP 加水分解時の構造変化が、その加水分解の程度に応じて段階的に起きていることを示している。実際に、ATP 存在下での AFM による観察結果からは、その多くが U 字型構造であり (図 2-7、A と C)、明らかに C 字型と呼べる構造 (図 2-7、D) は電子顕微鏡観察結果に対応して 10%であった。しかしながら、これら 2 つの構造に混じって U 字型から C 字型へ変化する途中段階 (あるいは、ATP 加水分解が完了する途中の C 字型から U 字型へもどる段階) の RFC が観察された (図 2-7、B)。この結果は、RFC の構造変化が ATP 加水分解の程度に応じて段階的に起きている、という電子顕微鏡観察結果から考えられる RFC の ATP 加水分解依存的な構造変化のモデルを強く支持す

る。

では、この ATP 加水分解時に特徴的な RFC の構造変化はどのような機構によるものか。これは、 β クランプのローダーとしての構造と機能が明かとなってきた、大腸菌の γ 複合体を例に考えることができる (図 2-9)。 γ 複合体は γ 、 δ 、 δ' 、 χ 、 ψ の 5 種類のサブユニットで形成される (Kelman and O'Donnell, 1995)。この中の χ サブユニットは一本鎖結合タンパク質との結合、 ψ サブユニットは χ サブユニットと γ サブユニットとの結合の仲介に関与し (Onrust and O'Donnell, 1993)、実際に β クランプのローダーとして機能するのは δ' 、3 つの γ 、 δ サブユニットで構成される 5 量体 ($\delta'-\gamma_3-\delta$) である。この γ 複合体 5 量体の各サブユニットは AAA+クラス ATPase に保存されている、ATP の結合と加水分解にかかわる Walker モチーフ、センサー1 モチーフとセンサー2 モチーフを持ち、それぞれのサブユニットのカルボキシル末端で δ' 、3 つの γ 、 δ の順で結合し全体としてリング状の構造をとる (O'Donnell et al., 2001)。この時、一つのサブユニットの Walker モチーフとそれと隣り合ったサブユニットのセンサー1 モチーフが組み合わさって ATP 結合部位を形成する。これらのモチーフの保存状態が各サブユニット間で異なっており、 $\delta'-\gamma_3$ の間に 3 つの ATP 結合部位しか形成されない。通常この 3 つのうち、 δ' と γ サブユニットから成る 1 番目のものだけが ATP 結合部位を露出しており、ここに ATP が結合することで γ 複合体構造に変化が生じ、2 番目、3 番目の ATP 結合部位が露出し ATP の結合と構造変化がおこる。これにより、 γ 複合体内部に隠れていた唯一 β クランプと結合できる δ サブユニットが露出して β クランプを開き、 γ 複合体の DNA 結合活性によりプライマー/鋳型 DNA にクランプが運ばれる。この時、DNA 依存的に γ 複合体は結合していた ATP を同時に (Turner et al., 1999 ; Bertram et al., 2000) [または段階的に (Hingorani et al., 1999)] 分解し、ADP 結合状態の γ 複合体が β クランプから解離すると考えられている。このモデルから、 δ' サブユニットが ATP 結合を開始する機能を持ち、3 つの γ サブユニットは構造変化を起こすモーター、そして直接 β クランプと結合する δ サブユニットはクランプのリングを開くレンチとして機能すると考えられている。

この γ 複合体のモデルを、保存されているモチーフをもとに真核生物の RFC に当てはめて考えると (図 2-9)、5 つのサブユニットが p38-p37-p36-p40-p140 の順序で並び (Uhlmann et al., 1996 ; Podust and Fanning, 1997 ; Ellison and Stillman, 1998)、モーター部が p40、p37 と p36 で、PCNA レンチに相当するのが p140、そして ATP 結合反応の開始役が p38 と考えられている。しかしながら、 γ 複合体と異なる点として、RFC の ATP 結合部位は p140-p40 間 (γ 複合体の γ - δ 間に相当) にも保持されており全部で 4 つ存在する、また、p140 の他にヒトでは p40、p38、p36 も PCNA と結合する [酵母では RFC2 (ヒト p37 に相当) と PCNA との結合が報告されてい

γ 複合体

RFC

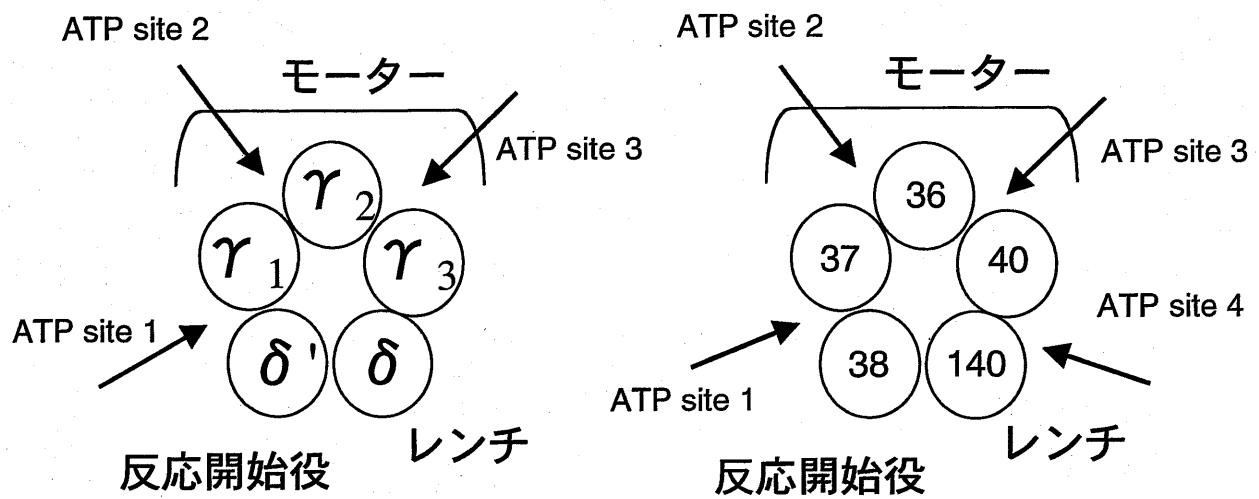


図2-9 γ 複合体の構造解析から明らかになった、構造変化を伴うATP結合と加水分解機構のモデルと、これから類推されるRFCの反応機構。詳細は本文参照。

る (Mossi et al., 1997 ; Mossi and Hubscher, 1998)], など γ 複合体からの予測だけでは説明できない違いもあり、全く同じ機構で RFC が PCNA クランプの開環に機能しているかどうかは不明である。したがって、RFC の詳細な全体構造と ATP 加水分解依存的な構造変化の機構を明らかにするためにはさらに解析を進めていく必要がある。

PCNA-RFC 複合体の観察結果からは、ATP の非存在下で RFC の U 字構造に PCNA が結合しており、ATP の添加時には開いた C 字構造の RFC に PCNA が包み込まれるように結合することが明らかとなった。この結果からは、ATP 非存在下、存在下での PCNA-RFC が異なる結合様式で複合体を形成することが示された。また、ATP 存在下での PCNA-RFC 複合体は全て RFC の C 字構造に PCNA が結合したものであり、RFC の U 字構造はみられなかった。このことから、加水分解途中の RFC の C 字構造に PCNA が結合した状態で、標的となるプライマー／鋳型 DNA への PCNA ローディングを待機していると推測される。実際に、RFC の ATPase 活性は、PCNA の存在で阻害を受けるが、DNA が同時に存在することで促進される。この複合体の観察では、電子顕微鏡の解像度の限界のために PCNA が実際に開いた状態になっている像を示すことができなかったが、以上の結果とこれまでに明らかにされているクランプローダーの ATP 加水分解の反応機構を総合すると以下のような RFC による PCNA のローディング機構のモデルが考えられる (図 2-10)。

(1) 一端が開いたリング構造を持つ RFC が、その切れ目の部分で PCNA と結合する。この PCNA-RFC 複合体形成は、ATP 結合とは無関係に起こる。ATP 結合反応開始役の p38 に ATP が結合することで RFC の全体構造に変化が起こり RFC のモーターである p37-p36-p40-p140 の間に存在する 2、3、4 番目の ATP 結合部位が露出し、ATP 結合が起こる。この RFC の ATP 結合状態 (ATP γ S) での PCNA も DNA のプライマー／鋳型 DNA への結合が可能であるが、この PCNA はクランプとして機能することができない (Tsurimoto and Stillman, 1991)。したがって、機能的クランプの形成には ATP の加水分解が重要な役割をする。ATP 存在下で観察した PCNA-RFC 複合体は、観察数が 10 個と少ないが、全てが RFC の C 字型に PCNA が結合した状態であった。この RFC の C 字型は、RFC 単独の観察でも ATP 存在下で観察できるので、RFC の U 字構造が大きく C 字型に変化する過程には、ATPase 活性を促進する DNA は要求されない。また、RFC の ATPase 活性は PCNA の存在で阻害を受けることから、RFC に結合した ATP のうちの幾つかが加水分解された状態で一時的に段階的な加水分解反応が停止する。この状態こそが、ATP 存在下で PCNA は C 時型 RFC にしか結合していないことを示していると考えられる。RFC の U 字型から C 字型構造への大きな変化が起こり、(2) RFC と結合した PCNA リングが開かれる。リングが開かれた PCNA は RFC の C 字型構造に安定に保持され、

次に、(3) RFC のプライマー3'末端特異的な DNA 結合活性によって、PCNA リング内部へ鋳型 DNA が導かれる。このとき、DNA 依存的に ATPase 活性が促進され、結合していた ATP はすべて加水分解される。ATP 加水分解後の RFC は U 字型に構造を復帰させ、(4) 最後に DNA ポリメラーゼ δ が PCNA と複合体を形成して DNA 合成を開始するというクランプ・クランプローダー反応機構が考えられる。

この解析で得られた電子顕微鏡、原子間力顕微鏡による RFC の 5 つのサブユニットのリング状の配置は、前述の γ 複合体との類似性から予想できる RFC のリング構造と良く一致する。しかし、予想される 5 つのサブユニットの並びは、私の解析結果とは異なっている。AFM による ATP 存在下での観察結果からは、RFC の p140 が C 字型に並ぶサブユニットの端から 2 番目に位置していると考えられたが(図 2-7、D)、 γ 複合体から予測される RFC のサブユニットの並びでは、リングが開いた時の C 字型の端に p140 が位置している。また、出芽酵母の解析では RFC と同じ AAA+ クラス ATPase ファミリーに属し、特徴的なリング構造を形成する NFS (N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein) 6 量体の中でのサブユニット配置から RFC のサブユニット配置を予測している (Beckwith and McAlear, 2000)。NFS は RFC サブユニット間に高度に保存される、ATP 結合と加水分解に関わる Walker A、B モチーフを含む RFC box III-VII を持つ。NFS の立体構造はすでに決定されており (Yu et al., 1998)、リング状に配置したサブユニットの、ATP 結合と加水分解を行う RFC box III、IV の 3 次元配置が明らかにされている。これによると、サブユニットどうしのつなぎ目に位置する部分に ATP 結合部位が配置しており、このことから RFC でも ATP 結合部位が同様の配置をとることが予測された。これは γ 複合体の立体構造解析で明らかにされた事実と一致する (Jeruzalmi et al., 2001)。これと合わせて、遺伝学的な RFC サブユニットの相互関係から大サブユニット RFC1 が開いたリングの端に位置すると予測している。以上のことから、大腸菌、出芽酵母で示されたようにヒト RFC でも p140 が端に位置すると考えるのが適しているといえる。では、AFM での観察結果をどのように解釈するか。AFM 観察で RFC は 5 つの球形のサブユニットが並んでリングを形成している様子が容易に想像でき、中でも唯一大きく観察できるユニットが p140 であるとイメージしやすい。しかしながら、高さがあって大きく観察できたものが、そのまま大きな体積を持つとは限らない。AFM は操作プローブを小刻みに上下に振りながら、観察対象物をタッピングしてその立体構造を描写する。この時、体積は小さなものでも 3 次元空間の高い位置に存在していれば、それは高さのある大きなものとして捉えてしまう。また、RFC の観察イメージでは 5 つの丸いサブユニットが同一平面状に並んでいると捉えがちになるが、実際には RFC はより複雑な立体構造を持つと予想される。 γ 複合体は δ' と δ サブユニットが 1 つずつと、3 つの γ サブユニットから成るが、これらの

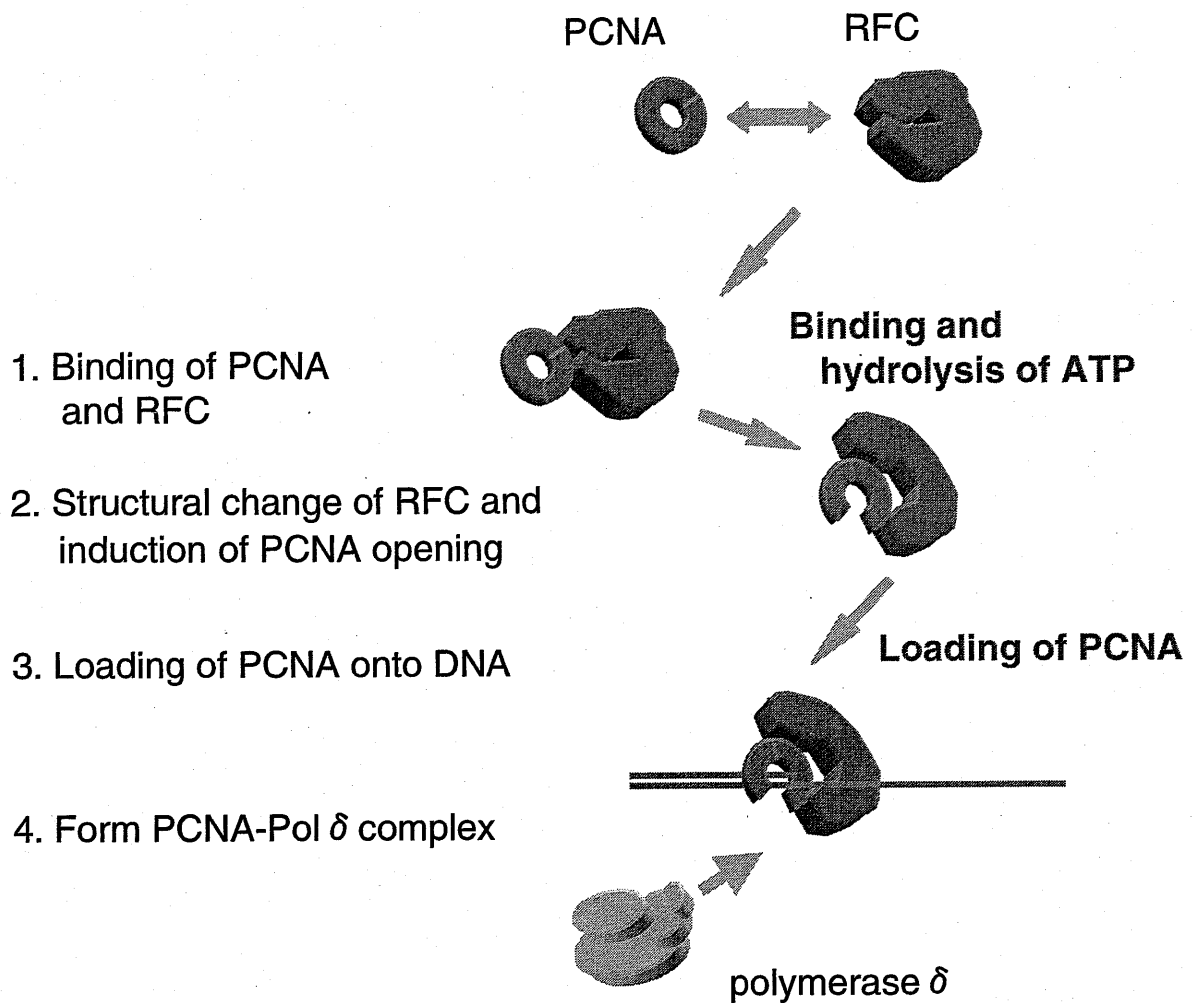


図2-10 RFCの構造変化にもとづいた、PCNAローディング機構のモデル

(1) PCNAとRFC がATP非存在下で複合体を形成する。(2) RFCにATPが結合し、加水分解される過程で構造変化が起こる。この構造変化がPCNAリングを開く駆動力となる。(3) RFCのプライマー3'末端結合活性により、開環したPCNAがDNA上に運ばれてロードされる。(4) ロードされたPCNAに対してポリメラーゼ δ が結合し、DNA合成が開始される。

サブユニットはいずれもバナナのような立体構造を持つ。そしてこれらの C 末端どうしが結合して γ 複合体を形成するのだが、それはちょうど半開きの傘のような立体構造をとっている。このことから、RFC もこのような立体構造の複合体であることが予想でき、かならずしも 5 つのサブユニットが同一平面状ではなく、部分的には重なりあったりしてより複雑な空間配置がされていると考えられる。したがって、AFM での観察イメージでは、例えば p140 が平らで細長い形状でリングの端に位置していても、これと結合する p40 がより球形に近く、p140 の上に重なるように配置していれば、その 2 番目のサブユニットが一番大きく見えてしまう可能性がある。したがって、本研究のように分子を直接に観察したうえで、サブユニットの配置などを明らかにしたい場合は金粒子による特定部位の標識や、認識したいユニットに特異的なモノクローナル抗体を結合させるなど、何らかの分子標識が必要であると考えられる。

第 3 章

新規クランプ・クランプローダー系タンパク質発現系の構築と、 複合体形成

3-1 序

DNA 複製で機能する PCNA-RFC を研究対象として、クランプローダーによるクランプの DNA へのローディング機構の解析を行った。その結果、RFC が U 字型の複合体であること、およびその構造が ATP 加水分解依存的に変化することを示し、リング構造の PCNA が結合した RFC の構造変化を駆動力として一時的に開環し DNA にローディングされる機構が説明された。このようなクランプ・クランプローダーによる反応機構は DNA 複製に特有なものと考えられていたが、最近 PCNA や RFC の類縁のタンパク質の存在が報告された。

PCNA の類縁タンパク質としてヒト Rad9、Hus1、Rad1 があり、これらが複合体を形成して Rad9/Hus1/Rad1 (Rad9-1-1)クランプとなってチェックポイント応答の経路で機能すると考えられた。一方、同じチェックポイント経路に属するヒト RAD17、DNA 複製後の姉妹染色体接着に必須なヒト CHL12 は RFC 類縁タンパク質をコードし、いずれも RFC2-5 と共に Rad17-RFC、Chl12-RFC と呼べる複合体を形成することが示唆された。このアミノ酸配列の相同性から予測された新規クランプ・クランプローダーの機能を具体的に示すため、まず、これらの再構成系を作製した。

精製法の確立している RFC に対して、他のクランプローダー様複合体である Rad17-RFC と Chl12-RFC の精製には、RFC の精製に用いた PCNA アフィニティークロマトグラフィーが使えない。したがって、これらはタグによるアフィニティークロマトグラフィーを行うことにした。そこでまず、RFC についてタグ付き p140 サブユニットを加えた発現系の構築を行った。これまでに p140 サブユニットの N 末端にそれぞれ His タグ、HA タグを付加したヒト RFC の精製が報告されており、これらは生化学的にも RFC として機能することが示されている (Cai et al., 1996; Ellison and stillman, 1998)。これと同様に Rad17、Chl12 についてもそれぞれの N 末端に FLAG タグを付加した。

3-1 材料と方法

FLAG-RFC 発現系の構築

FLAG タグを付加した p140 の構築は、以下の方法で行った。FLAG エピトープ

の配列と p140 の開始コドンとを連結したプライマー（5'-CCCCCGGGACCATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGATGGACATTTCGGAAA TTCTTTGG-3'、FLAG エピトープ配列上流に SmaI サイトを含む）と、ATG より 0.9Kbp 下流の SacI サイトを含む配列のプライマー（5'-CTCGGACACCGGAGTTTTTC-3'）を用いて、pBacPAK9-p140 を鋳型として PCR を行った。得られた 0.9Kbp の断片を SmaI、SacI で制限酵素処理し、同じ制限酵素処理で pBacPAK9-p140 から SmaI-SacI サイトを欠失させた領域に挿入して pBacPAK9-FLAG-p140 を得た。挿入配列に変異のないことを確認した後、BacPAK Baculovirus Expression System (CLONTECH) を用いて FLAG-p140 が組み込まれたバキュロウイルスを作成した。

Rad9、Hus1、Rad1 発現系の構築

ヒト Rad9、Hus1、Rad1 をコードするそれぞれの cDNA は名古屋大学理学研究科、杉本勝則博士より pBacPAK8 の BamHI-XhoI、BamHI-EcoRI、BamHI-XhoI サイトに組み込まれた状態で供与され、これらの組み換えバキュロウイルスは BacPAK Baculovirus Expression System (CLONTECH) を用いて作成した。

Rad17、Chl12/Ctf18 発現系の構築

ヒト Rad17、および、ヒト Chl12 をコードする cDNA は名古屋大学理学研究科、杉本勝則博士よりバキュロウイルスベクター pBacPAK8 の BamHI-EcoRI サイトに組み込まれた状態で供与された。BamHI サイトの直下に Rad17 または Chl12 のスタートコドンが存在するようにデザインされており、この BamHI サイトに FLAG タグカセットを挿入した。FLAG タグカセットは以下に示す 2 種類の合成オリゴヌクレオチドをアニールして得た（5'-GATCCATGGACTACAAGGATGACGATGACAAGA-3'、5'-GATCTCTTGTCATCGTCATCCTTG TAGTCCATG-3'、サワデーテクノロジー、東京）。これらの組み換えバキュロウイルスは、BacPAK Baculovirus Expression System (CLONTECH) を用いて作成した。

本研究で用いたヒト Chl12 の cDNA は、2000 年のデータベースに登録されていた Chl12 の ORF に基づいて PCR によって作成した (779a.a.)。しかしながら、最近この ORF よりもさらに N 末端側が長いものが登録された (975a.a.)。この長い Chl12 の cDNA は ResGen 社より I.M.A.G.E. clone (clone ID ; 4156341) として入手し、Chl12 の開始コドンを含むプライマー（5'-CCGGATCCGGTATGGAGGACTACGAGCAGG-3'、開始コドン直上に BamHI サイトを含む）と ATG より 0.6kbp 下流の配列（短い Chl12 の ATG を含む）にもとづ

いて設計したプライマー (5'-CGCCATGGGACGTGGAGGAGAGAGCCCTGCACCCCGGGGCCATCGGGTCAGCACG-3', NcoI サイトを含む) を用いて、I.M.A.G.E. clone を鋳型として PCR を行って長い N 末端部を得た。この 0.6Kbp の断片を BamHI、NcoI で制限酵素処理し、同じ制限酵素処理で短い Ch12 を組み込んだ pBacPAK8-Ch12 から BamHI-NcoI サイトを欠失させた領域に挿入して長い Ch12 を組み込んだ pBacPAK8-midCh12 を得た。FLAG タグを付加した長い Ch12 は、このプラスミドを BamHI で制限酵素処理したものに対して、FLAG カセットを挿入して得た。PCR で増幅した配列に変異のないことを確認した後、BacPAK Baculovirus Expression System (CLONTECH) を用いて長い Ch12、FLAG-Ch12 が組み込まれたバキュロウイルスを得た。

抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降

RFC2-5 と、FLAG-p140、FLAG-Rad17、FLAG-Ch12 を共発現させた 3 種類の昆虫細胞抽出液それぞれ 50 μ l (総タンパク質として約 0.3 mg) を、3 μ l の抗 FLAG 抗体ビーズ (anti FLAG M2-agarose affinity gel, SIGMA, MO, USA) と共に 0°C で 1 時間インキュベートした。100 μ l の H バッファー (1 M NaCl) で 3 回洗浄した後、抗 FLAG 抗体に結合したタンパク質を 20 μ l の 100mM グリシン (pH3.5) で溶出し、その 6 μ l を 4-20%ポリアクリルアミドゲル (テフコ) で電気泳動した。タンパク質は銀染色により検出した。

FLAG-RFC の精製

FLAG タグを p140 に付加した RFC の精製は以下の方法で行った。操作は特記のない限り 0-4°C で行い、全てのバッファーには終濃度 0.1mM PMSF、2 μ g/ml Leupeptin を添加し、グリセロール密度勾配遠心ではさらに終濃度 1mM DTT を加えた。5 つの RFC サブユニットを共発現させ、得られた昆虫細胞抽出液 (10ml、タンパク質量 40mg、150cm²dish 10 枚相当) を、B バッファー (0.5M NaCl) で平衡化した DEAE Sephacel カラム (2.0 x 1.5 cm ; 2ml bed size, Amersham Biosciences) で除核酸した。この画分を PC バッファー [50mM KPO₄ (pH7.5)、1mM EDTA、1mM CHAPS、0.5M NaCl] で平衡化した抗 FLAG 抗体カラム (anti FLAG M2-agarose affinity gel, 0.8 x 1.5 cm ; 1ml bed size, SIGMA) にロードした。PC バッファー (1M NaCl) 5ml でカラムを洗浄した後、カラム内塩濃度を 0.3M に調整した。カラムに結合したタンパク質は 100 μ g/ml の FLAG ペプチド (F-3290;SIGMA) を含む PC バッファー (0.3M NaCl) で 200 μ l づつ (計 4 ml) 溶出した。RFC 複合体を含む溶出画分の 100 μ l を H バッファーで調製した 2.2ml のグリセロール密度勾配遠心 (15-35%、0.1 M NaCl) 中で、50,000 rpm、4°C で 14 時間遠心した (TLS55 rotor, Beckman)。ボトムから 100

μ 1 づつ分画回収し、RFC を含む画分を以後の各アッセイに用いた。また、RFC のストークス半径を得るために、FLAG ペプチドによる抗 FLAG 抗体カラムからの溶出画分を PC バッファー (0.3M NaCl) で平衡化したゲルろ過カラム (Superose 6 ; HR10/30, Amersham Biosciences) で分画した。精製時の RFC の活性測定は、SV40 DNA 複製系の RFC 活性を相補する DNA 合成活性を指標に行った。

SV40DNA 複製活性測定に用いるタンパク質と DNA の調製

SV40DNA 複製活性の測定に用いる TAg (ラージ T 抗原)、トポイソメラーゼ I、トポイソメラーゼ II、ヒト 293 細胞の細胞質抽出液 (S100) からの I*, IIc 画分、SV40 の複製開始領域を組み込んだ pUC18 プラスミド (pSVO11) は Tsurimoto らの方法に従い得た (Tsurimoto and Stillman, 1989 ; 釣本, 1993)。

SV40 ウイルス複製系を用いた RFC 相補活性の測定

SV40DNA 複製活性測定は Tsurimoto らの方法に従い以下の方法で行った (Tsurimoto and Stillman, 1989 ; 釣本, 1993)。S100 から調製した I*, 30mM HEPES (pH7.5)、7mM $MgCl_2$ 、4mM ATP、各 0.2mM rGTP、rCTP、rUTP、各 0.1mM dGTP、dCTP、dATP、 $[a\text{-}^{32}P]dTTP$ 、0.5mM DTT、40mM creatine phosphate (#621714 ; BOEHRINGER MANNHEIM, Germany)、20 μ g/ml creatine kinase (#127566 ; BOEHRINGER MANNHEIM)、6 μ g/ml pSVO11、Topoisomerase I、II ミックスの存在下で、精製 RFC を加えて 37°C、1 時間インキュベートした。その後、反応液を DE81 紙 (Whatman) に 1.5 μ l づつ 2 点スポットした。DE81 紙は 0.5M NaH_2PO_4 で洗浄し、液体シンチレーションカウンター (Beckman) で DNA に取り込まれた $[a\text{-}^{32}P]dTTP$ を計測して、RFC 相補活性を求めた。

3-3 結果

免疫沈降によるクランプローダー複合体形成の解析

RFC2-5 と、FLAG-p140、FLAG-Rad17 または FLAG-Chl12 を共発現させた Sf9 細胞中でのこれらのサブユニットによる複合体形成を、抗 FLAG 抗体ビーズを用いた免疫沈降により検討した (図 3-1)。これまでに行った RFC の精製で、1M NaCl のような高塩濃度でも RFC 複合体は安定であることがわかっていたので、抗 FLAG 抗体で免疫沈降したタンパクは 1M の NaCl を含むバッファーで洗浄した。まず、FLAG-RFC-p140 と RFC2-5 を共発現させた細胞抽出液からの免疫沈降では、PCNA カラムで精製したタグなし RFC と同じ SDS-PAGE の泳動プロファイルが得られ、

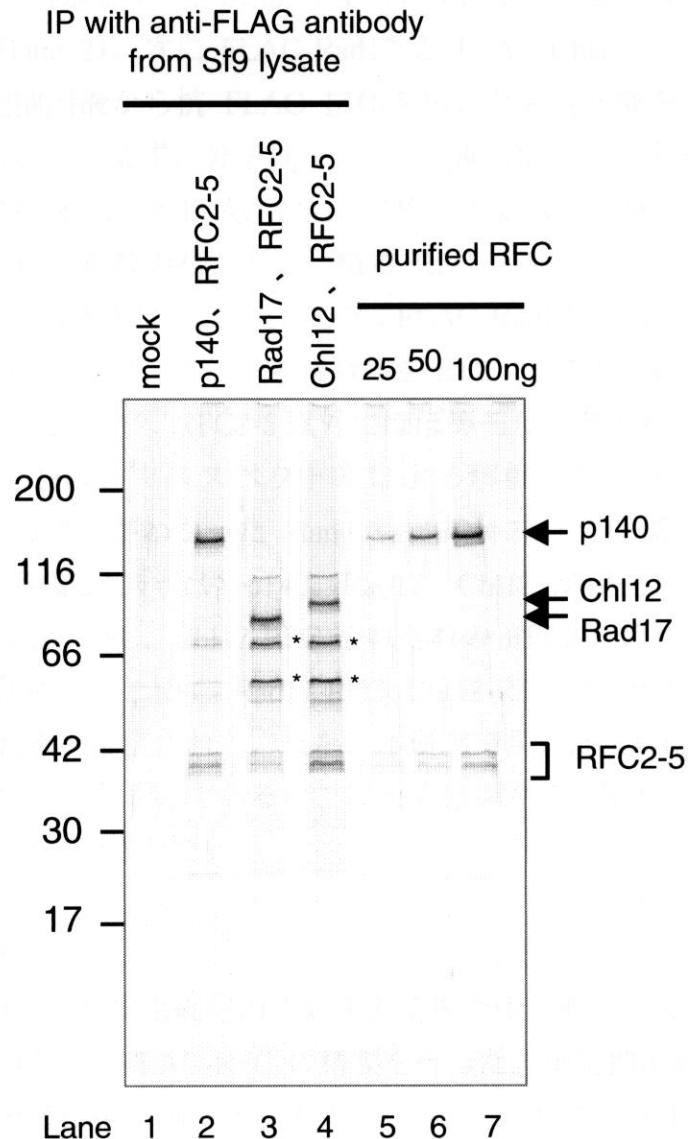


図3-1 抗FLAG抗体による、3つのクランプローダー型複合体の免疫沈降

FLAGタグを付加したp140、Rad17、Chl12をそれぞれRFC2-5と共に共発現させた昆虫細胞抽出液から、抗FLAG抗体を用いて免疫沈降した。その結果、p140、Rad17、Chl12がそれぞれRFC2-5と共にRFC (lane 2)、Rad17-RFC (lane 3)、Chl12-RFC (lane 4) の複合体として沈降した。lane 1は非感染細胞抽出液から免疫沈降を示す。lane 5、6、7は25、50、100ngの精製RFCを示す。電気泳動は4-20%アクリルアミドゲルで行い銀染色した。また、パネル右側にp140、Rad17、Chl12とRFC2-5の泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した(kDa)。アステリスク(*)で示したバンドは、マスマスペクトルの解析からHSC70とHSP60であることがわかった。

p140 に FLAG タグを付加しても、p140 は 4 つの RFC2-5 と安定な複合体を形成することがわかった (lane 2)。次に FLAG-Rad17 と FLAG-Chl12 について、RFC2-5 と共発現させた細胞抽出液から抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い、電気泳動プロファイルを検討した。まず、分子量 75kDa と 86kDa の、それぞれ予測される分子量の位置に FLAG-Rad17 と FLAG-Chl12 に相当するバンドが得られた (lane 3、4)。また、40kDa 付近の複数のバンドは、精製 RFC のバンドパターンとの比較により RFC2-5 であると判断された。したがって、FLAG-Rad17 と FLAG-Chl12 も p140 と同様に 4 つの RFC 小サブユニットと複合体を形成することがわかった。この免疫沈降試料に、Rad17 と Chl12、RFC2-5 以外にほぼ等モルで含まれる分子量 70kDa、60kDa の位置のバンドは、マスペクトルによる解析で熱ショックタンパク質 HSC70、HSP60 であることがわかった (lane 3、4 の * マーク)。細胞抽出液中には RFC2-5 と複合体を形成していない p140、Rad17、Chl12 が存在することから、免疫沈降した RFC、Rad17-RFC、Chl12-RFC それぞれの RFC2-5 のバンド強度にもとづいて、50 μ l の細胞抽出液に RFC、Rad17-RFC、Chl12-RFC 複合体がそれぞれ 425ng、210ng、575ng 含まれると推定された。また、本研究で用いた Chl12 は約 200 アミノ酸分の N 末端が欠失したものであるが、以上の結果から、RFC2-5 との複合体形成には影響しないことが示された。

FLAG-RFC の精製

FLAG-p140 と RFC2-5 が昆虫細胞内で効率よく複合体を形成することがわかったので、この抽出液を用いて FLAG-RFC の精製を行った。細胞抽出液を DEAE カラムで除核酸した後、抗 FLAG 抗体カラムにロードし、FLAG ペプチドで溶出した (図 3-2、A)。FLAG ペプチド溶出後、引き続き 50%エチレングリコールと 1M NaCl を含む H バッファー、最後にグリシンでカラムを洗浄したが、これらの条件で溶出したタンパク質量は FLAG ペプチドで溶出したタンパク質量の 1/20 以下であったので、FLAG ペプチドによりカラムに結合した RFC の 95%以上が溶出したことがわかった (データ未掲載)。ここで得られた FLAG ペプチドによる溶出画分を、精製の最終段階としてグリセロールグラディエントによって分画した (図 3-2、B)。得られた画分の泳動パターンから求めたタンパク質の溶出プロファイル (図 3-2、C) のピークと、この画分を用いて行った SV40 の DNA 合成活性のプロファイルは一致した (図 3-2、D)。このグリセロール密度勾配遠心から求められる分子量は 150kDa であり、この結果は RFC を構成する 5 つのサブユニットの分子量の合計の 290kDa とは異なっている。そこで、精製した RFC の真の分子量を求めるため、抗 FLAG 抗体カラムの溶出画分を用いてゲルろ過を行い、そのストークス半径を算出した (図 3-3)。グリセロール密度勾配遠心から求めた RFC の沈降係数 8.9S と、ゲ

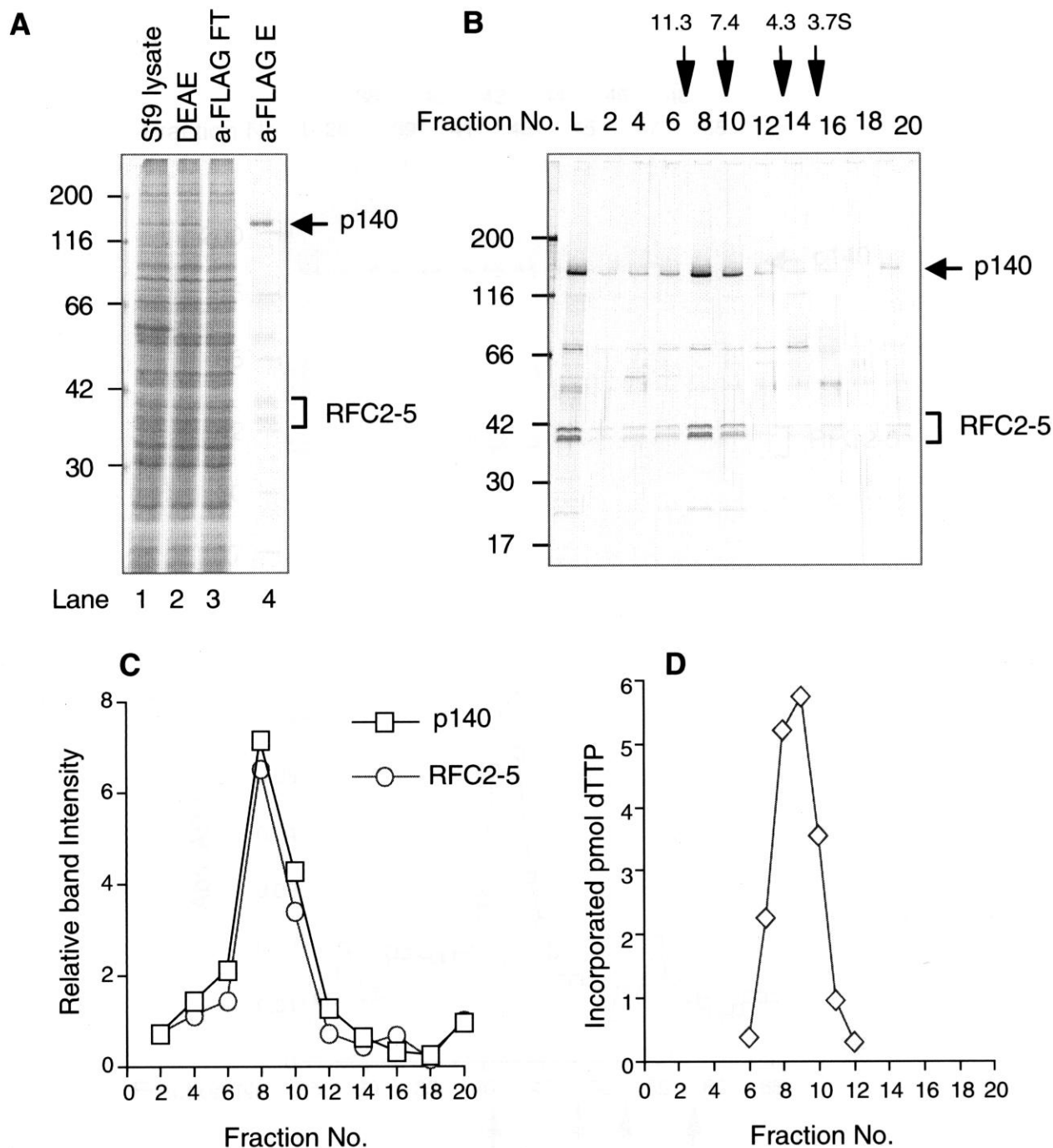


図3-2 抗FLAG抗体カラムによるFLAG-RFCの精製

(A) FLAG-p140とRFC2-5を共発現した昆虫細胞抽出液から、抗FLAG抗体カラムでFLAG-RFCを精製した。それぞれ細胞抽出液 (lane 1)、DEAEカラムによる除核酸画分 (lane 2)、抗FLAG抗体カラムの非結合画分 (lane 3)、FLAGペプチドによる抗FLAG抗体カラム結合タンパク質の溶出画分 (lane 4) を15%アクリルアミドゲルで電気泳動、CBB染色を行った。(B) 抗FLAG抗体カラム溶出画分をグリセロール密度勾配遠心で分画し、4-20%アクリルアミドゲルで電気泳動、銀染色を行った。パネルA、Bの右側にp140とRFC2-5の泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した (kDa)。(C) SDS-PAGEのバンド強度から、p140とRFC2-5の溶出プロファイルを求めた。横軸にはフラクション番号を、縦軸にはKODAK image analysis system (2-1材料と方法を参照) により定量したバンド強度の相対値を示す。(D) Bのフラクションを用いて、SV40DNA合成活性を測定した。反応系に加えられた[α - 32 P]dTTPの総量は125pmol。

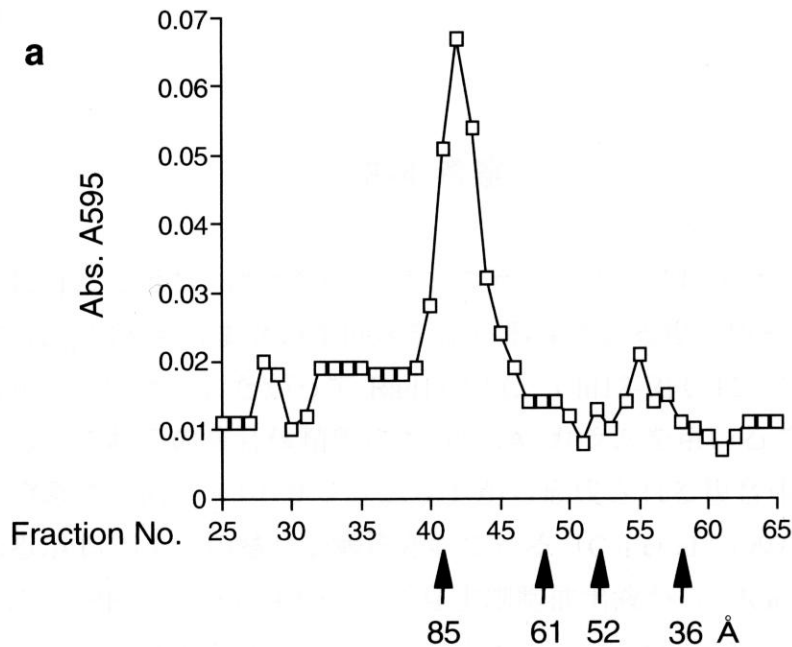
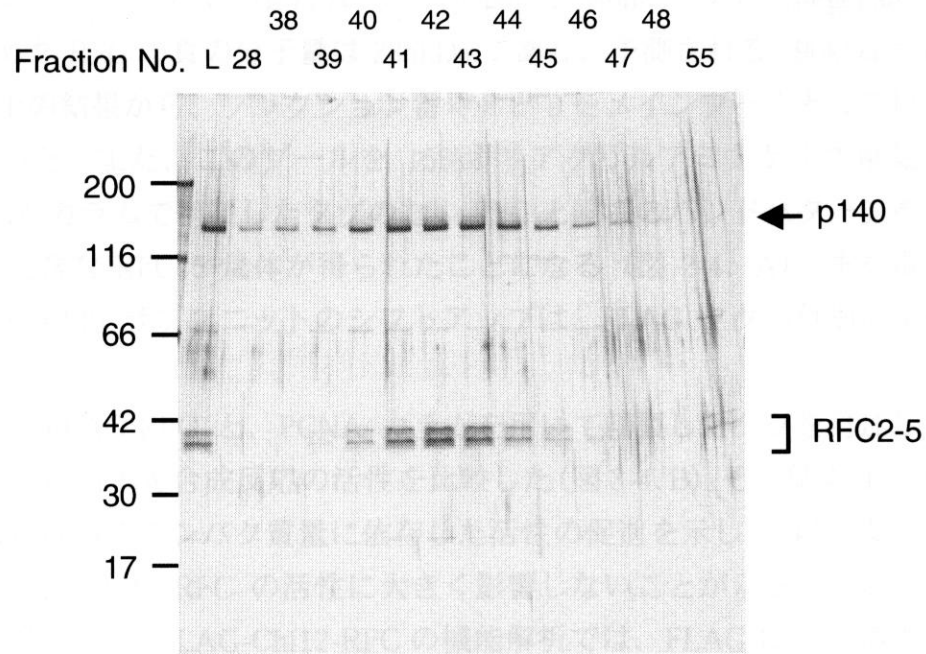
A

図3-3 ゲルろ過によるFLAG-RFCのストークス半径の推定

図2-2、Aに示した抗FLAG抗体カラムからの溶出画分を ゲルろ過 (Superose6 HR10/30) で精製し、得られた溶出プロファイルからストークス半径を求めた。

(A) ゲルろ過画分の電気泳動プロファイル。4-20%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行い、銀染色した。また、パネル右側にp140とRFC2-5の泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した (kDa)。(a) プロテインアッセイで求めたゲルろ過画分の溶出プロファイル。パネル下部には、分子量マーカーから求められるストークス半径の溶出位置を示した。縦軸は、プロテインアッセイから求めた相対的なタンパク質量。

ルろ過で求めたストークス半径 77 Å から Siegel と Monty の方法 (Siegel and Monty, 1966) で求めた RFC の真の分子量は 285kDa であり、予測される 290kDa とほぼ一致した。以上の結果から、フラクション番号 8 と 9 をメインプールとして以後の活性測定に用いた。また、このプールを 15%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した結果、PCNA カラムで精製したタグのない RFC と同様のバンドパターンを示し、FLAG-p140 を含む RFC 5 量体を得られたことになる (図 2-4, A)。また電気泳動での、若干の p140 サブユニットのシフトアップは、FLAG タグの付加によるものである。

次に、この FLAG-RFC と、PCNA カラムを用いて精製したタグを付加していない RFC との SV40 DNA 合成反応の活性を比較した (図 3-4, B)。その結果、FLAG-RFC は RFC とほぼ同等のタンパク質量に依存した活性の促進を示した。以上より、FLAG タグを付加したことが RFC の活性に大きく影響しないことが示されたので、以降の FLAG-Rad17-RFC、FLAG-Chl12-RFC の機能解析では、FLAG-RFC を活性の比較対照に用いた。

3-4 考察

これまでに行ってきた、PCNA のアフィニティークロマトグラフィーによる RFC の精製時には、p140 を含まない RFC2-5 から形成される複合体も PCNA に結合することがわかっていた。したがって Rad17-RFC、Chl12-RFC についても RFC2-5 を含むことから、これらの複合体精製にも PCNA カラムを用いることが可能であると考えた。実際に、RFC の小サブユニットから形成される複合体は、RFC の 1/5 の効率であるが PCNA との結合が報告されている (Cai et al., 1997)。そこで、タグのない Rad17 と RFC2-5 を共発現させた昆虫細胞抽出液から、Rad17-RFC 複合体の PCNA カラムによる精製を試みた。しかしながら、50mM の NaCl 濃度で細胞抽出液中の Rad17-RFC の一部しか PCNA カラムに結合せず、ほとんどは非結合画分として回収された。PCNA カラムに結合した Rad17-RFC も、0.1M NaCl の溶出条件で他のタンパク質とともに大部分が溶出したため、この精製に PCNA カラムを用いることはできなかった (データ未掲載)。そこで新規クランプローダー様複合体には、タグによるアフィニティー精製を用いることにした。比較のため、RFC-p140 にもタグを付加した発現系を作製した。

p140、Rad17、Chl12 それぞれの N 末端に FLAG タグを付加し、これらと RFC2-5 を昆虫細胞で共発現させた。FLAG-RFCp140 と RFC2-5 を共発現させた細胞抽出液からの免疫沈降では、PCNA カラムで精製したタグなし RFC と同じ SDS-PAGE

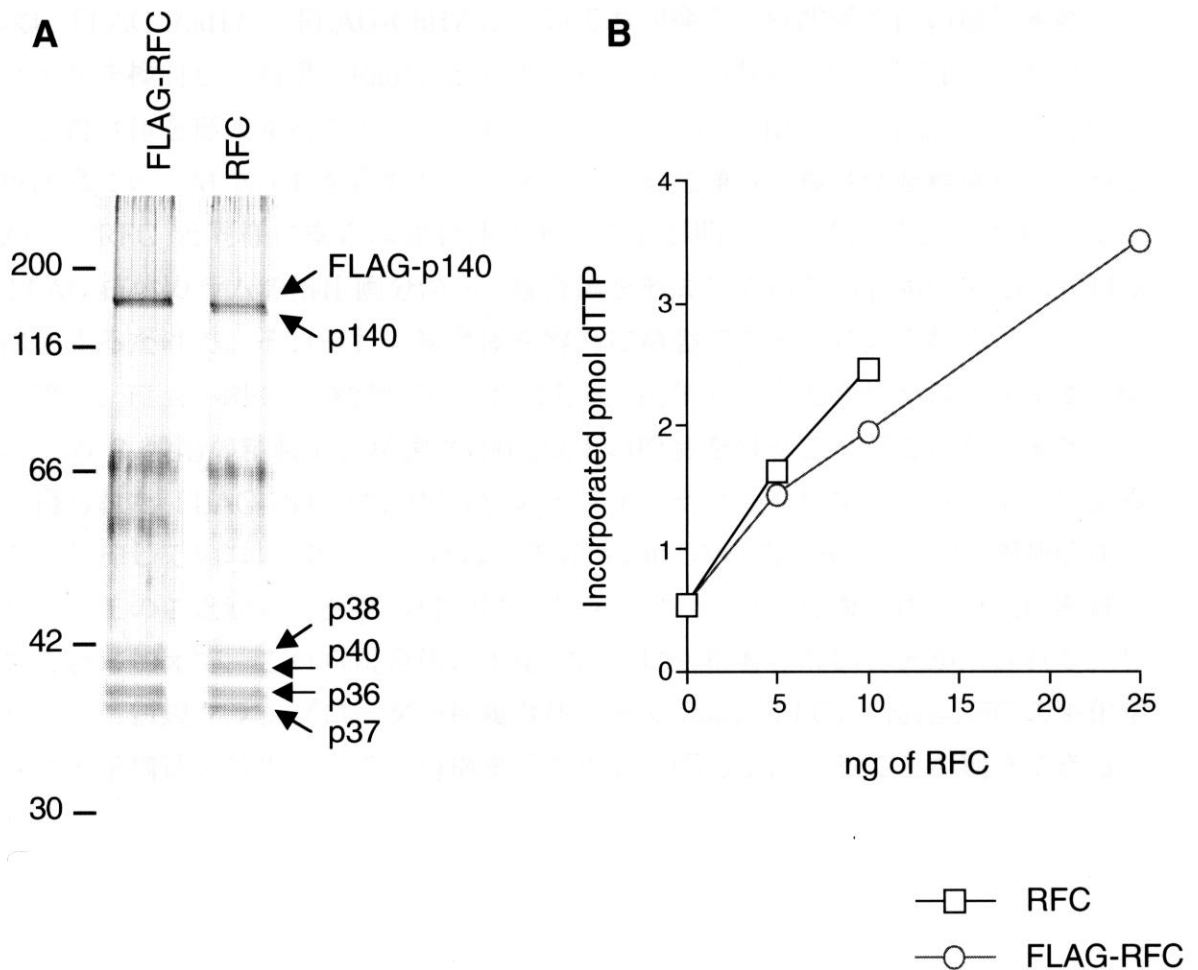


図3-4 SV40 DNA複製系による、RFCとFLAG-RFCの活性の比較

(A) PCNAアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製したRFCと、抗FLAG抗体カラムを用いて精製したFLAG-RFCそれぞれ40ngを15%ポリアクリルアミド電気泳動を行い、銀染色した。パネル右側に各サブユニットの泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した(kDa)。(B) RFCとFLAG-RFCの活性を、SV40 DNA複製系のDNAポリメラーゼによるDNA合成活性で比較した。グラフ左側に取り込まれた $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dTTP}$ 量を、下部に反応系に加えたRFC量を示した。反応系に加えられたdTTPの総量は125pmol。

の泳動プロファイルが得られ、FLAG タグの付加が複合体形成に影響しないことがわかった。

次に FLAG-Rad17 と FLAG-Chl12 についても同様の免疫沈降を行い電気泳動プロファイルを検討した結果、Rad17 と Chl12 も p140 と同様に 4 つの RFC 小サブユニットと複合体を形成することが示された。また、Rad17-RFC、Chl12-RFC 複合体は免疫沈降での 1M NaCl を含むバッファーによる洗浄後も複合体を維持していることから、RFC と同様に安定な複合体であることが明らかとなった。したがって、抗 FLAG 抗体カラムの溶出画分から、複合体を形成していない p140、Rad17、Chl12 を除去するだけで、それぞれの複合体を容易に精製できると考えられる。

実際に、FLAG-RFC の精製では、抗 FLAG 抗体カラムとグリセロール密度勾配遠心との 2 段階の精製で、精製度 90%以上の標品を得ることができた。また、ここで得られた FLAG-RFC は、PCNA のアフィニティークロマトグラフィーによるタグを付加していない RFC と、ほぼ同等の SV40 DNA 複製系での RFC 相補活性を示した。このことから、タグの付加は、クランプローダー様複合体の形成に影響しないことに加えて、これら複合体の生化学活性にも影響しないことが示された。したがって、新規クランプローダー様複合体である Rad17-RFC、Chl12-RFC の生化学活性や分子構造の特性を、この再構築系を用いて明らかにすることが期待できる。

第 4 章

チェックポイント応答のクランプとクランプローダー、Rad9-1-1 と Rad17-RFC の精製と機能解析

4-1 序

抗 FLAG 抗体による免疫沈降の結果から、チェックポイント応答因子、Rad17 は RFC2-5 と共に、RFC と同様に安定な複合体を形成することが明かとなった。また、同じチェックポイント応答経路の因子から形成される Rad9-1-1 複合体についても、当研究室の篠崎によってバキュロウイルス再構築系から精製された。そこで、これらが新規クランプ・クランプローダーとして機能するかを明らかにする一環として、実際に Rad9-1-1 がクランプとしてのリング構造を持つ複合体であるか、また、Rad17-RFC 複合体が ATPase 活性や DNA 結合活性といったクランプローダーの基本となる生化学特性を持ち、RFC 様の分子構造を形成しているか、という点を解析した。

4-2 材料と方法

Rad9-1-1 の精製

Rad9-1-1 は各サブユニットの cDNA を組み込んだバキュロウイルスを用いて昆虫細胞 High Five で 3 つのサブユニット共発現させ、得られた昆虫細胞抽出液から当研究室の篠崎によって精製されたものを用いた（篠崎、修士論文、2003 ; Shiomi et al., 2002）。

FLAG-Rad17-RFC の精製

FLAG-Rad17-RFC2-5 複合体（以下、Rad17-RFC）の精製は、FLAG-RFC の精製方法に基づいて行った。操作は特記のない限り 0-4℃で行い、全てのバッファーには終濃度 0.1mM PMSF、2 μ g/ml Leupeptin を添加し、グリセロール密度勾配遠心ではさらに終濃度 1mM DTT を加えた。FLAG-Rad17 と RFC2-5 を昆虫細胞で共発現し、得られた細胞抽出液（36ml、タンパク質量 150mg、150cm² dish 40 枚相当）を、B バッファー（0.5M NaCl）で平衡化した DEAE Sepharose カラム（2.0 x 1.5 cm、Amersham Biosciences）で除核酸した。この画分を PC バッファー（0.5M NaCl）で平衡化した、抗 FLAG 抗体カラム（anti FLAG M2-agarose affinity beads、1ml bed ; 0.8 x 1.5 cm、SIGMA）にロードした。PC バッファー（1M NaCl）でカラムを洗浄

した後、5mM ATP、10mM MgSO₄を含む PC バッファー (0.1M NaCl) 5ml でカラムを平衡化し室温で 30 分間保温した。同じバッファー10ml でカラムを室温で洗浄した後、5mM ATP、10mM MgSO₄を除いた PC バッファー (0.3M NaCl) 10ml でカラムを洗浄した。カラムに結合したタンパク質は 100 μ g/ml の FLAG ペプチド (F-3290、SIGMA) を含む PC バッファー (0.3M NaCl) で 200 μ l ずつ、計 4 ml で溶出した。Rad17-RFC 複合体を含む溶出画分の 200 μ l を、H バッファーを基本に作製した 4.4ml のグリセロール密度勾配遠心 (15-35%、0.1M NaCl、pH 7.5) 中で 4°C、49,000 rpm で 18 時間遠心した (SW55Ti rotor、Beckman)。遠心チューブボトムから 200 μ l ずつ分画し、ATPase 活性、DNA 結合活性と共溶出した Rad17-RFC を含む画分を、後の比活性の検討と電子顕微鏡観察に用いた。また、Rad17-RFC のストークス半径は、FLAG ペプチドによる 抗 FLAG 抗体カラムからの溶出画分を用いて、H バッファー (1M NaCl) で平衡化したゲルろ過カラム (Superose 6 ; HR10/30、Amersham Biosciences) の溶出プロファイルから求めた。

ATPase 活性測定

クランプローダーの ATPase 活性は、Fukuda ら (Fukuda et al., 1995) の方法に基づき以下の方法で行った。30mM HEPES (pH 7.5)、7mM MgCl₂、0.5mM DDT、0.1mg/ml bovine serum albumin、30mM NaCl、0.1mM [γ -³²P] ATP を含む 10 μ l の反応液中に図に示した量のタンパク質を加え、37°C で示した時間インキュベートした。必要に応じて、ヌクレオチド濃度で 25 μ M の DNA [poly dA または poly dA/oligo dT (ヌクレオチド濃度で 5:1)、Amersham Bioseience] を反応系に加えた。反応液の 3 μ l を 50 μ l の停止液 [2mM KH₂PO₄、0.08% Norit A (ナカライ)、0.012N HCl] に加えて反応を停止させ、Norit A 未吸着の遊離 Pi を液体シンチレーションカウンター (Beckman) で測定して ATPase 活性を求めた。

DNA 結合活性測定 (Filter binding assay)

DNA 結合活性の検出に用いた基質 DNA は、ssDNA として poly dA、プライマー末端様構造を持つ DNA として poly dA/oligo dT (ヌクレオチド濃度 5:1) を用いた。poly dA は Alkaline Phosphatase (CIAP、Takara) による脱リン酸化に続いて、[γ -³²P] ATP、および、T4 Polynucleotide Kinase (Takara) によるリン酸化により 5' 末端をラベルした。Filter binding assay は、基質 DNA を 30mM HEPES (pH 7.5)、7mM MgCl₂、0.5mM DDT、0.1mg/ml bovine serum albumin を含む 10 μ l の反応液中、示した NaCl 濃度 (特記のない場合は 30mM NaCl) とタンパク量で室温で 15 分間インキュベートし、その後、直ちにバキュームブロッター (Vacugene Vacuum Blotting Unit、LKB BROMMA、SWEDEN) 上の KOH 処理したニトロセルロースメンブレン

(Immobilon-NC, Millipore) にスポットし吸引した。メンブレンは、反応液と同じ組成のバッファーで3回吸引洗浄し、フィルターに残った DNA の放射活性をイメージングプレートと Fuji イメージアナライザーBAS 2000 (富士フィルム) で可視化、定量して DNA 結合活性を求めた。

免疫沈降による Rad9-1-1 と Rad17-RFC 間結合の解析

FLAG-Rad17 と RFC2-5 を共発現させた昆虫細胞抽出液 100 μ l (タンパク質量 0.6mg) を、抗 FLAG 抗体ビーズ 3 μ l と共に 0°C で 1 時間インキュベートした。50 μ l の H バッファー (1M NaCl) で 4 回洗浄した後、50 μ l の H バッファー (0.1M NaCl) で 2 回洗浄した。この結果約 2 μ g の標的タンパク質が結合した抗 FLAG 抗体ビーズを得た。このビーズに対して、精製したヒト Rad9-1-1 を 500ng (2 μ g の Rad17-RFC に対してモル比で約 1/2 量) を最終体積 10 μ l で加えて 1 時間インキュベートした。50 μ l の H バッファー (0.1M NaCl) で 2 回洗浄した後、抗 FLAG 抗体に結合したタンパク質を 10 μ l の 0.1M グリシン (pH3.5) で溶出し、その 3 μ l を 4-20% ポリアクリルアミドゲル (テフコ) で電気泳動し、銀染色を行った。

4-3 結果

FLAG-Rad17-RFC の精製

FLAG-Rad17-RFC (以下 Rad17-RFC) の精製は、FLAG-RFC (2-2 参照) の精製法にもとづいて、抗 FLAG 抗体カラムから FLAG ペプチドによる溶出で行った。その結果、Rad17 と RFC2-5 以外に、免疫沈降の結果でみられた HSC70 に相当するタンパク質がほぼ等モル混入した (図 4-1, A)。これを除去するために、FLAG ペプチド溶出の前に 10mM MgSO₄、5mM ATP を含む PC バッファーで室温で洗浄を行ったところ、HSC70 は抗 FLAG 抗体カラムから遊離し Rad17-RFC の精製標品への混入を防ぐことができた (図 4-1, B)。抗 FLAG 抗体カラムの FLAG ペプチド溶出画分は、さらにグリセロール密度勾配遠心によって精製した (図 3-2, A)。その結果、分子量マーカーから求められる沈降係数 11.3S (232kDa) 以上の高分子量の位置から沈降係数 8.9S (約 150kDa、フラクション番号 9、10) の分画まで連続的に、Rad17 と RFC2-5 が沈降した。150kDa よりも低分子量のフラクション番号 13、14 には、Rad17 と抗 FLAG 抗体カラムから除ききれなかった HSC70 のバンドが存在した。SDS-PAGE のバンド強度にもとづいてタンパク質の溶出プロファイルを求めると、150kDa の位置で Rad17 と RFC2-5 が共にピークとなり、それらの存在比はほぼ等モルであった (図 4-2, B)。このグリセロール密度勾配遠心の Rad17-RFC

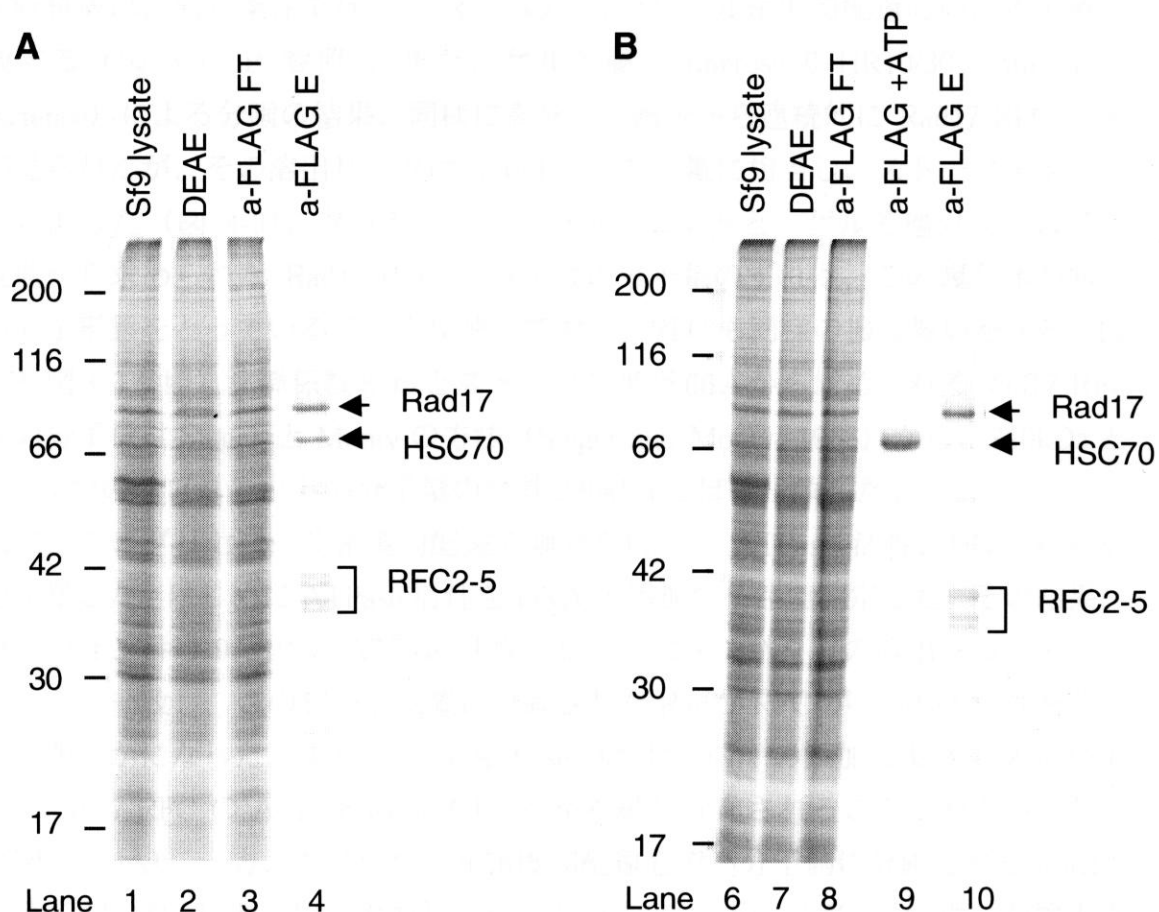


図4-1 Rad17-RFCの精製

(A) FLAG-Rad17とRFC2-5を共発現した昆虫細胞抽出液から、抗FLAG抗体カラムによりRad17-RFCを精製した。FLAGペプチド溶出で、HSC70のコンタミが見られたので (lane 4)、 Mg^{2+} とATPを添加したバッファーでカラムを洗浄した。その結果、(B)のlane 10に示すように、FLAGペプチドによる溶出画分へのHSC70のコンタミを防ぐことができた。パネルA、Bにはそれぞれ細胞抽出液 (lane 1と6)、DEAEカラムによる除核酸画分 (lane 2と7)、抗FLAG抗体カラムの非結合画分 (lane 3と8)、 Mg^{2+} とATPによるカラム洗浄画分 (lane 9)、FLAGペプチドによる抗FLAG抗体カラム結合タンパク質の溶出画分 (lane 4と10)を示す。パネルA、B共に12.5%アクリルアミドゲルによる電気泳動を行いCBB染色した。また、両パネル右側にRad17とRFC2-5の泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した (kDa)。

の沈降位置は、同じ条件で行った RFC のグリセロール密度勾配遠心の沈降位置と一致する (図 3-2、B 参照)。また、ゲルろ過 (Superose 6 HR10/30、Amersham Bioscience) による分画の結果、同様に高分子の画分から連続的に Rad17-RFC の溶出が見られたが、その溶出ピークは 350kDa の分子量に相当し、ストークス半径は 66Å であった (図 4-3)。グリセロールグラディエントと、ゲルろ過カラムのピーク位置から求められた Rad17-RFC のみかけの分子量のずれは、この複合体が非球状の分子形態をとっていることを反映しており、RFC も同様の振る舞いをする (図 3-2、B; 図 3-3 参照)。沈降係数 8.9S とストークス半径 66Å から求められる Rad17-RFC の真の分子量は Siegel と Monty の方法 (Siegel and Monty, 1966) から、240kDa となり、5 つのサブユニットの分子量の合計 230kDa とほぼ一致した。

次に、このグリセロール密度勾配遠心画分を用いて ATPase 活性、DNA 結合活性を定量した。はじめに ATPase 活性を DNA 未添加の条件で測定した。その結果、フラクション番号 9、10 の ATPase 活性のピークはタンパク質の溶出プロファイルのピークと一致し、このピーク位置に分画された Rad17-RFC が ATPase 活性を持つことが明らかになった。また、この ATPase 活性は DNA の添加によって 2 倍に上昇し、Rad17-RFC の ATPase 活性は DNA 依存的に促進されることが明らかとなった (図 4-4、A)。一方、グリセロール密度勾配遠心で高分子側に分画された Rad17-RFC からは、DNA 未添加、添加共にピークの 1/20 以下の ATPase 活性しか検出されなかった。そこで、この高分子側に分画された Rad17-RFC は精製過程で非特異的な凝集体を形成したものではないかと考えられた。実際に、グリセロール密度勾配遠心画分をグルタルアルデヒド処理した後、未変性 4% ポリアクリルアミド電気泳動を行った結果、フラクション番号 9 と 10 は RFC とほぼ同じ泳動度を示すことから Rad17-RFC 1 ユニットの存在状態であるのに対し、フラクション番号 8 以前のは高分子側に分画されたほど段階的に低い泳動度を示し、これらは非特異的な凝集体であることがわかった (図 4-5)。また、フラクション番号 16 の位置で ATPase 活性がみられるが、DNA による促進はみられず、また、HSC70 のバンドが確認できるので、このタンパク質による ATPase 活性と考えられる。

一方、filter binding assay による DNA 結合活性の測定では、どの画分も poly dA との結合をほとんど示さなかったのに対して、フラクション番号 2 から 10 の範囲で poly dA/oligo dT との結合活性が検出された (図 4-4、B)。この DNA 結合の基質特異性は RFC と一致する。この DNA 結合活性はフラクション番号 8、9 でピークとなり、電気泳動から求めたタンパク質と、ATPase 活性のピークから 1 フラクション高分子側にずれていた。これは、グリセロール密度勾配遠心の高分子側に分画された非特異的な凝集体を形成した Rad17-RFC が高い DNA 結合活性を示したため、みかけの活性のピークがずれたためと考えられる。

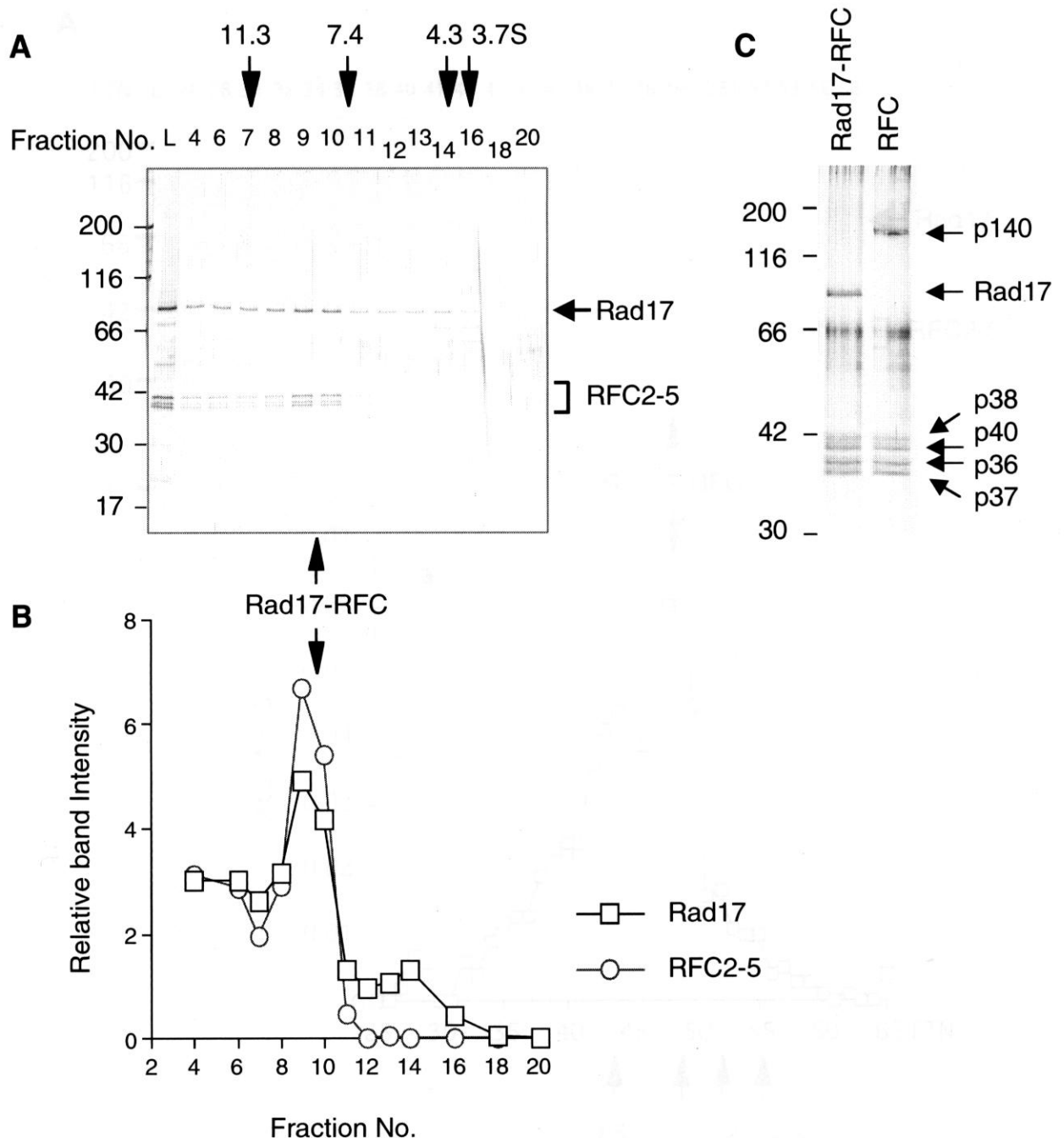


図4-2 グリセロール密度勾配遠心によるRad17-RFCの精製

(A) 抗FLAG抗体カラムからFLAGペプチドを用いて溶出したRad17-RFCを、グリセロール密度勾配遠心分画し、各画分を4-20%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動、銀染色した。パネル上部に画分の番号を示した (Lはローディングサンプル)。また、パネル右側にRad17とRFC2-5の泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した (kDa)。(B) SDS-PAGEのバンド強度から、Rad17とRFC2-5の溶出プロファイルを求めた。横軸にはフラクション番号を、縦軸にはKODAK image analysis system (2-1、材料と方法を参照)により定量したバンド強度の相対値を示す。(C) Aの画分番号9と10のプールを用いて、精製RFCと共に15%のSDS-PAGE、銀染色を行った。

A

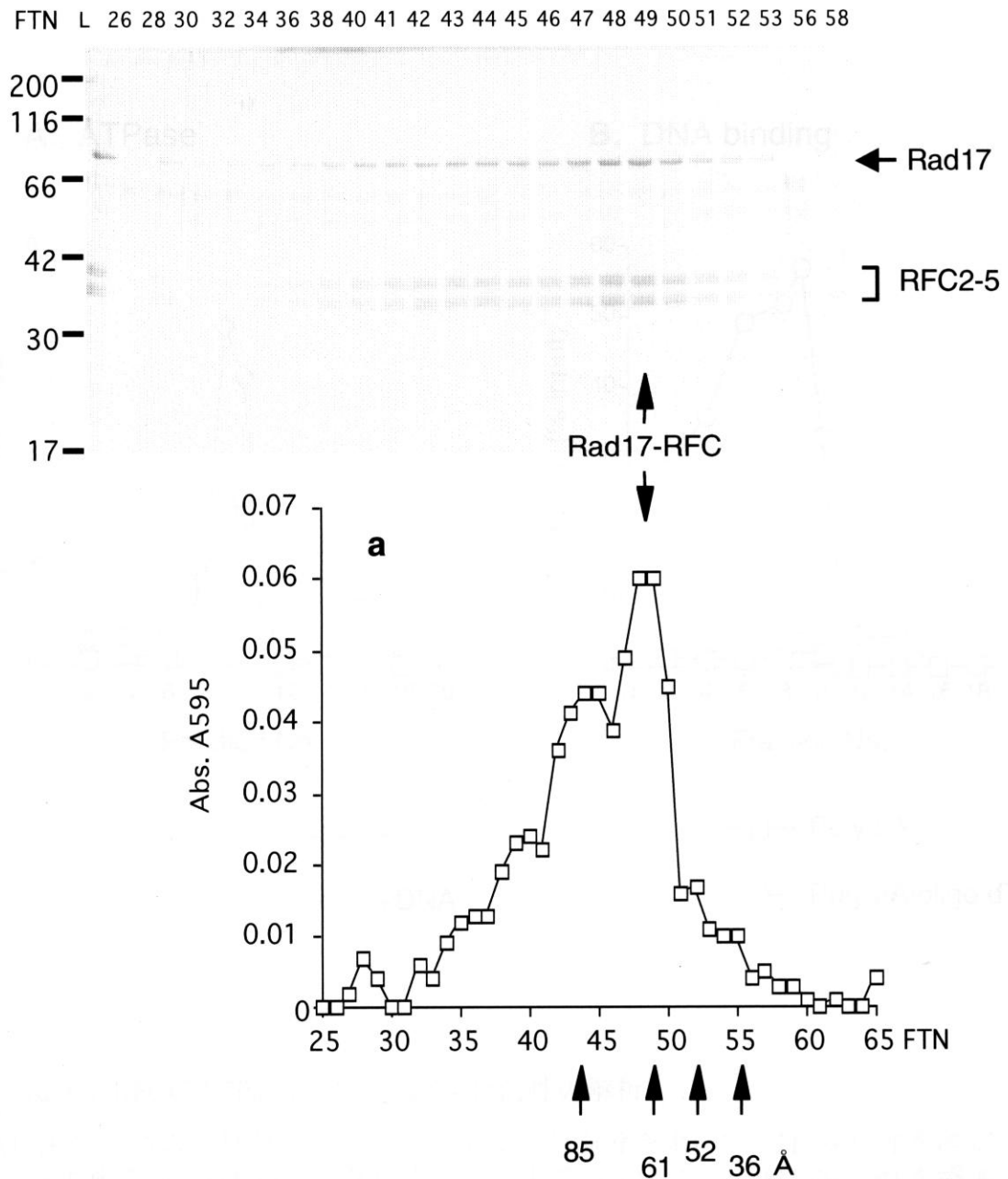
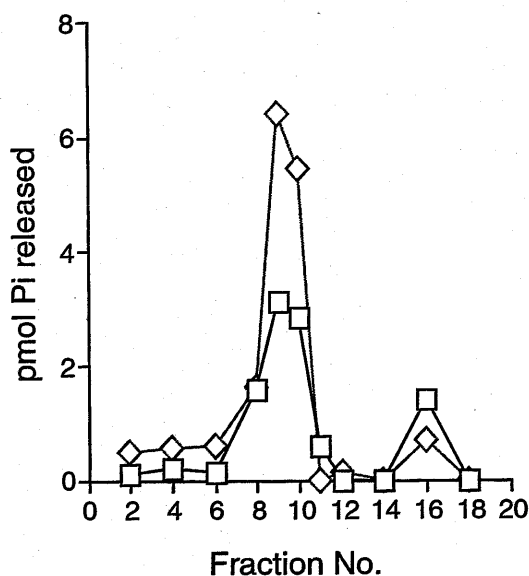


図4-3 ゲルろ過によるRad17-RFCの精製

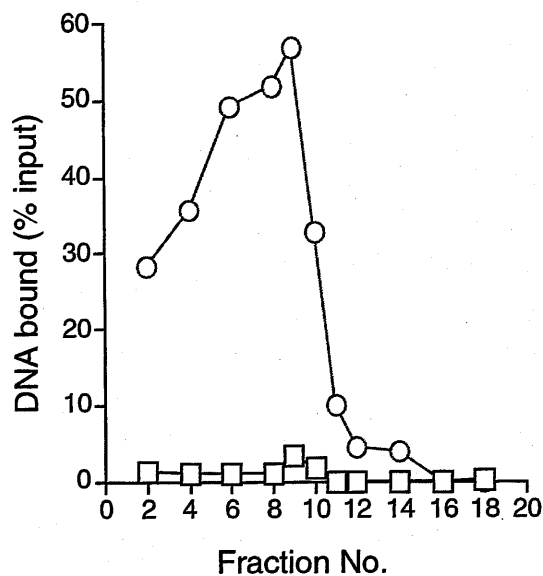
図4-1、Bに示した抗FLAG抗体カラムからの溶出画分をゲルろ過カラム (Superose6 HR10/30) で精製した。(A) ゲルろ過による分画の、12.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動プロファイル (CBB染色)。また、パネル右側にRad17とRFC2-5の泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した (kDa)。(a) プロテインアッセイで求めたゲルろ過カラムからの溶出プロファイル。パネル下部には、分子量マーカーから求められるストークス半径の溶出位置を示した。縦軸は、プロテインアッセイから求めた相対的なタンパク質量。

A. ATPase



—□— -
—◇— +DNA

B. DNA binding



—□— Poly dA
—○— Poly dA/oligo dT

図4-4 Rad17-RFCのATPase活性、DNA結合活性の解析

(A) 図4-2、Aのグリセロールグラディエント画分を用いてATPase活性を測定した。-は単独での、+DNAはヌクレオチドモルで25 μ Mのpoly dA/oligo dTを添加した時のRad17-RFCのATPase活性を示す。フラクション番号9で25ngのRad17-RFCが反応系に加えられている。反応系に加えられたATPの総量は1000pmol。パネル下部に分画番号、縦軸にATPase活性により分解された遊離無機リンのモル数を示す。(B) ATPase活性測定と同様の画分を用いて、filter binding assayによるDNA結合活性の解析を行った。基質DNAとして8 fmolのpoly dAまたはpoly dA/oligo dTを用いた。フラクション番号9で10ngのRad17-RFCが反応系に加えられている。パネル下部に分画番号、縦軸に加えた総DNA量に対して、Rad17-RFCと結合したDNA量の割合を示した。

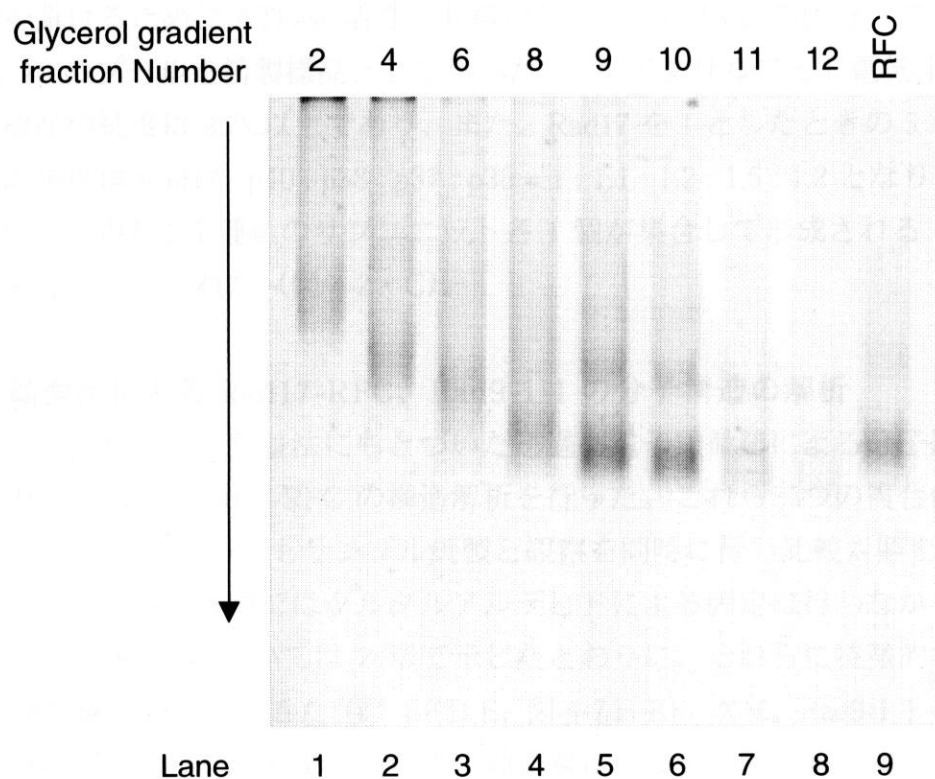


図4-5 Rad17-RFCのグリセロール密度勾配遠心画分の未変性ゲル電気泳動

図4-2に示したRad17-RFCのグリセロール密度勾配遠心画分を、グルタルアルデヒド処理の後、未変性4%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、銀染色した。パネル上部には、用いた画分番号を示した。画分番号9、10で約40ngのRad17-RFCが泳動されている。lane 9は精製RFC 30ngを示す。矢印は泳動方向を示す。

以上の解析から明かとなった、DNA 依存的に促進される ATPase 活性と、プライマー末端構造の DNA に特異的に結合する活性から、Rad17-RFC は RFC と同様の基本的生化学特性を持つことが示された。以後の解析には、タンパク質凝集体の影響を避けるために ATPase 活性と共溶出した Rad17-RFC の画分、フラクション番号 9、10 のプールを精製標品として用いた。15%アクリルアミド電気泳動結果から、この標品の純度は 95%以上であり、また、Rad17 を 1 としたときの 5 つのバンドの相対的強度は Rad17 : p40 : p38 : p37 : p36 = 1 : 1.1 : 1.2 : 1.5 : 1.2 となり、Rad17-RFC も RFC と同様に 5 種類のサブユニット各 1 個が集合して形成される 5 量体の複合体であることが示された (図 4-2、C)。

電子顕微鏡による Rad17-RFC、Rad9-1-1 の分子構造の解析

次に、低角度白金蒸着法にもとづいた透過型電子顕微鏡による分子観察で、精製した Rad9-1-1 と Rad17-RFC の構造解析を行った。これら二つの複合体の解析は、RFC と PCNA についてもサンプル調製と観察を同時に行い比較対照とした。また、これらのサンプル調製ではグルタルアルデヒドによる固定は行わなかった。

PCNA と RFC については 2 章で示したとおりに、それらに特徴的なリング構造と U 字型構造が確認できた (図 4-6 B-E、図 4-7 B-E)。次に、Rad9-1-1 と Rad17-RFC の構造観察を行った。Rad9-1-1 の電子顕微鏡による低倍率観察では、PCNA とほぼ同じ大きさの均一な粒子像が得られた (図 4-6 A と F)。この観察像から計測した Rad9-1-1 の直径は $22.5 \pm 2.3 \text{ nm}$ ($n=140$) で、同時に観察した PCNA の直径 $21.5 \pm 2.0 \text{ nm}$ ($n=129$) とほぼ同じ大きさであった。PCNA の真の直径は 8nm なので、本解析では白金蒸着によりその大きさが約 2.8 倍に拡大されたタンパク質を観察していることになる。高倍率の観察では、Rad9-1-1 は 3 つのユニットから成るリング状の形態を持ち (図 4-6、G-N)、この分子イメージから型取った輪郭像は PCNA の輪郭像と一致させることができた (図 4-6、k-l)。したがって、Rad9-1-1 は PCNA と同じリング状構造を持つ、クランプ様複合体であることが明らかになった。

次に、ATP 非存在下での Rad17-RFC の分子構造を解析した。低倍率の観察像で Rad17-RFC は、Rad9-1-1 や PCNA よりも大きな、均一な楕円形の単粒子として観察できた (図 4-7、F)。この粒子の長径と短径を計測した結果、それぞれ $26.3 \pm 2.4 \text{ nm}$ と $22.3 \pm 2.4 \text{ nm}$ ($n=148$) であり、RFC の $26.5 \pm 2.2 \text{ nm}$ と $22.2 \pm 2.1 \text{ nm}$ ($n=129$; 図 4-7、A) との差は見られなかった。この Rad17-RFC は長軸に沿って切れ目を持つ U 字型構造を持ち (図 4-7、G-N)、その分子イメージの輪郭像は RFC の輪郭像とお互いに一致することから (図 4-7、k-n)、Rad17-RFC は RFC と同じクランプローダー様構造を持つ複合体であることが明らかとなった。

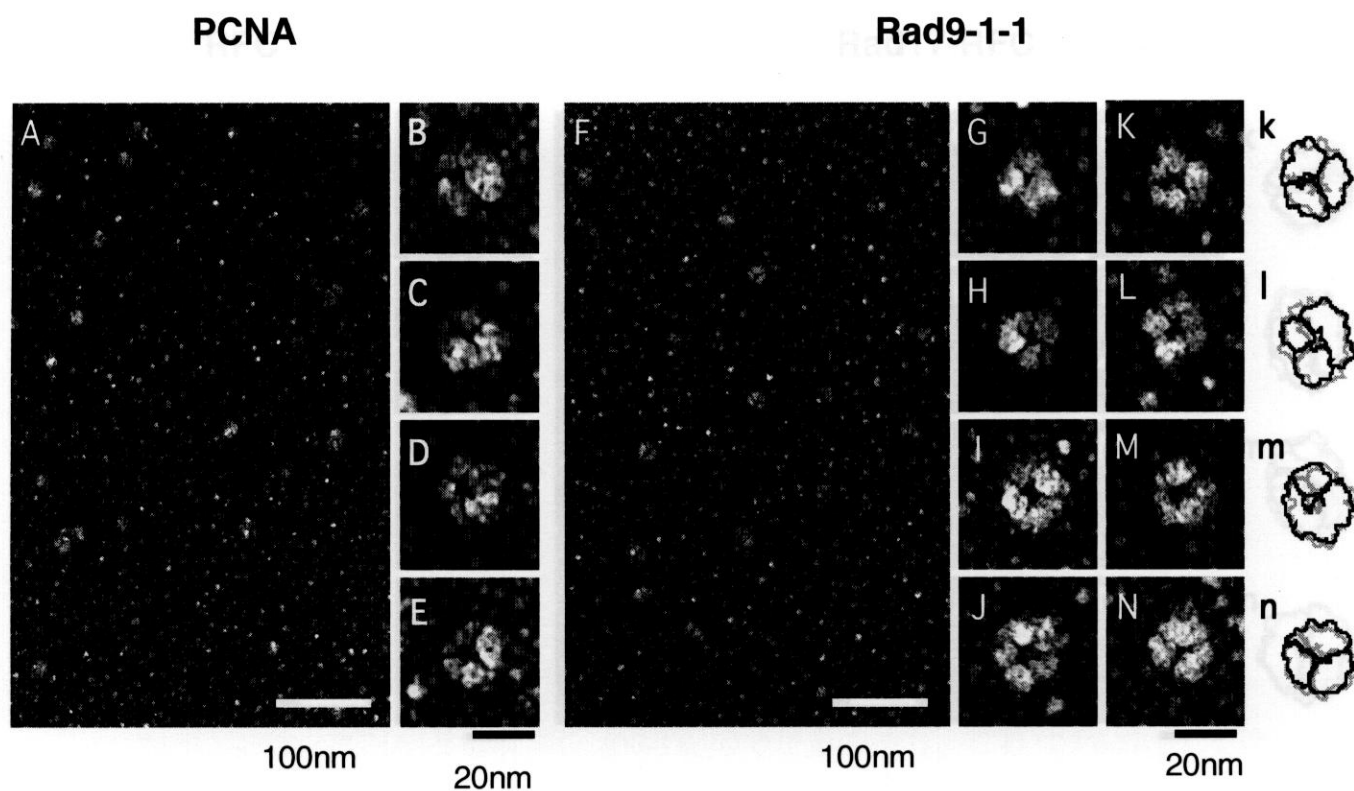


図4-6 電子顕微鏡観察によるPCNAとRad9-1-1の分子構造の比較

低角度白金蒸着によるPCNAの低倍率での代表的な観察像（A）と、高倍率での観察像（B-E）。同様の方法で行ったRad9-1-1の低倍率での代表的な観察像（F）と、高倍率での観察像（G-N）。K-Nの分子イメージの輪郭像をk-lとして黒線で右に示した。このK、l、m、nそれぞれに、PCNAのE、C、D、Eの分子イメージの輪郭像（灰色）を重ね合わせて示した。

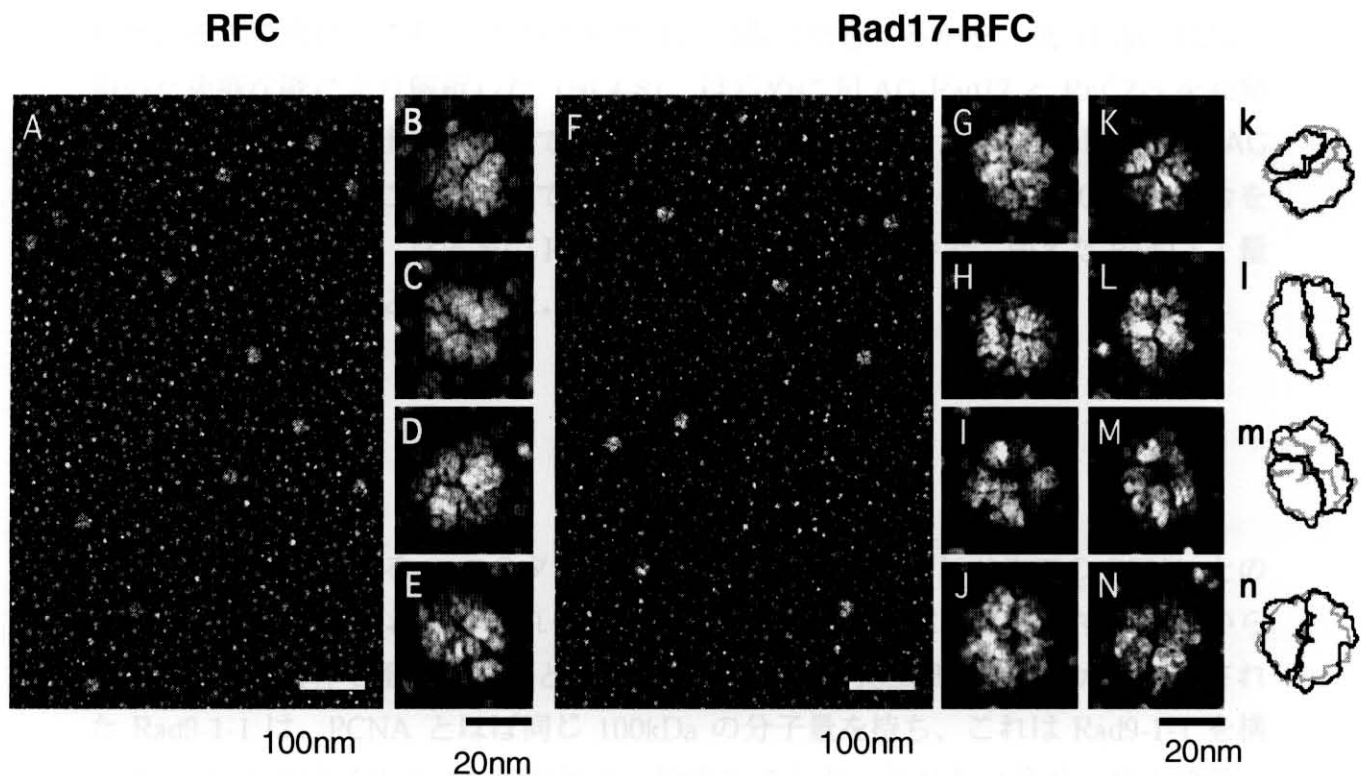


図4-7 電子顕微鏡観察によるRFCとRad17-RFCの分子構造の比較

低角度白金蒸着によるRFCの低倍率での代表的な観察像（A）と、高倍率での観察像（B-E）。同様の方法で行ったRad17-RFCの低倍率での代表的な観察像（F）と、高倍率での観察像（G-N）。K-Nの分子イメージの輪郭像をk-lとして黒線で右に示した。このK、l、m、nそれぞれに、PCNAのC、E、D、Bの分子イメージの輪郭像（灰色）を重ね合わせて示した。

Rad9-1-1 と Rad17-RFC 間結合の解析

以上の結果から、Rad17-RFC はクランプローダーとしての生化学的特性と分子構造を持ち、Rad9-1-1 はその特徴的なリング構造を持つことから、これらがチェックポイント応答で機能するクランプとクランプローダーであることが強く示唆された。そこで次に、これら 2 つの複合体が実際に結合するかを、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降により解析した (図 4-8)。はじめに FLAG-Rad17 と RFC2-5 を共発現させた昆虫細胞抽出液を用いて、Rad17-RFC 複合体が約 2 μ g 結合した抗 FLAG 抗体ビーズを得た。これに対して、精製 Rad9-1-1 を加えて Rad17-RFC との結合を解析した。その結果、反応系の Rad9-1-1 が 50 μ g/ml の条件で、加えた Rad9-1-1 量の 1/3 が Rad17-RFC と結合した。

4-4 考察

Rad9-1-1 を構成する 3 つのタンパク質は、アミノ酸配列レベルでの PCNA との類縁性が認められており、それぞれのタンパク質が互いに相互作用することから PCNA 様の複合体を形成することが示唆されてきた。昆虫細胞発現系から精製された Rad9-1-1 は、PCNA とほぼ同じ 100kDa の分子量を持ち、これは Rad9-1-1 を構成する 3 つのサブユニットの総和と一致することが示された (篠崎、修士論文、2003)。次に行った電子顕微鏡による分子観察の結果から、Rad9-1-1 は PCNA と同じ 3 つのサブユニットから成る特徴的なリング構造を持つ複合体であることが明らかとなった。クランプの代表である PCNA は、DNA ポリメラーゼの補助因子として機能するためにその中央に DNA を通すリング構造を持っている。今回、Rad9-1-1 がリング構造の複合体であることが明らかとなったことは、Rad9-1-1 も PCNA と同様にチェックポイント応答で機能するクランプであることを強く示唆した。現在、ヒト細胞内には DNA 複製はもとより、DNA 傷害乗り越えや DNA 修復、さらには染色体接着反応で機能すると考えられるポリメラーゼが 13 種類存在することが明らかにされている (Masutani and Hanaoka, 2001)。したがって、DNA 傷害、DNA 複製停止チェックポイント応答経路初期段階のセンサー/トランスデューサーと考えられている Rad9-1-1 が DNA 損傷部位の指標となり、DNA 傷害応答や修復に機能するポリメラーゼを標的部位にリクルートする機構が推測される (図 4-9)。DNA 修復関連に機能すると考えられるポリメラーゼについてはその機能などまだ不明な点も多いが、今後は Rad9-1-1 がどのポリメラーゼの補助因子として機能するのかなどを解析していくことで、チェックポイント応答で機能するクランプの役割が明らかになると考えられる。

B

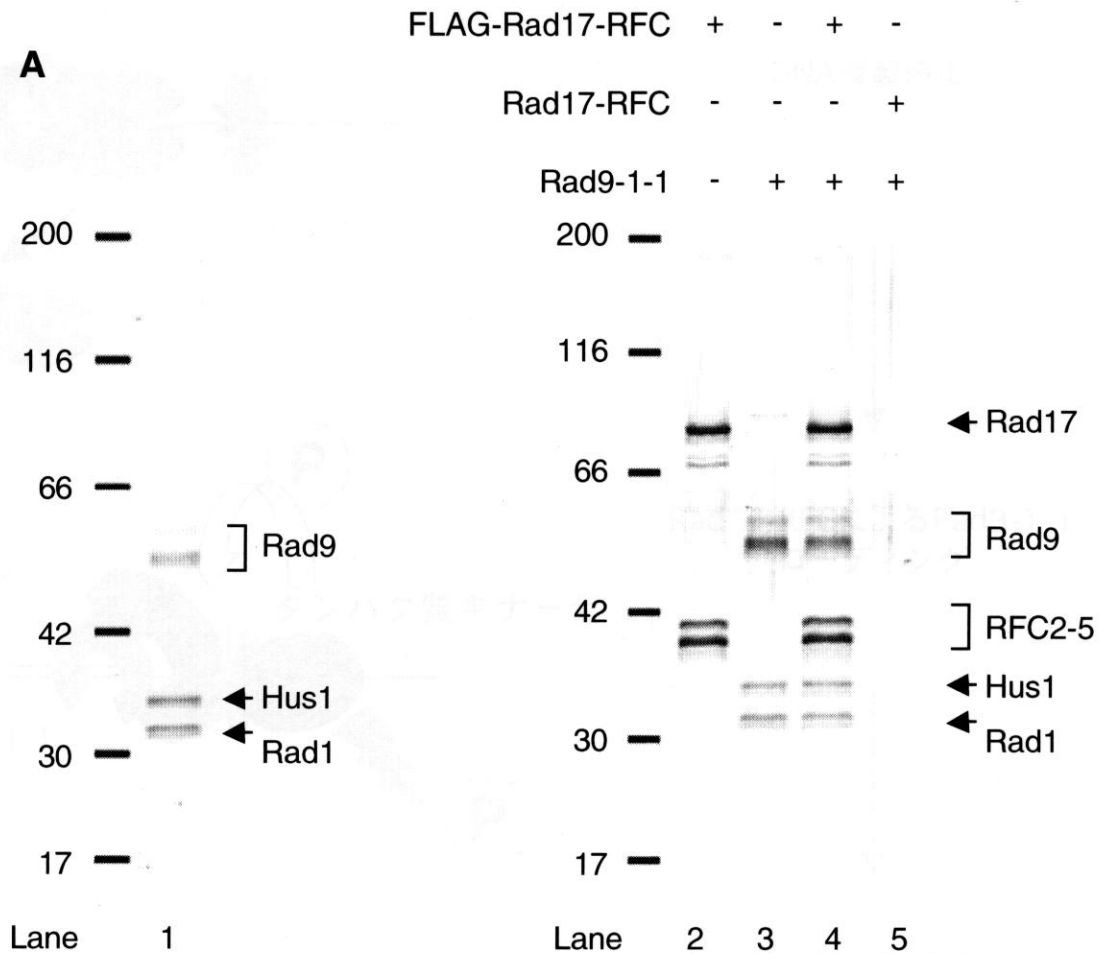


図4-8 Rad17-RFCとRad9-1-1の結合の解析

(A) グリセロール密度勾配遠心で精製したRad9-1-1 (400ng) の電気泳動プロファイル。Rad9は昆虫細胞内でのリン酸化により、複数のバンドが見られる (参考文献; Lindsey-Boltz et al., 2001)。(B) FLAG-Rad17とRFC2-5を共発現した昆虫細胞抽出液から、抗FLAG抗体でRad17-RFCを免疫沈降し (lane 2)、このRad17-RFCに対して精製したヒトRad9-1-1 (lane 3) を加えて、Rad17-RFCと共沈降されるか解析した (lane 4)。lane 5はFLAG-Rad17ではなく、タグなしRad17とRFC2-5を昆虫細胞で共発現させた抽出液からの免疫沈降。lane 3は精製Rad9-1-1 50ngを示す。パネルA、B共に4-20%アクリルアミドゲルによる電気泳動を行いAはCBB染色、Bは銀染色した。また、両パネル右側に2つの複合体を構成するサブユニットの泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した (kDa)。

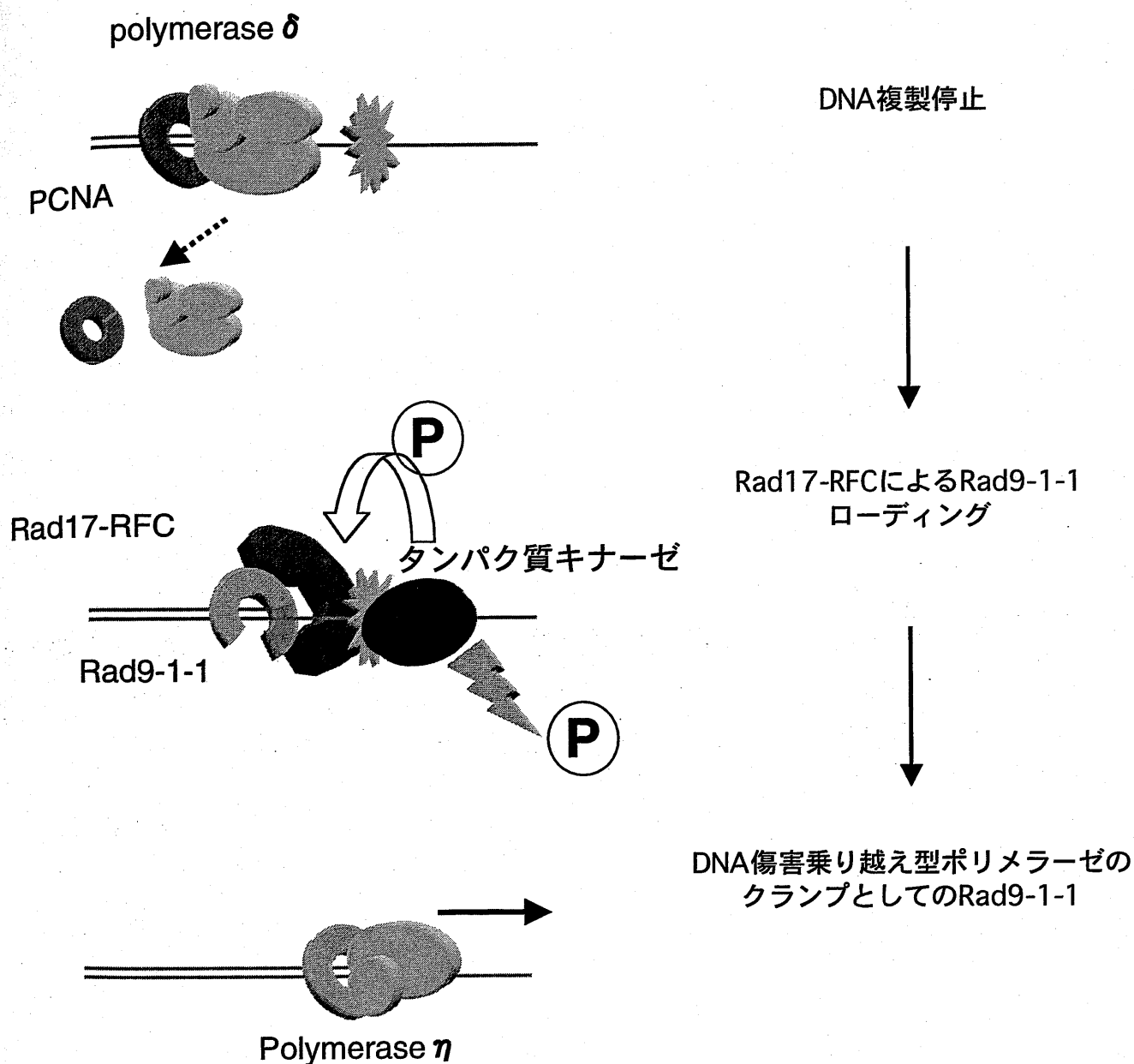


図4-9 チェックポイント応答で機能するクランプ・クランプローダー、Rad9-1-1、Rad17-RFCの反応機構のモデル

DNAに傷害部位が存在すると、複製ポリメラーゼは傷害を乗り越えられずDNA複製反応は停止する。このような傷害部位を特異的に認識するRad17-RFCにより、Rad9-1-1がロードされる。これをきっかけに、タンパク質キナーゼによるチェックポイントシグナルが下流に運ばれ、細胞周期の一時的な停止を起こす。一方、DNAにロードされたRad9-1-1はDNA傷害乗り越え型、または、DNA修復ポリメラーゼを傷害部位にリクルートし、これらの補助因子として機能するとかん考えられる。詳細は本文参照。

一方、同じチェックポイント経路で Rad9-1-1 と同様の初期段階で機能する Rad17 は、免疫沈降実験結果から 4 つの RFC 小サブユニットと安定な複合体を形成していることが示され、実際に、抗 FLAG 抗体カラムから比較的容易に Rad17-RFC 複合体を精製することができた。しかし、抗 FLAG 抗体カラムからの FLAG ペプチド溶出では、Rad17-RFC とほぼ等モルの HSC70 が混入した。この HSC70 は、FLAG ペプチドにより Rad17-RFC と共溶出することから、Rad17-RFC に結合していると考えられる。また、この HSC70 はグリセロール密度勾配遠心でも高分子から約 70kDa の沈降位置に至るまで連続的に溶出し、Rad17-RFC の画分から除去することはできなかった（データ未掲載）。熱ショックタンパク質はタンパク質の疎水性残基に結合しやすい性質を持っており、昆虫細胞内在の HSC70 が強制発現させた Rad17-RFC に結合したものと考えられる。この非特異的な結合は、 Mg^{2+} 存在下で ATP 処理を行うことで除くことができた。

最終精製段階のグリセロール密度勾配遠心では、高分子の分画からピークの位置まで連続的に Rad17 と RFC2-5 が共溶出した。また、ゲルろ過でも同じ傾向が見られ、高分子に存在するものは未変性ゲル電気泳動により、複合体が凝集したものであることがわかった。このような凝集体の形成は RFC の精製でもみられることから、クランプローダー複合体の一般的な傾向を示すと考えられる。グリセロール密度勾配遠心とゲルろ過カラムのピーク位置から求めた Rad17-RFC の真の分子量は 240kDa であり、また、精製標品の構成サブユニットのストイキオメトリーから、Rad17-RFC が 5 個のサブユニットから形成されていることが示された。このことから、Rad17 は RFC2-5 と共に、大腸菌の γ 複合体や真核生物の RFC に共通する、クランプローダーに特徴的な 5 量体型複合体を形成することが明かとなった。

Rad17-RFC は、DNA によって促進される ATPase 活性、プライマー／鋳型構造の DNA に特異的に結合する活性を有した。本解析とは別に Lindsey-Boltz らによっても、昆虫細胞発現系から精製された Rad17-RFC が前述の 2 つの生化学的活性を持つことが示され（Lindsey-Boltz et al., 2001）、この解析結果が支持された。また、Rad17-RFC は Rad9-1-1 クランプとの結合活性を有しており、この 2 つの複合体が PCNA-RFC のように対となって機能することが示された。したがって、RFC が持つ基本的な生化学的活性を Rad17-RFC が持つことから、Rad9-1-1 と共にチェックポイント応答経路でのクランプ・クランプローダー系として機能することが強く期待できる。

私は電子顕微鏡解析によって、RFC を対象に初めてクランプローダーの全体構造が U 字型構造をしていることを示したが、この構造は大腸菌の γ 複合体、古細菌の RFC でも同様であることが報告されている（Jeruzalmi et al., 2001 ; Oyama et al., 2001 ; O'Donnell et al., 2001）。したがって、この ATP 非存在下での U 字構造は、

クランプローダーに特徴的な構造であると考えられる。今回、電子顕微鏡観察によって Rad17-RFC が RFC と同じ大きさと U 字型構造を持つ複合体であることが明らかになり、Rad17-RFC もやはりクランプローダーとして機能していることが強く示唆された。また、本解析とは別に、Griffith らにより Rad9-1-1 と Rad17-RFC の電子顕微鏡解析が報告された (Griffith et al., 2002)。私が行った方法とほぼ同様の観察方法で解析された Rad9-1-1 と Rad17-RFC は、私の解析結果と同様にリング構造と、U 字構造の複合体であるとして報告され、私の解析結果が強く支持されている。

RFC の p140 と Rad17 の分子量はそれぞれ 140kDa と 76kDa であり約半分の大きさであるが、この解析で求めた RFC と Rad17-RFC の大きさには差が見られなかった。これは電子顕微鏡の分解能の限界のためであり、また、本解析で用いた低角度回転白金蒸着法が大きく影響している。それは、この方法での PCNA の直径の実測値が、X 線結晶解析から求められた直径の約 2.5 倍になることから分かるように実際の大きさを正確に反映させることができず、分子の骨格構造がほぼ同じであれば、先のサブユニットの大きさの違いは明確に区別できないと考えられる。しかしながら、PCNA の構造観察で明らかなようにタンパク質の分子構造を正確に反映させることができる本解析法は、今後のクランプ・クランプローダー複合体の解析でも有効な手段である。これまでに、ATP 非存在下での Rad17-RFC の構造解析を行ったが、この複合体も RFC と同様に ATP の添加による構造変化が予想される。したがって、今後 RFC と同様に、生化学的解析と共に Rad17-RFC の構造変化に着目して解析を進めていくことで、Rad17-RFC の Rad9-1-1 ローディング機構を解明できると考えられる。

第 5 章

娘染色体接着で機能するクランプローダー、Chl12-RFC の精製と機能解析

5-1 序

CHL12はDNA複製後の娘染色体接着に必須な遺伝子として同定され(Kouprina et al., 1993 ; 1994)、後にこの遺伝子は複製停止チェックポイントでも機能することが明らかにされた(Naiki et al., 2001)。CHL12 遺伝子がコードするタンパク質は、RFC サブユニットに高度に保存されている 6 つのモチーフを持つ、RFC ファミリーに属するタンパク質である(Cullmann et al., 1995)。このChl12もRFC2-5と複合体を形成することが示唆されており、Chl12-RFC 複合体として RFC、Rad17-RFC に続く第三のクランプローダーとして機能すると考えられた(Hanna et al., 2001 ; Mayer et al., 2001 ; Naiki et al., 2001)。これまでに、RFC の標的クランプは PCNA であり、Rad17-RFC の標的クランプは Rad9-1-1 であることが示された。しかしながら、Chl12-RFC の標的クランプは明らかにされておらず、Chl12-RFC のクランプローダーとしての機能の解析を進めていくためには、その標的クランプの同定が必要であった。しかし、当研究グループで平行して行われた、PCNA 結合タンパク質の検索でChl12が新規PCNA結合タンパク質として同定され(Ohta et al., 2002)、Chl12-RFC が PCNA を標的とするクランプローダーであることが示唆された。この知見にもとづき、バキュロウイルス発現系を用いた Chl12-RFC 複合体の再構築と PCNA ロードーとしての機能解析を行った。

5-2 材料と方法

Chl12、Chl12-RFC に対する PCNA の結合性の解析

FLAG-Chl12 単独、FLAG-Chl12 と RFC2-5、FLAG-p140 と RFC2-5 の組み合わせで発現させ、得られた昆虫細胞抽出液 50 μ l (それぞれ約 0.3mg のタンパク質量) を抗 FLAG 抗体ビーズ 3 μ l と共に、0°C で 1 時間インキュベートした。50 μ l の H バッファー (1M NaCl) で 4 回洗浄した後、50 μ l の H バッファー (0.1M NaCl) で 2 回洗浄した。この結果、それぞれ約 500ng の標的タンパク質が結合した抗 FLAG 抗体ビーズを得た。これらのビーズに対して、精製したヒト PCNA 250ng または出芽酵母 PCNA 500ng を最終体積 10 μ l で加えて 10 分間インキュベートした。50 μ l の H バッファー (0.1M NaCl) で 2 回洗浄した後、抗 FLAG 抗体に結合した蛋白

質を 20 μ l の 0.1M glycine (pH3.5) で溶出し、その 7 μ l を 4-20%ポリアクリルアミドゲル (テフコ) で電気泳動、銀染色を行った。

FLAG-Chl12-RFC の精製

FLAG-Chl12-RFC (以下、Chl12-RFC) の精製は FLAG-Rad17-RFC の精製方法にもとづいて、以下の方法で行った。操作は特記のない限り 0-4°Cで行い、全てのバッファーには終濃度 0.1mM PMSF、2 μ g/ml Leupeptin を添加し、グリセロール密度勾配遠心ではさらに終濃度 1mM DTT を加えた。FLAG-Chl12 と RFC2-5 を共発現し、得られた昆虫細胞抽出液 (36ml、タンパク質量 150mg、150cm² dish 40 枚相当) を、B バッファー (0.5M NaCl) で平衡化した DEAE Sephacel カラム (2.0 x 1.5 cm; Amersham Biosciences) で除核酸した。この画分を PC バッファー (0.5M NaCl) で平衡化した抗 FLAG 抗体カラム (anti FLAG M2-agarose affinity gel, 1ml bed; 0.8 x 1.5 cm, SIGMA) にロードした。PC バッファー (1M NaCl) でカラムを洗浄した後 5mM ATP、10mM MgSO₄ を含む PC バッファー (0.1M NaCl) 5ml でカラムを平衡化し室温で 30 分間保温した。同じバッファー 10ml でカラムを室温で洗浄した後、5mM ATP、10mM MgSO₄ を除いた PC バッファー (0.3M NaCl) 10ml でカラムを洗浄した。カラムに結合したタンパク質は 100 μ g/ml の FLAG ペプチド (F-3290; SIGMA) を含む PC バッファー (0.3M NaCl) で 200 μ l ずつ、計 4 ml で溶出した。溶出画分の 200 μ l を H バッファーで調製した 4.4ml のグリセロール密度勾配遠心 (15-35%、0.1M NaCl, pH 7.5) で 4°C、49,000 rpm で 18 時間遠心した (SW55Ti rotor, Beckman)。遠心チューブボトムから 200 μ l ずつ分画し、ATPase 活性、DNA 結合活性と共溶出した Chl12-RFC を含む画分を、後の比活性の検討に用いた。

5-3 結果

Chl12、Chl12-RFC に対する PCNA 結合性の解析

PCNA カラムによる PCNA 結合タンパク質の検索が当研究室の太田によって行われ、新規 PCNA 結合タンパク質として Chl12 が同定された (Ohta et al., 2002; 太田、博士論文、2003)。そこで、Chl12 が RFC2-5 と複合体となって PCNA ローダーとして機能する可能性を検討するため、まず、Chl12 単独、および、Chl12-RFC に対する PCNA の結合性を解析した (図 5-1)。本研究で用いた Chl12 は、2000 年以前に登録されていた cDNA にもとづいてクローニングしたもので、新たに 2001 年に登録された Chl12 より N 末端側が 196 アミノ酸短いことがわかった。この FLAG-Chl12 (以下、Chl12) を単独で、または RFC2-5 と共発現させた昆虫細胞抽

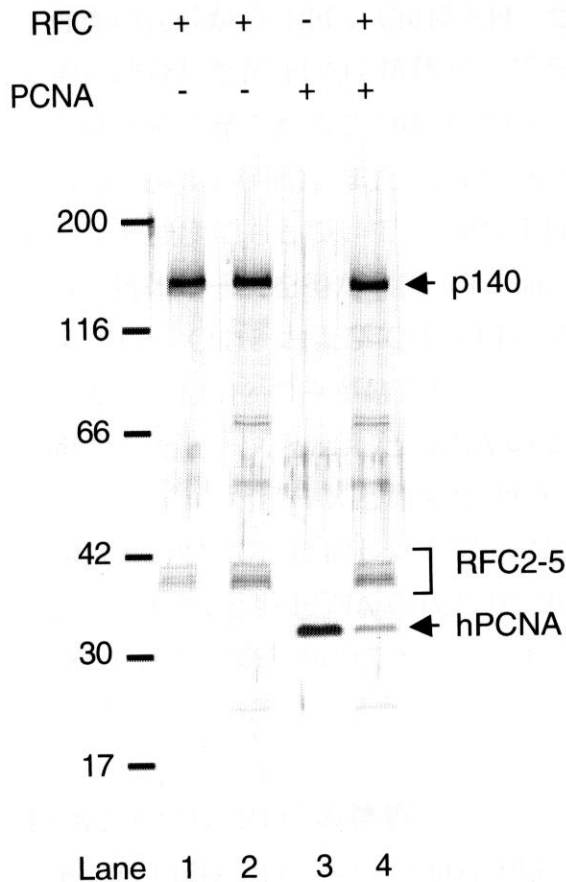
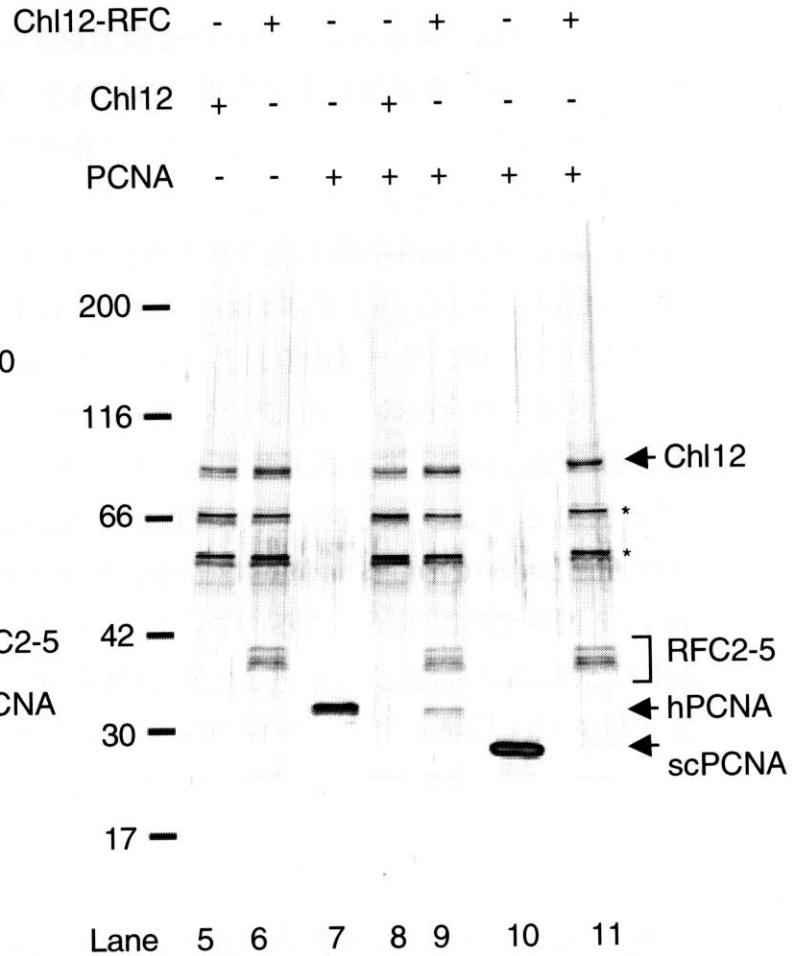
A**B**

図5-1 Chl12、Chl12-RFCとPCNAの結合の解析

(A) Chl12とPCNAの結合の解析に先立って、FLAG-p140とRFC2-5を共発現した昆虫細胞抽出液から、抗FLAG抗体でRFCを免疫沈降し (lane 2)、このRFCに対して精製したヒトPCNAを加えて、RFCにより共沈降されることを確認した (lane 4)。(B) FLAG-Chl12 単独で、または、FLAG-Chl12とRFC2-5を共発現した昆虫細胞抽出液から、抗FLAG抗体でChl12、Chl12-RFCを免疫沈降した (lane 5、6)。このChl12、Chl12-RFCに対して精製したヒトPCNAを加えてChl12、Chl12-RFCと共沈降するかを解析した (lane 8、9)。また、免疫沈降したChl12-RFCに対して出芽酵母PCNAを加えて、Chl12-RFCと共沈降するか解析した (lane 11)。lane 1は精製RFC90ng、lane 3、7はヒトPCNA25ng、lane 10は出芽酵母50ngを示す。パネルA、B共に4-20%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動を行い銀染色した。また、両パネル右側にChl12とRFC2-5、ヒト、および、出芽酵母PCNAの泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した (kDa)。パネルB、右のアステリスク (*) の位置のバンドはHSC70、HSP60である (図3-1参照)。

出液から抗 FLAG 抗体ビーズを用いて免疫沈降を行った。同時に、コントロールとして FLAG-RFC (以下、RFC) の免疫沈降を行った。この結果、RFC2-5 のバンド強度の比較から RFC、Chl12-RFC それぞれの複合体をほぼ等量 (約 500ng)、特異的に結合した抗 FLAG 抗体ビーズを得た (図 5-1, lane 2 と 6)。この時、Chl12 の免疫沈降で見られる 2 つのメジャーなコンタミバンドは、先述の HSP60、HSC70 である (図 3-1 参照)。また、Chl12 のみを発現させた昆虫細胞抽出液からは、Chl12 のバンド強度にもとづいて、Chl12-RFC 複合体とほぼ等モルの Chl12 が結合した抗 FLAG 抗体ビーズを得た (図 5-1, lane 5 と 6)。これらのビーズに対して PCNA を加え RFC、Chl12 および Chl12-RFC のそれぞれと PCNA との結合性を解析した。この結果、Chl12 のみが結合したビーズと PCNA は共沈降せず、Chl12-RFC 複合体が結合したビーズと加えた PCNA の 25% が共沈降した (図 5-2, lane 8 と 9)。また、RFC が結合したビーズと加えた PCNA の 30% が共沈降することから、Chl12-RFC と RFC に対してほぼ同じ効率で PCNA が結合していることが示された (図 5-2 lane 4 と 9)。また、ヒト PCNA の代わりに出芽酵母 PCNA を用いた場合は、加えた PCNA の 3% しか共沈降しないことから、ヒト Chl12-RFC に対して出芽酵母 PCNA は安定な結合をしないことが示された (図 4-2, lane 12)。

FLAG-Chl12-RFC の精製

FLAG-Chl12-RFC (以下 Chl12-RFC) は安定な複合体を形成し、抗 FLAG 抗体ビーズと効率良く結合したことから、その精製は FLAG-Rad17-RFC (4 章-2、-3 参照) の精製と同様に、抗 FLAG 抗体カラムとグリセロール密度勾配遠心を用いて行った。抗 FLAG 抗体カラムからの FLAG ペプチド溶出では、Rad17-RFC と同様に HSC70 に相当するタンパク質が混入したため (図 5-2, A)、FLAG ペプチド溶出の前に 10mM MgSO_4 、5mM ATP を含む PC バッファーにカラム洗浄で除去した (図 5-2, B)。抗 FLAG 抗体カラムの FLAG ペプチド溶出画分を用いた、グリセロール密度勾配遠心では他のクランプローダー複合体と同様に、(図 5-4, A) 分子量マーカーから求められる沈降係数 11.3S (232kDa) 以上の高分子量の位置から、沈降係数 4.3S の低分子側まで広い範囲で Chl12 と RFC2-5 の沈降がみられた。この電気泳動のバンド強度の定量からは、沈降係数 9.0S (150kDa) の分画位置で Chl12 と RFC2-5 が共にピークを持ち、ここにはほぼ等モルの Chl12 と RFC2-5 が含まれた (図 5-4, B)。このグリセロール密度勾配遠心での Chl12-RFC のピークの沈降位置は、同じ条件での RFC、Rad17-RFC の沈降結果と一致していた (図 3-2, B ; 図 4-2, A 参照)。

次に、このグリセロール密度勾配遠心画分を用いて ATPase 活性、DNA 結合活性を測定した。はじめに ATPase 活性を DNA 未添加の条件で測定した。その結果、Chl12-RFC の沈降のピークと一致して、フラクション番号 9、10 の ATPase 活性の

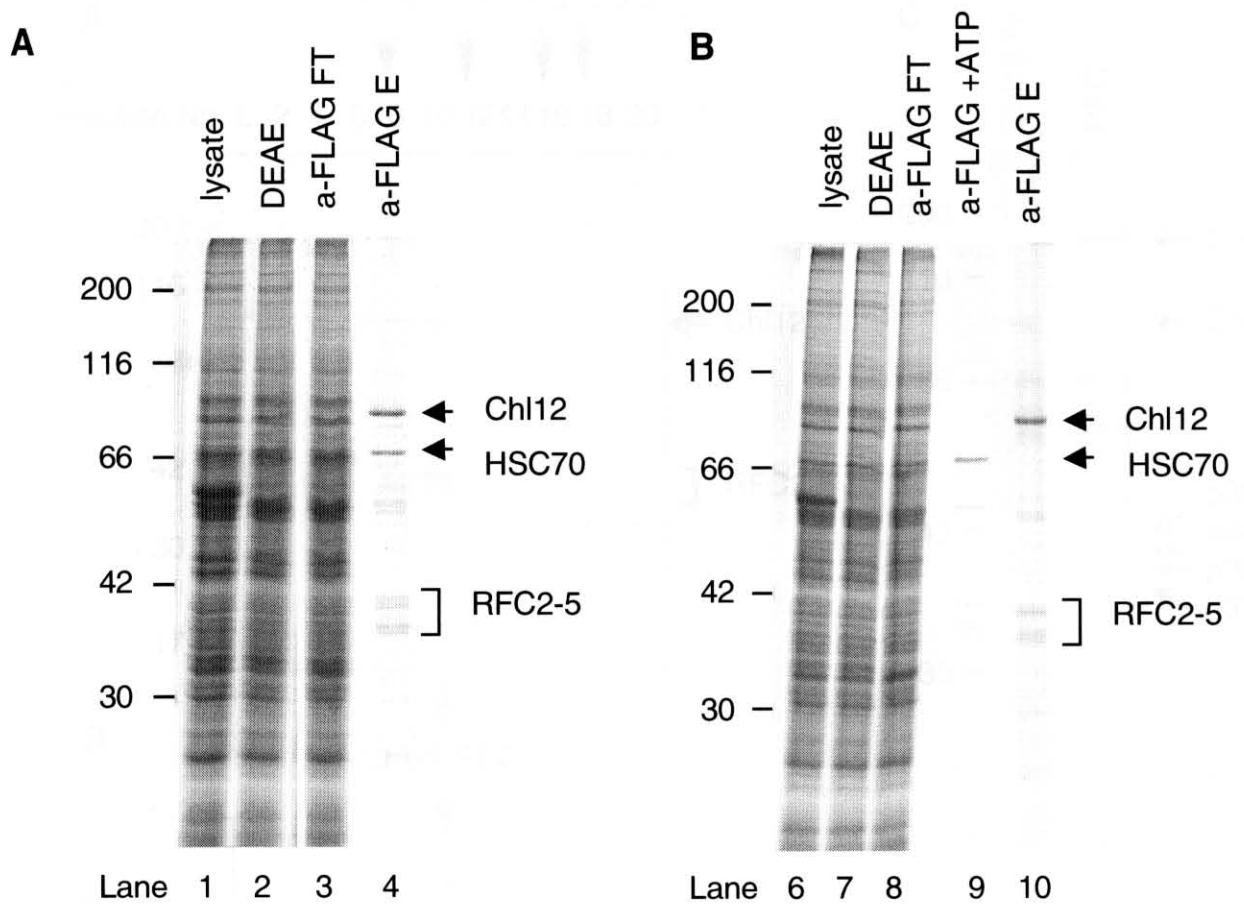


図5-2 Chl12-RFCの精製

(A) FLAG-Chl12とRFC2-5を共発現した昆虫細胞抽出液から、抗FLAG抗体カラムによりChl12-RFCを精製した。FLAGペプチドによる溶出画分で、lane 4のようにHSC70のコンタミが見られたのでMgとATPを添加したバッファーでカラムを洗浄した。その結果、(B)のlane 10に示すようにHSC70のFLAGペプチドによる抗FLAG抗体カラムの溶出画分へのHSC70のコンタミを防ぐことができた。それぞれ細胞抽出液 (lane 1と6)、DEAEカラムによる除核酸画分 (lane 2と7)、抗FLAG抗体カラムの非結合画分 (lane 3と8)、MgとATPによるカラム洗浄画分 (lane 9)、FLAGペプチドによる抗FLAG抗体カラム結合タンパク質の溶出画分 (lane 4と10)を示す。パネルA、B共に12.5%アクリルアミドゲルによる電気泳動を行いCBB染色した。また、両パネル右側にChl12とRFC2-5の泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した (kDa)。

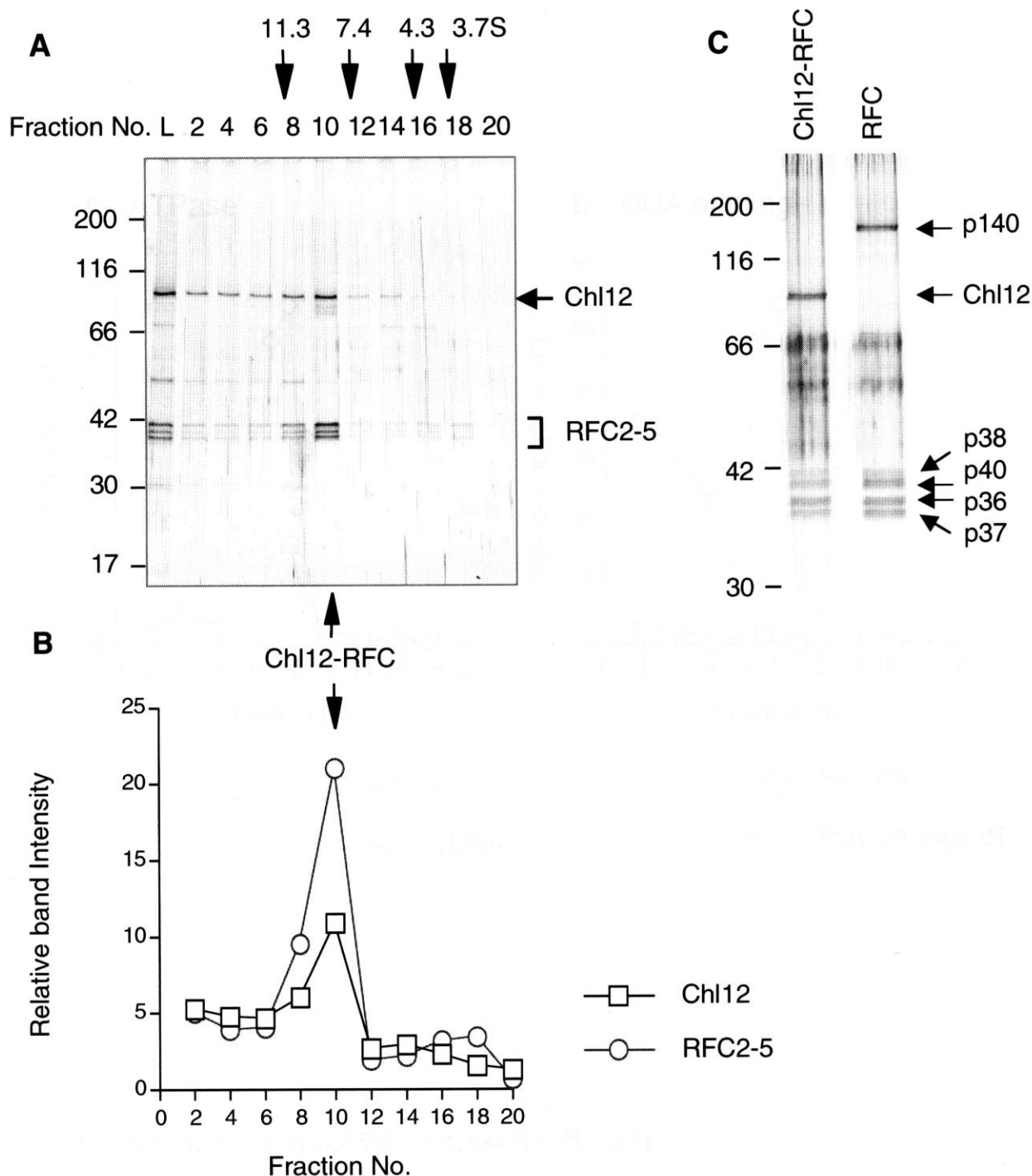


図5-3 グリセロール密度勾配遠心によるChl12-RFCの精製

(A) 抗FLAG抗体カラムからFLAGペプチドを用いて溶出したChl12-RFCを、グリセロール密度勾配遠心分画し、各画分を4-20%アクリルアミドゲルで電気泳動、銀染色を行った。パネル上部に画分の番号を示した（Lはローディングサンプル）。また、パネル右側にChl12とRFC2-5の泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した（kDa）。(B) SDS-PAGEのバンド強度から、Chl12とRFC2-5の溶出プロファイルを求めた。横軸にはフラクション番号を、縦軸にはKODAK image analysis system (2-1、材料と方法参照)により定量したバンド強度の相対値を示す。(C) Aのフラクション番号10を用いて、精製RFCと共に15%のSDS-PAGEを行った。

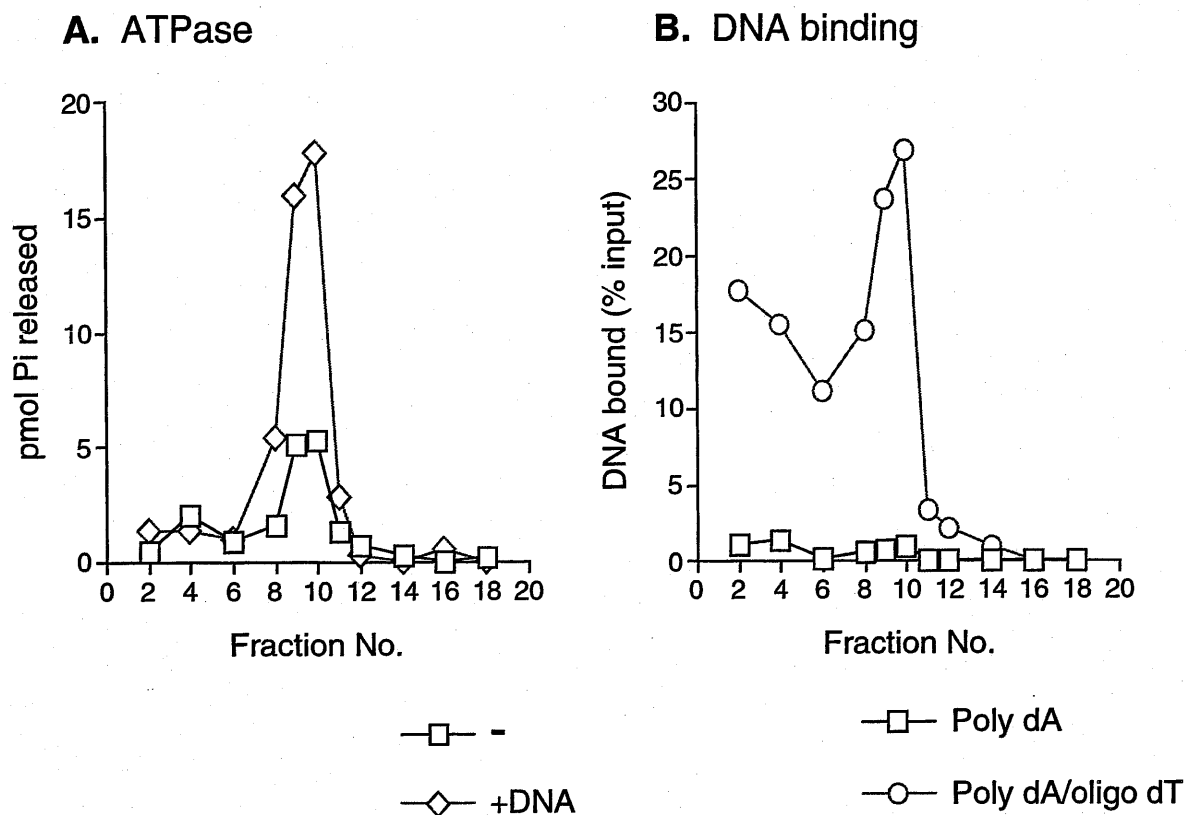


図5-4 Chl12-RFCのATPase活性、DNA結合活性の解析

(A) 図4-4のグリセロール密度勾配遠心画分を用いてATPase活性を測定した。-は単独での、+DNAはヌクレオチドモルで25 μ Mのpoly dA/oligo dTを添加した時のChl12-RFCのATPase活性を示す。フラクション番号10で25ngのChl12-RFCが反応系に加えられている。反応系に加えられたATPの総量は1000pmol。パネル下部に分画番号、縦軸にATPase活性により分解された遊離無機リンのモル数を示す。

(B) ATPase活性で用いた同様の画分を用いて、filter binding assayによるDNA結合活性の測定を行った。基質DNAとして8fmolのpoly dAまたはpoly dA/oligo dTを用いた。フラクション番号10で8ngのChl12-RFCが反応系に加えられている。パネル下部に分画番号、縦軸に加えた総DNA量に対して、Chl12-RFCと結合したDNA量の割合を示した。

ピークが得られた。また、このピークの位置の ATPase 活性は DNA の添加によって 3 倍に上昇した (図 5-5、A)。高分子に沈降したフラクション番号 4 の Chl12 と RFC2-5 の共沈降画分でも、ピークの位置の DNA 未添加での ATPase の約 1/3 の活性を示したが、DNA を加えてもその促進は全く見られなかった。一方、低分子の位置に沈降した Chl12 と RFC2-5 を含む画分では DNA 未添加、添加ともに ATPase 活性は検出されず、これらは活性型の複合体を形成していないと考えられる。

一方、filter binding assay による DNA 結合活性の測定では、どの画分を用いても poly dA との結合活性は検出されないのに対し、フラクション番号 2 から 10 の範囲で poly dA/oligo dT との結合活性が検出された (図 5-5、B)。この DNA 結合の基質特異性は RFC、Rad17-RFC と一致した。この DNA 結合活性でのピーク位置はフラクション番号 9、10 にあり、Chl12 と RFC2-5 が共沈降したピーク位置と、DNA によって促進される ATPase 活性のピーク位置と一致した。この測定では、低い ATPase 活性しか示さなかったグリセロール密度遠心勾配遠心の高分子側の画分にも高い DNA 結合活性が検出されが、これは Rad17-RFC でも同様に、精製過程で形成された Chl12-RFC2-5 の凝集体が示す活性と考えられる。

次章に行う Chl12-RFC の解析には、DNA 依存的に促進される ATPase 活性と、poly dA/oligo dT に特異的に結合する活性と共溶出したフラクション番号 9、10 のプールを精製標品として用いた。15%ポリアクリルアミド電気泳動結果から、この標品の純度は 95%以上であり、また、Chl12 を 1 としたときの 5 つのバンドの相対的強度は Chl12 : p40 : p38 : p37 : p36 = 1 : 1 : 0.6 : 0.9 : 1.4 となった (図 5-4、C)。このサブユニット間の値のふれは RFC でも同じであることから、Chl12-RFC は RFC、Rad17-RFC と同様に 5 種類のサブユニット各 1 個が集合して形成される 5 量体の複合体であることが示された。

5-4 考察

Chl12 は Rad17 と同様に、RFC 大サブユニット以外の RFC2-5 と複合体を形成することが示唆されており、第三のクランプローダーとして機能すると考えられてきたが (Hanna et al., 2001 ; Mayer et al., 2001 ; Naiki et al., 2001)、Chl12-RFC に対するクランプは明らかではなかった。しかし、PCNA 結合タンパク質として Chl12 が発見されたことにより (Ohta et al., 2002 ; 太田、博士論文、2003)、Chl12-RFC を PCNA ロードラーと考えて機能解析を進めた。

バキュロウイルスを用いた発現系から得られたヒト Chl12 はそれ単独では PCNA と結合せず、Chl12-RFC 複合体として PCNA と結合した。したがって、ヒト細胞

中の Chl12 は、RFC2-5 と複合体を形成して PCNA 結合タンパク質として検出されたと考えられる。実際に、PCNA カラムの結果では、細胞質抽出液からは RFC-p140 が検出されないにもかかわらず、Chl12 と RFC2-5 が同時に検出されている (Ohta et al., 2002)。これらの結果を総合し、細胞内では Chl12 と RFC2-5 が複合体を形成して機能していることが明らかとなった。また、再構築した Chl12-RFC の PCNA に対する結合効率は、RFC と PCNA との結合とほぼ同程度であった。Chl12-RFC 複合体中の 4 つの RFC2-5 サブユニットは、それぞれ単独で PCNA 結合活性を示すが、その PCNA 結合性は 5 量体 RFC の 1/5 であることが報告されている (Cai et al., 1997)。したがって、Chl12-RFC が RFC とほぼ同じ PCNA 結合性を示した結果は、Chl12-RFC の PCNA に対する結合には、この解析では検出されなかった、Chl12 の PCNA に対する結合性が重要であることを示している。また、タンパク質の一次構造にもとづいた機能部位の理論解析によると、p140 の Walker モチーフ A と B の間に PCNA 結合ペプチド配列類似の構造が見い出されており、クランプローダーのクランプに対する結合での大サブユニットの重要性が示唆されている。この解析報告では、この PCNA 結合配列の p140 と Chl12 の相同性から、Chl12-RFC 複合体の標的クランプが PCNA であると推測しており (Venclovas et al., 2002)、私の解析結果はこの予想が正しいことを証明したことになる。

Chl12-RFC の最終精製として行ったグリセロール密度勾配遠心では、高分子から低分子まで広い範囲で Chl12 と RFC2-5 が共沈降した。このような沈降の傾向は RFC、Rad17-RFC の精製でもみられ、クランプローダー複合体が一般的に非特異的に凝集しやすい性質を持つことを反映していると考えられる。Chl12-RFC のストークス半径は未算出だが、その沈降係数は 9.0S で、RFC と Rad17-RFC の沈降係数 8.9S とほぼ一致しており、3 種のクランプローダーがほぼ同じ分子量と分子形状を持つ複合体であることを示している。また、精製標品の構成サブユニットのストイキオメトリーからは、Chl12-RFC がクランプローダーに特徴的な 5 量体型複合体であることが示された。

Chl12-RFC は、DNA 依存的に促進される ATPase 活性、プライマー／鋳型構造の DNA に特異的に結合する活性を有し、クランプローダーとしての基本的生化学特性を持つことが示された。また、Chl12-RFC は PCNA クランプと結合し、PCNA と RFC、Rad9-1-1 と Rad17-RFC のように対となって機能することが示された。以上のことから、Chl12-RFC は PCNA と共に娘染色体接着で第三のクランプ・クランプローダー系として機能することが強く示唆された。

本研究で用いている Chl12 は、現在登録されているものよりも 196 アミノ酸 N 末端が短いために分子量 86kDa の位置に泳動される。実際、PCNA カラム結合画分の質量分析で Chl12 は分子量 108kDa に検出され、また、ヒト 293 細胞質抽出液

のウエスタンブロッティングからは約 100kDa の分子量の位置に Chl12 が検出された (データ未掲載)。そのため、用いた Chl12 が解析結果に与える影響が懸念されたが、本研究の解析結果からは、この N 末端部分は RFC2-5 との複合体形成、PCNA 結合、DNA 結合活性、ATPase 活性に直接要求されないことを示している。

第6章

3つのクランプ・クランプローダー系の活性の比較

6-1 序

以上のように RFC、Rad17-RFC、Chl12-RFC の各クランプローダー型複合体をバキュロウイルス発現系で再構築し、FLAG 抗体カラムを用いたアフィニティー精製によって得ることができた。ここで得られた2つの新規クランプローダーは、それぞれの解析から DNA 依存的に促進される ATPase、プライマー/鋳型 DNA 結合、標的クランプとの特異的な結合、といった RFC と同様のクランプローダーに必要な基本的活性を持つことが明らかとなった。したがって、細胞内では少なくとも3種のクランプ・クランプローダー系が存在し、それぞれが特異的な細胞内イベントで機能すると考えられる。そこで、これら3種のクランプ・クランプローダー系の共通性と特異性、また、それぞれの反応機構が実際にどのような役割を持ち、機能するのかを明らかにするために、3つの精製クランプローダー複合体の活性の比較を行った。

6-2 材料と方法

クランプローダーによる、クランプの共沈降

3章での免疫沈降によるクランプローダー複合体形成の解析結果にもとづき、昆虫細胞抽出液 RFC は $25\mu\text{l}$ 、Rad17-RFC は $50\mu\text{l}$ 、Chl12-RFC は $20\mu\text{l}$ [最終体積は B バッファー (0.5M NaCl) で $50\mu\text{l}$ に調整した] と $3\mu\text{l}$ の抗 FLAG 抗体ビーズを 0°C で1時間インキュベートした。 $50\mu\text{l}$ の H バッファー (1M NaCl) で4回洗浄した後、 $50\mu\text{l}$ の H バッファー (0.1M NaCl) で2回洗浄した。この結果、約 $0.2\mu\text{g}$ の標的タンパク質が結合した抗 FLAG 抗体ビーズを得た。このビーズに対して、精製した PCNA または Rad9-1-1 を最終体積 $10\mu\text{l}$ の H バッファー中に 2.5、5、10、20ng 加えて10分間インキュベートした。 $50\mu\text{l}$ の H バッファー (0.1M NaCl) で2回洗浄した後、抗 FLAG 抗体に結合したタンパク質を $20\mu\text{l}$ の 0.1M グリシン (pH3.5) で溶出し、その $10\mu\text{l}$ を 4-20% ポリアクリルアミドゲル (テフコ) で電気泳動し、銀染色を行った。一方で、グリシン溶出画分の $10\mu\text{l}$ を 12.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い、抗 PCNA 抗体 (MBL、名古屋)、または、抗 Rad9、Hus1、Rad1 ポリクローナル抗体 (名古屋大学理学研究科、杉本勝則博士より供与された) の混合液を用いてウェスタンブロッティングを行い、共沈降したク

ランプを定量した。

ATPase 活性

ATPase 活性の検出は、4 章-2 材料と方法での記述に従い行った。また、必要に応じてヌクレオチド濃度で $25\mu\text{M}$ の DNA [poly dA または poly dA/oligo dT (ヌクレオチド濃度で 5:1)、dsDNA (pUC118 を HaeIII 制限酵素処理したもの)]、300ng の PCNA または Rad9-1-1 を反応系に加えた。

DNA 結合活性

DNA 結合活性測定 of 基質として用いた 3'末端を持つヘアピン状の DNA (HP96) は、Tsurimoto ら (Tsurimoto and Stillman, 1991) の報告に従い合成し (サワデーテクノロジー、東京)、この 5'末端を ^{32}P でラベルし、Filter binding assay を行った (4 章-2 材料と方法参照)。

クランプローディングアッセイ

基質 DNA となる、平均 1 カ所のニックを入れた開環状二本鎖 pUC118 の作製は、以下の方法で行った。mHBS バッファー [10mM HEPES ($\text{pH}7.5$)、 0.05% Tween20、 10mM MgCl_2 、 0.2mM EDTA、 0.15M NaCl] $50\mu\text{l}$ 中で $15\mu\text{g}$ の pUC118 を、DNaseI (0.01unit 、Boehringer Ingelheim、Germany) と 37°C で 3 分間インキュベートした後、等量のフェノール/クロロホルム (1:1) を加えて反応を止め、エタノール沈澱を行なった。回収した DNA は $50\mu\text{l}$ の TE に懸濁して、開環状二本鎖 pUC118 ($300\mu\text{g/ml}$) を得た。

クランプローディング反応は、Iida ら (Iida et al., 2002) の方法で行った。 $20\mu\text{l}$ の mHBS 反応液を終濃度 2mM ATP (または ATP γS) と 30 、 90 、 150mM の NaCl 濃度になるように調整し、図に示した量の各クランプローダーと、 100ng の PCNA または Rad9-1-1 を加えて室温で 15 分間インキュベートした。DNA と結合したタンパク質は、同じバッファーで平衡化した 0.2ml の sepharose CL4B (Amersham Bioscience) スピニングカラムで excluded 画分として回収した。2 度のスピニングカラムの後、回収した反応産物の半分量 (約 $9\mu\text{l}$) を 4 - 12% の Bis-Tris ポリアクリルアミドゲルと、MOPS SDS 泳動バッファー (NOVEX) で電気泳動し、銀染色した。Rad9-1-1 の検出は銀染色と同時に、 12.5% ポリアクリルアミドゲルでの電気泳動後、抗 Rad1 ポリクローナル抗体によるウエスタンブロッティングを行った。

6-3 結果

クランプ-クランプローダー間結合特性の解析

これまでの解析から RFC と Chl12-RFC は PCNA を、Rad17-RFC は Rad9-1-1 を標的クランプとすることが示された。しかしながら、各クランプ・クランプローダー間相互の結合特異性は明らかではない。そこで、再構築系から精製した3つのクランプローダーと2つのクランプを用いて、クランプ・クランプローダー間の結合特性の解析を行った。3章でのクランプローダーの免疫沈降実験から推定した細胞抽出液中の各クランプローダー濃度をもとにして、細胞抽出液量を調整して各クランプローダーが 200ng 結合した抗 FLAG 抗体ビーズを得た (図 6-1)。この抗 FLAG 抗体ビーズに対して 2.5、5、10、20ng の PCNA または Rad9-1-1 (モル比で、200ng のクランプローダーの 1/32、1/16、1/8、1/4 量に相当) を加えてクランプローダーと共に共沈降したクランプをウェスタンブロットにより定量、グラフ化し、その傾きから加えたクランプ量に対して共沈降したクランプ量の割合を求め、そこからおよそその結合定数 (K_a) を求めた。はじめに、RFC と PCNA との結合を解析した結果、これらは $K_a = 2.6 \times 10^6$ と求められた (図 6-2、A と a)。これに対して、RFC と Rad9-1-1 との結合はウェスタンブロットで X 線フィルムに長時間露光しても検出することができなかった (図 6-2、B と b)。したがって、RFC は Rad9-1-1 とは結合せず、PCNA と特異的に結合することが示された。次に、Chl12-RFC と PCNA との結合の解析を行った。その結果、これらは $K_a = 3.2 \times 10^6$ (図 6-3、A と a) となり、Chl12-RFC は PCNA に対して、RFC とほぼ同じ結合性を持つことが示された。一方、Chl12-RFC と Rad9-1-1 との結合は RFC と同様に検出できなかった (図 6-3、B と b)。同様の方法で、Rad17-RFC の解析を行った。その結果、Rad17-RFC と Rad9-1-1 は $K_a = 1.1 \times 10^7$ (図 6-4、B と b) の高い結合を示したが、PCNA とは $K_a = 6.4 \times 10^4$ の結合性で、これは Rad9-1-1 との結合性の 1/150 以下であった (図 6-4、A と a)。この Rad17-RFC と PCNA の結合は、RFC および Chl12-RFC と PCNA の結合性の 2% 相当にすぎない。このことから、Rad17-RFC は Rad9-1-1 に対して高い結合特異性を有することがわかった。以上の結果から、Chl12-RFC と RFC は PCNA を特異的な標的クランプとし、Rad17-RFC は Rad9-1-1 を特異的な標的クランプとすることが明かとなった。

ATPase 活性の比較

次に、各クランプローダーの ATPase 活性を解析した (図 6-5)。RFC の ATPase 活性は DNA 依存的に促進されるが、DNA と PCNA の同時添加でさらに促進される。したがって、Rad17-RFC と Chl12-RFC の ATPase 活性が DNA と、それぞれの

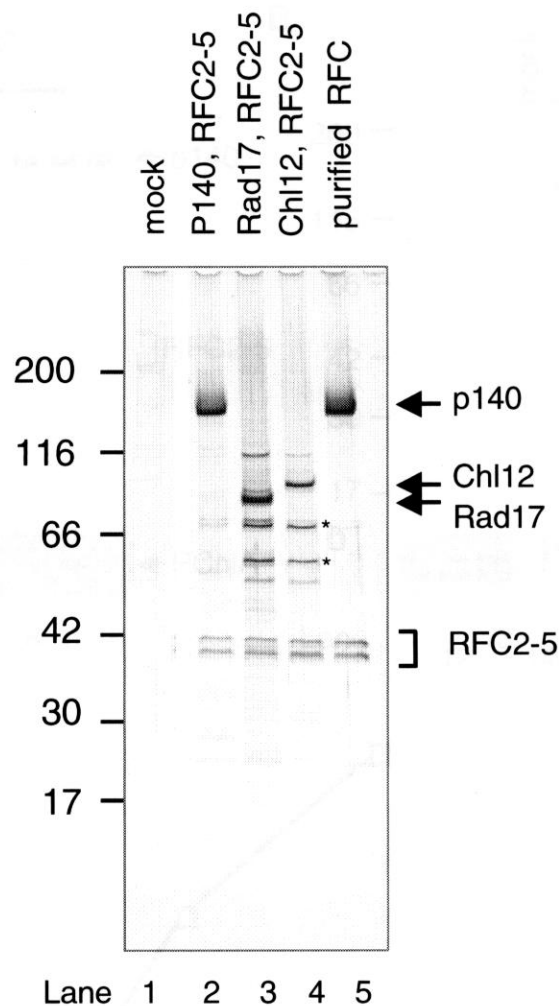


図6-1 3つのクランプローダーの昆虫細胞抽出液からの免疫沈降

クランプ・クランプローダ間結合の解析に先立って、FLAGタグを付加したp140、Rad17、Chl12をそれぞれRFC2-5と共に共発現させた昆虫細胞抽出液から抗FLAG抗体を用いて等量（200ng）免疫沈降する条件の確認をおこなった。免疫沈降した複合体をグリシンで溶出し、その半量を電気泳動した。レーンはそれぞれ非感染抽出液（1）、RFC（2）、Rad17-RFC（3）、Chl12-RFC（4）の感染抽出液からの免疫沈降を示す。レーン5は精製RFC100ng。電気泳動は4-20%アクリルアミドゲルで行い銀染色した。また、パネル右側にp140、Rad17、Chl12とRFC2-5の泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した（kDa）。パネル中のアステリスク（*）の位置のバンドはHSC70、HSP60である（図3-1参照）。

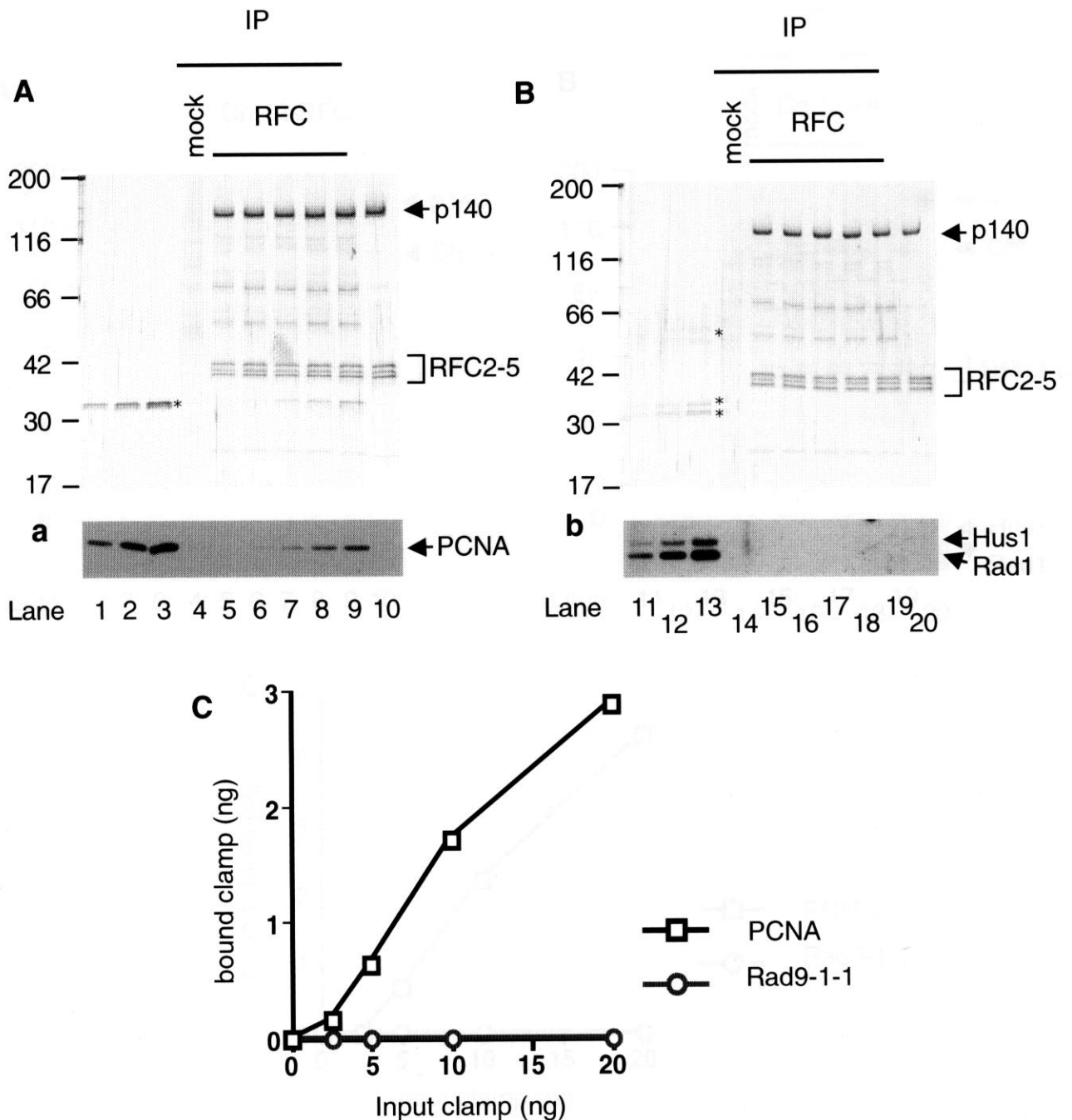


図6-2 RFCとクランプとの結合性の解析

RFCとPCNA、Rad9-1-1間の結合のプルダウン法による解析。FLAGタグを付加したp140とRFC2-5を共発現させた昆虫細胞抽出液から、RFCが200ng結合した抗FLAG抗体ビーズに対して2.5、5、10、20ngのPCNA (A, lane5-9) またはRad9-1-1 (B, lane15-19) を加えて、RFCと共沈降するクランプ量を求めた。ネガティブコントロールのレーン4および14にはそれぞれ、20ngのPCNAまたはRad9-1-1を加えた。免疫沈降された複合体はグリシンで溶出し、その半量を4-20%ポリアクリルアミド電気泳動を行い銀染色した。パネルAの*はPCNAの位置を示し、パネルBの*は上からRad9、Hus1、Rad1を示す。同時にウエスタンブロットを行い、それぞれPCNA (a)、Hus1とRad1 (b)を検出した。レーン1-3、11-13は精製したPCNAまたはRad9-1-1各1.25、2.5、5ngを示す。レーン11-13の銀染色については精製Rad9-1-1各2.5、5、10ngを示す。レーン10および20は精製RFC100ng。p140とRFC2-5のバンド強度から、ビーズに結合したRFCが200ngと確認できる。パネルA、Bの右側に各タンパク質の泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した (kDa)。(C.) パネルa、bのウエスタンブロットのバンド強度から、RFCに結合したクランプ量を求めてグラフに示した。横軸に加えたクランプ量、縦軸にRFCと共沈降したクランプ量を示した。

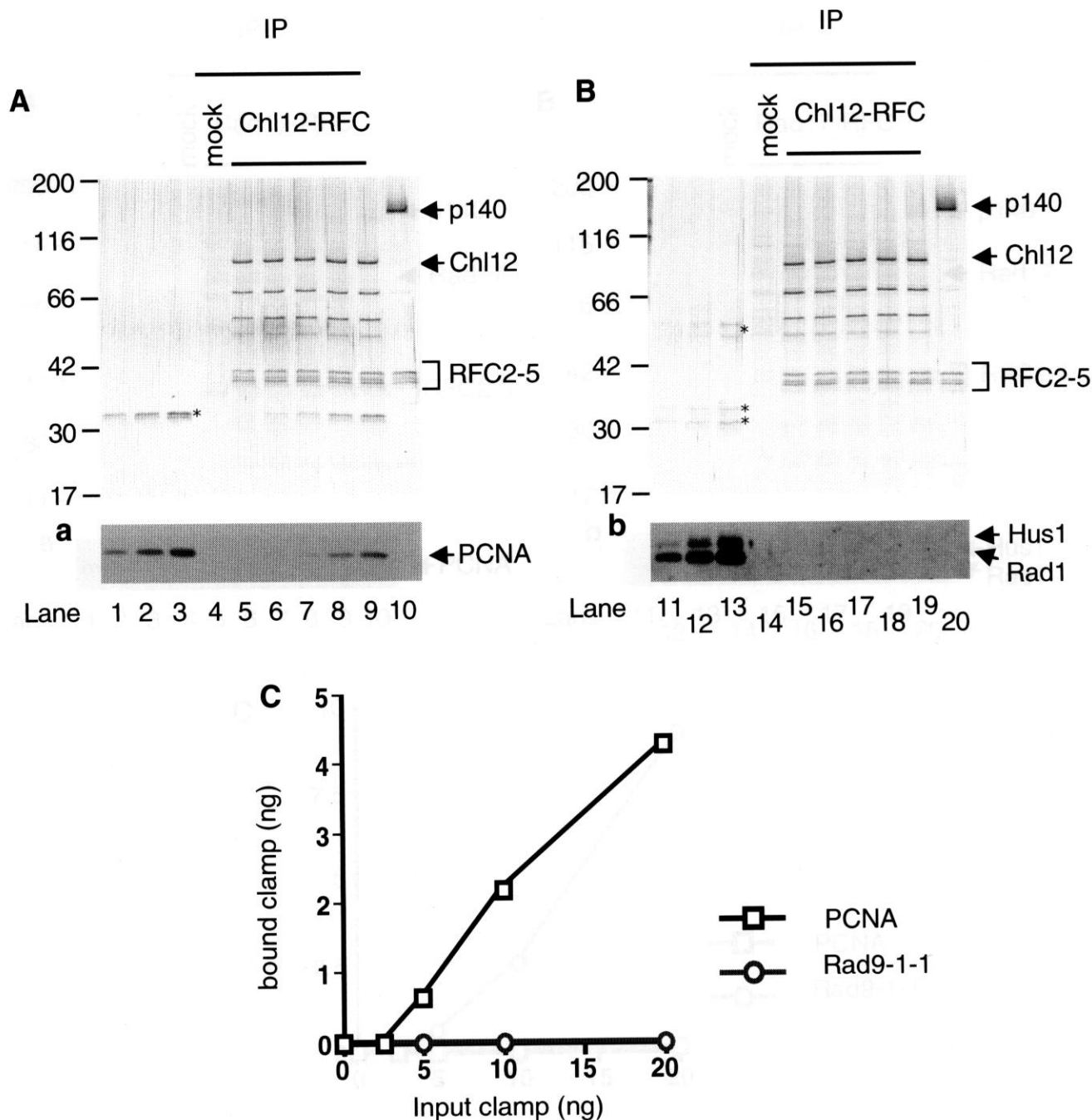


図6-3 Chl12-RFCとクランプとの結合性の解析

Chl12-RFCとPCNA、Rad9-1-1間の結合のプルダウン法による解析。FLAGタグを付加したChl12とRFC2-5を共発現させた昆虫細胞抽出液から、RFCが200ng結合した抗FLAG抗体ビーズに対して2.5、5、10、20ngのPCNA (A, lane5-9) またはRad9-1-1 (B, lane15-19) を加えて、RFCと共沈降するクランプ量を求めた。ネガティブコントロールのレーン4および14にはそれぞれ、20ngのPCNAまたはRad9-1-1を加えた。免疫沈降された複合体はグリシンで溶出し、その半量を4-20%ポリアクリルアミド電気泳動を行い銀染色した。パネルAの*はPCNAの位置を示し、パネルBの*は上からRad9、Hus1、Rad1を示す。同時にウエスタンブロットを行い、それぞれPCNA (a)、Hus1とRad1 (b) を検出した。レーン1-3、11-13は精製したPCNAまたはRad9-1-1各1.25、2.5、5ngを示す。レーン11-13の銀染色については精製Rad9-1-1各2.5、5、10ngを示す。レーン10および20は精製RFC100ng。P140とRFC2-5のバンド強度から、ビーズに結合したRFCが200ngと確認できる。パネルA、Bの右側に各タンパク質の泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した(kDa)。(C.) パネルa、bのウエスタンブロットのバンド強度から、RFCに結合したクランプ量を求めてグラフに示した。横軸に加えたクランプ量、縦軸にRFCと共沈降したクランプ量を示した。

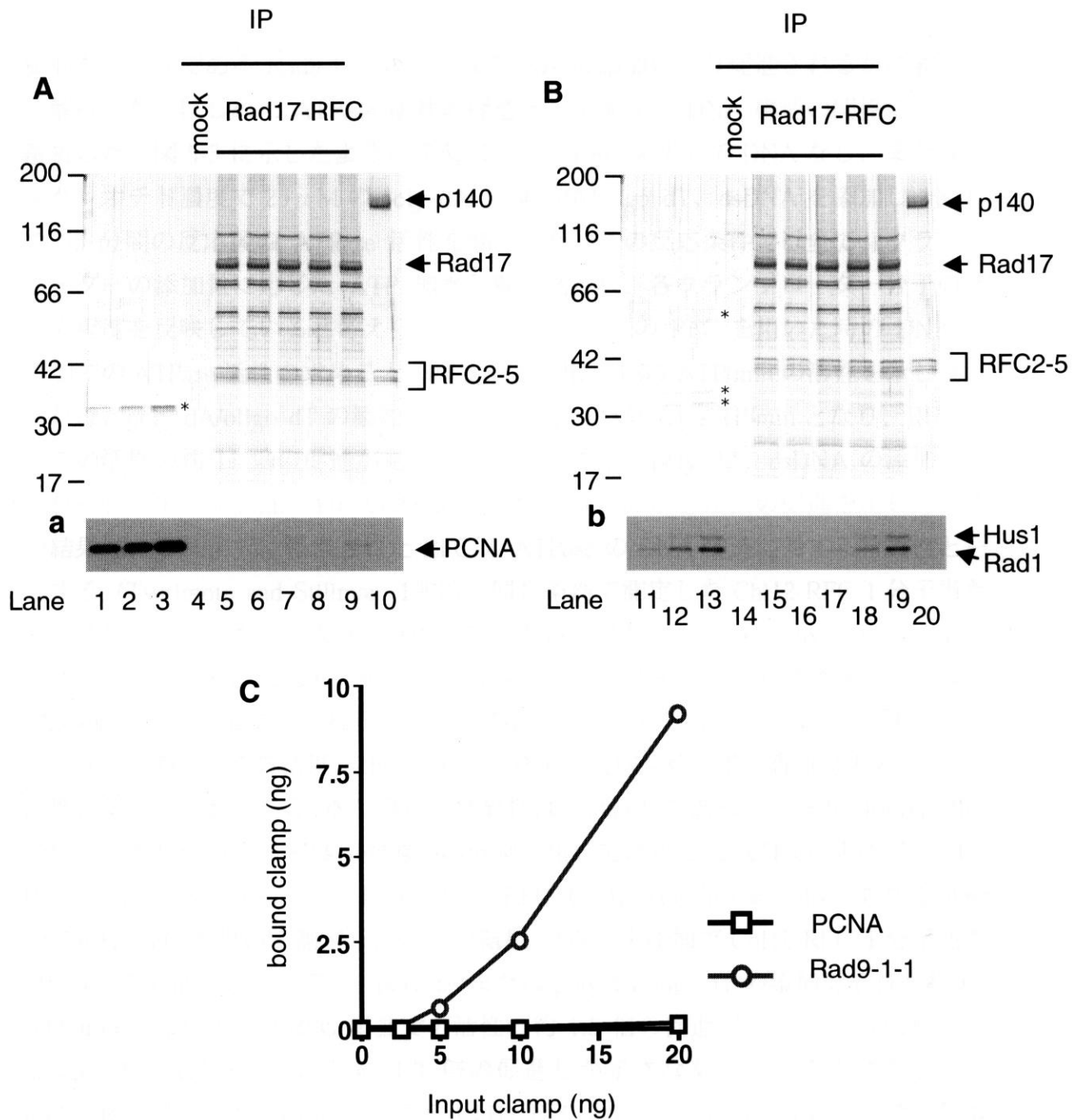


図6-4 Rad17-RFCとクランプとの結合性の解析

Rad17-RFCとPCNA、Rad9-1-1間の結合のプルダウン法による解析。FLAGタグを付加したRad17とRFC2-5を共発現させた昆虫細胞抽出液から、RFCが200ng結合した抗FLAG抗体ビーズに対して2.5、5、10、20ngのPCNA (A, lane5-9) またはRad9-1-1 (B, lane15-19) を加えて、Rad17-RFCと共沈降するクランプ量を求めた。ネガティブコントロールのレーン4および14にはそれぞれ、20ngのPCNAまたはRad9-1-1を加えた。免疫沈降された複合体はグリシンで溶出し、その半量を4-20%ポリアクリルアミド電気泳動を行い銀染色した。パネルAの*はPCNAの位置を示し、パネルBの*は上からRad9、Hus1、Rad1を示す。同時にウエスタンブロットを行い、それぞれPCNA (a)、Hus1とRad1 (b) を検出した。レーン1-3、11-13は精製したPCNAまたはRad9-1-1各1.25、2.5、5ngを示す。レーン10および20は精製Rad17-RFC100ng。P140とRFC2-5のバンド強度から、ビーズに結合したRFCが200ngと確認できる。パネルA、Bの右側に各タンパク質の泳動位置を、左側にはサイズマーカーによる分子量を示した (kDa)。(C.) パネルa、bのウエスタンブロットのバンド強度から、RFCに結合したクランプ量を求めてグラフに示した。横軸に加えたクランプ量、縦軸にRFCと共沈降したクランプ量を示した。

標的クランプである Rad9-1-1 あるいは PCNA の添加により促進されるかに着目して解析した。はじめに ATPase 活性の促進と、添加する DNA 構造の関係について解析した。図 5-5 に示したように 7.5、15ng の RFC を用いて DNA なし、または、ヌクレオチド濃度で 25 μ M の poly dA、poly dA/oligo dT、dsDNA を添加し、37°C で 30 分間の反応後の ATPase 活性を測定した。この反応条件では全て、クランプローダーの添加量に応じた ATP 加水分解が見られ、各クランプローダー分子の活性の程度を反映していると考えられる。まず、15ng の RFC を用いた時の DNA 未添加での ATPase 活性を求めると、RFC 1 分子当たり 0.7 ATP/min.の活性を示した。これは、poly dA/oligo dT の添加で RFC 1 分子当たり 7.1 ATP/min.となり、RFC 単独での活性の約 11 倍の促進が見られた。これに対し poly dA、dsDNA の添加ではそれぞれ 3.9 ATP/min.、4.0 ATP/min.となり、いずれも約 6 倍の促進を示した。この結果は、これまでに報告された RFC の ATPase の DNA 構造に対する特異性と一致する (Tsurimoto and Stillman, 1990)。同じ条件で測定した Chl12-RFC 1 分子当たりの ATPase 活性は、DNA 未添加で 0.7 ATP/min.であったのが、poly dA/oligo dT の添加で 6.3 ATP/min.となり Chl12-RFC 単独での活性の約 9 倍の促進がみられ、poly dA、dsDNA の添加ではそれぞれ 3.8 ATP/min.、3.4 ATP/min.となり、いずれも約 5 倍に促進された。この結果、RFC と Chl12-RFC の DNA 依存的に促進される ATPase 活性に対して、添加する DNA 構造の特異性はほぼ同じであった。一方、Rad17-RFC についてはグリセロール密度勾配遠心の分画を用いて測定した ATPase 活性が Chl12-RFC の活性の 1/2 から 1/3 であったので、RFC、Chl12-RFC 量の約 3 倍にあたる 50ng の Rad17-RFC を用いて測定した。その結果、DNA 未添加で Chl12-RFC 1 分子当たり 1.0 ATP/min.であったのが、poly dA または poly dA/oligo dT の添加でそれぞれ 1.5 ATP/min.となり Chl12-RFC 単独での活性の約 1.5 倍の促進がみられ、dsDNA の添加では 1.3 ATP/min.となり約 1.3 倍の促進しか示さなかった。この結果から、Rad17-RFC の ATPase 活性は RFC や Chl12-RFC とは異なり、DNA による活性促進はほとんど見られず、プライマー末端構造に対する特異性もないことが分かった。

次に、クランプローダー単独、poly dA/oligo dT の添加、poly dA/oligo dT と PCNA または Rad9-1-1 の同時添加の各条件で、37°Cでの ATP 分解量を 10 分間隔で 30 分まで測定した。またこの結果から、10 分間反応した時点での遊離無機リンの量から ATP 分解速度を求めた (図 5-6)。その結果、RFC 単独では 2.1 ATP/min.、DNA の添加により 14.2 ATP/min.、DNA と PCNA の同時添加によって 23.7 ATP/min.と求められ、その ATP 分解速度が DNA の添加、DNA と PCNA の同時添加によってそれぞれ約 7 倍と 11 倍に促進された。次に、Chl12-RFC の ATP 分解速度を同じ条件で測定した結果、Chl12-RFC 単独で 3.1 ATP/min.が DNA 添加で 13.8 ATP/min.、DNA と PCNA の同時添加で 17.9 ATP/min.となり、Chl12-RFC 単独に対してそれぞ

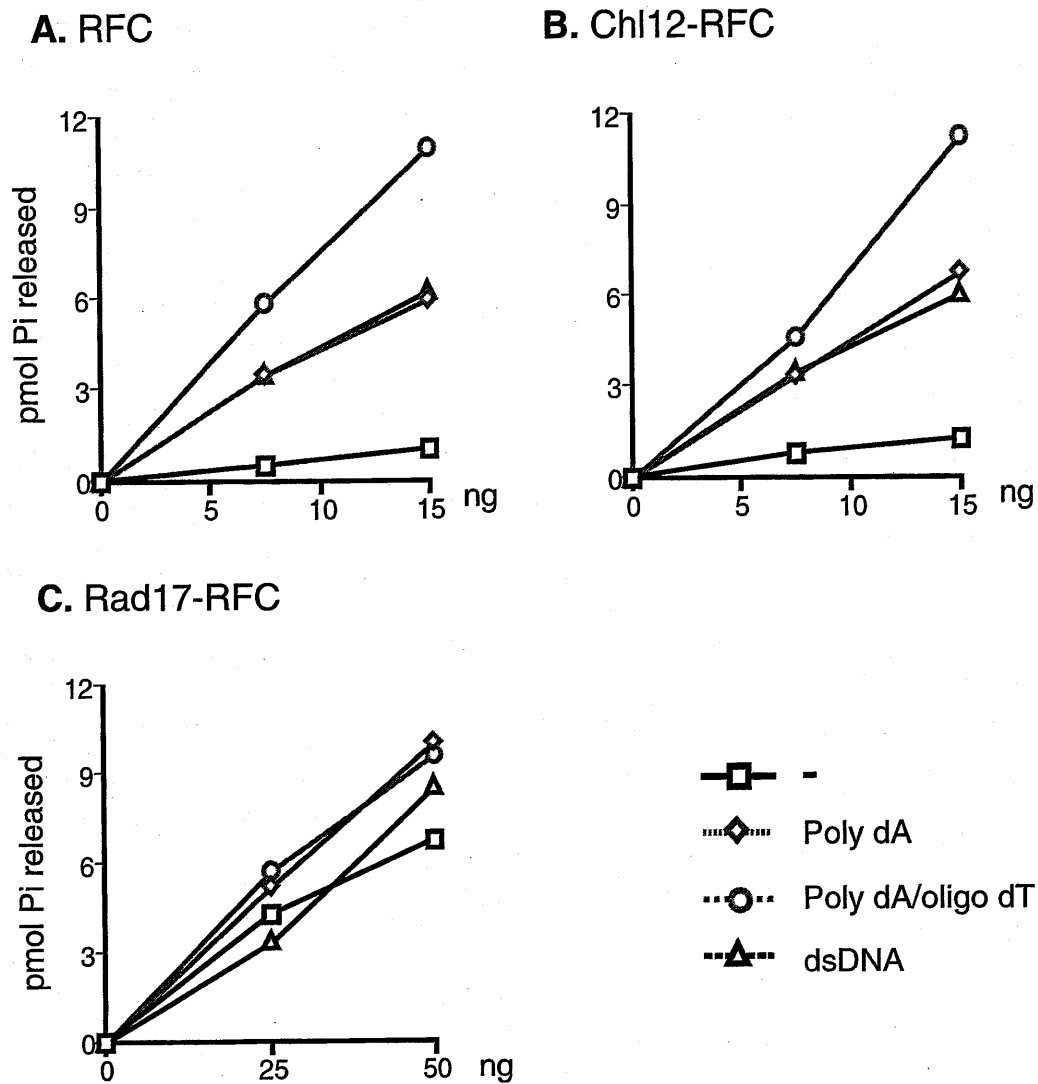


図6-5 ATPase活性のDNA構造特異的促進の解析

DNA 依存的に促進される (A) RFC、(B) Chl12-RFC、(C) Rad17-RFC の ATPase 活性を DNA なし、poly dA、poly dA/oligo dT、dsDNA (pUC118 を HaeIII で制限酵素処理したもの) 添加の各条件で比較した。グラフ横軸には反応系に加えたタンパク質量を、縦軸には分解された ATP 由来の遊離無機リンのモル数を示した。

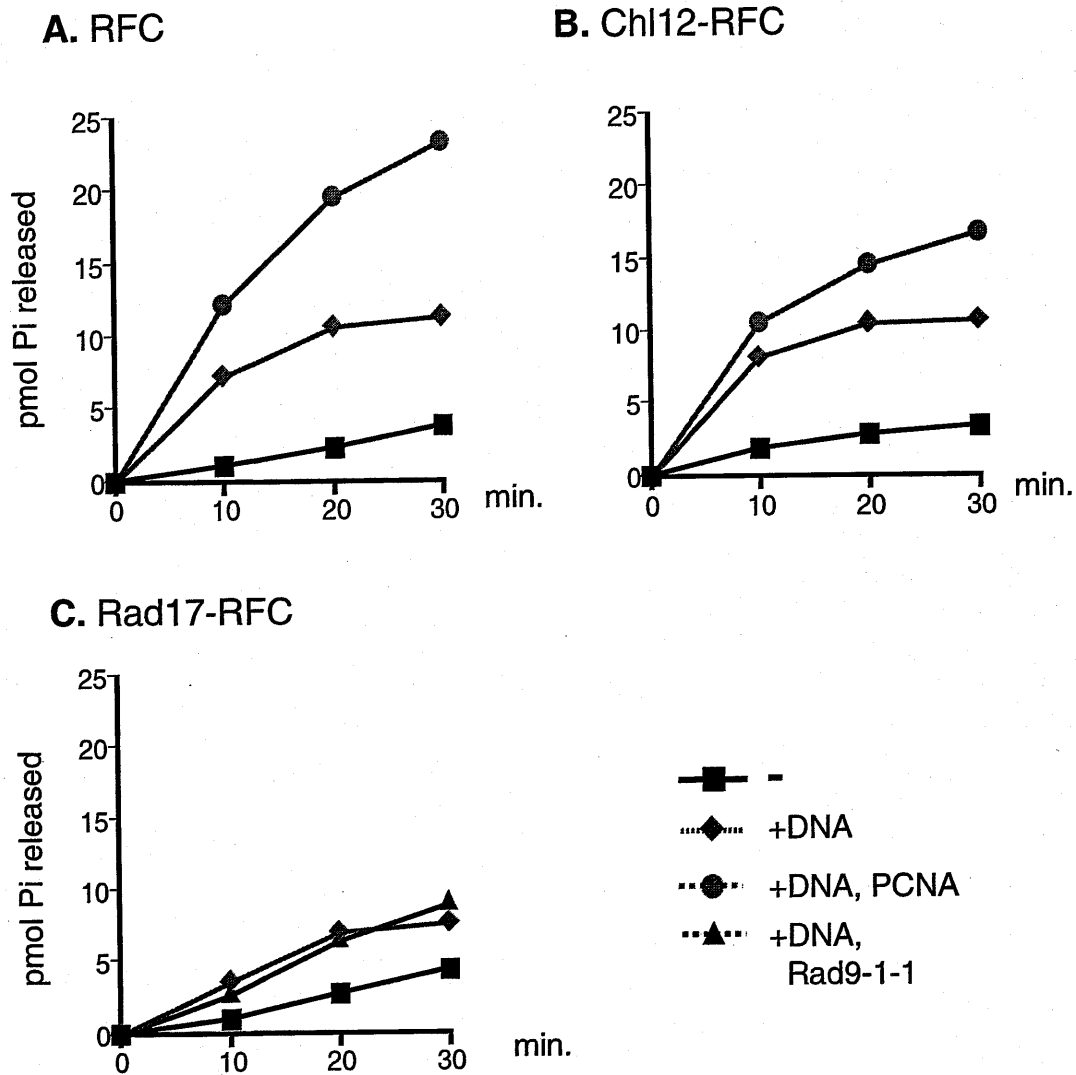


図6-6 ATPase活性のDNAとクランプ依存的促進の解析

DNAとクランプ依存的に促進される (A) RFC、(B) Chl12-RFC、(C) Rad17-RFCのATPase活性を、15ngのRFCとChl12-RFC、40ngのRad17-RFCを用いてDNAなし、poly dA/oligo dT添加、poly dA/oligo dTとPCNAまたはRad9-1-1添加の各条件で、図に示す各時間でのATP由来の遊離無機リンのモル数を求めた。グラフ横軸には反応時間を、縦軸にはATP由来の遊離無機リンのモル数を示した。

れ約 4 倍、6 倍、とその程度は RFC より低いものの、RFC と同様に DNA と PCNA に依存してその ATPase 活性が促進されることが明らかとなった。一方、Rad17-RFC については単独で 0.6 ATP/min.、DNA の添加で 2.2 ATP/min.と約 4 倍の分解速度の上昇がみられたが、これに Rad9-1-1 を添加すると 1.6 ATP/min.となり、それ以上の促進はみられず、逆に活性が減少した。

この解析の前半部の DNA 構造に対する特異性の解析では RFC、Chl12-RFC、Rad17-RFC 単独での活性が poly dA/oligo dT の添加によってそれぞれ 11、9、1.5 倍に促進される結果を得た。引き続き行った、DNA とクランプに依存した ATPase 活性の解析では、それぞれ同じタンパク質、poly dA/oligo dT を用いて同じ反応液中で測定したにもかかわらず、RFC、Chl12-RFC、Rad17-RFC 単独での活性が poly dA/oligo dT の添加によってそれぞれ 7、4、4 倍に促進され、はじめに示したのとは異なる結果となった。これらの解析は、それぞれ独立して一度行っただけなので、どちらの結果が正しいとは言えないが、図 6-5 の 37℃、30 分間のインキュベートでは、図 6-6 でみられるようにすでに反応が飽和した状態である。したがって、考察では図 6-6 の結果をもとに 37℃、10 分間のインキュベートでの ATPase 活性にもとづき比較を行った。

DNA 結合活性の比較

すでに Rad17-RFC、および、Chl12-RFC はプライマー／鋳型構造を持つ DNA に特異的に結合することを示した。そこで、それぞれの DNA 結合活性の比較には、プライマー3'末端構造を持つヘアピン状 DNA (HP96) を 20 fmol (各クランプローダー10ng に対してモル比で 1/2 量) 用いて 30、60、90mM の各 NaCl 濃度の条件下、図に示したタンパク量を用いて行った (図 6-7)。まず、RFC は 30mM から 90mM までの NaCl 条件と各タンパク質量で、HP96 に対して結合飽和状態から、90mM NaCl、2.5ng のタンパク質量でも 20%の非常に高い結合活性を示した。これに対し、30mM NaCl の条件下、5ng のタンパク質存在下で Rad17-RFC が約 15% (図 6-8、B)、Chl12-RFC は約 12%の結合活性であり (図 6-8、C)、これらは同条件での RFC の DNA 結合活性の約 1/5 であった。

次に、DNA 結合未飽和の条件である、各クランプローダー5ng での DNA 結合活性と NaCl 濃度との関係を比較した (図 6-8)。この時、30mM NaCl 条件の各クランプローダーの DNA 結合活性を 100%として表した。その結果、RFC は NaCl 濃度の影響もほとんど受けず 60mM、90mM の各塩濃度条件下 83%、52%の結合活性を示した。Rad17-RFC は 30mM NaCl 濃度ですでに RFC の 1/5 の結合活性であったが、塩濃度に対してほとんど影響を受けず 60mM、90mM の各塩濃度条件下でも約 50%の結合を示し、Rad17-RFC が RFC と同様に、生理的塩濃度に近い条件で一定の DNA

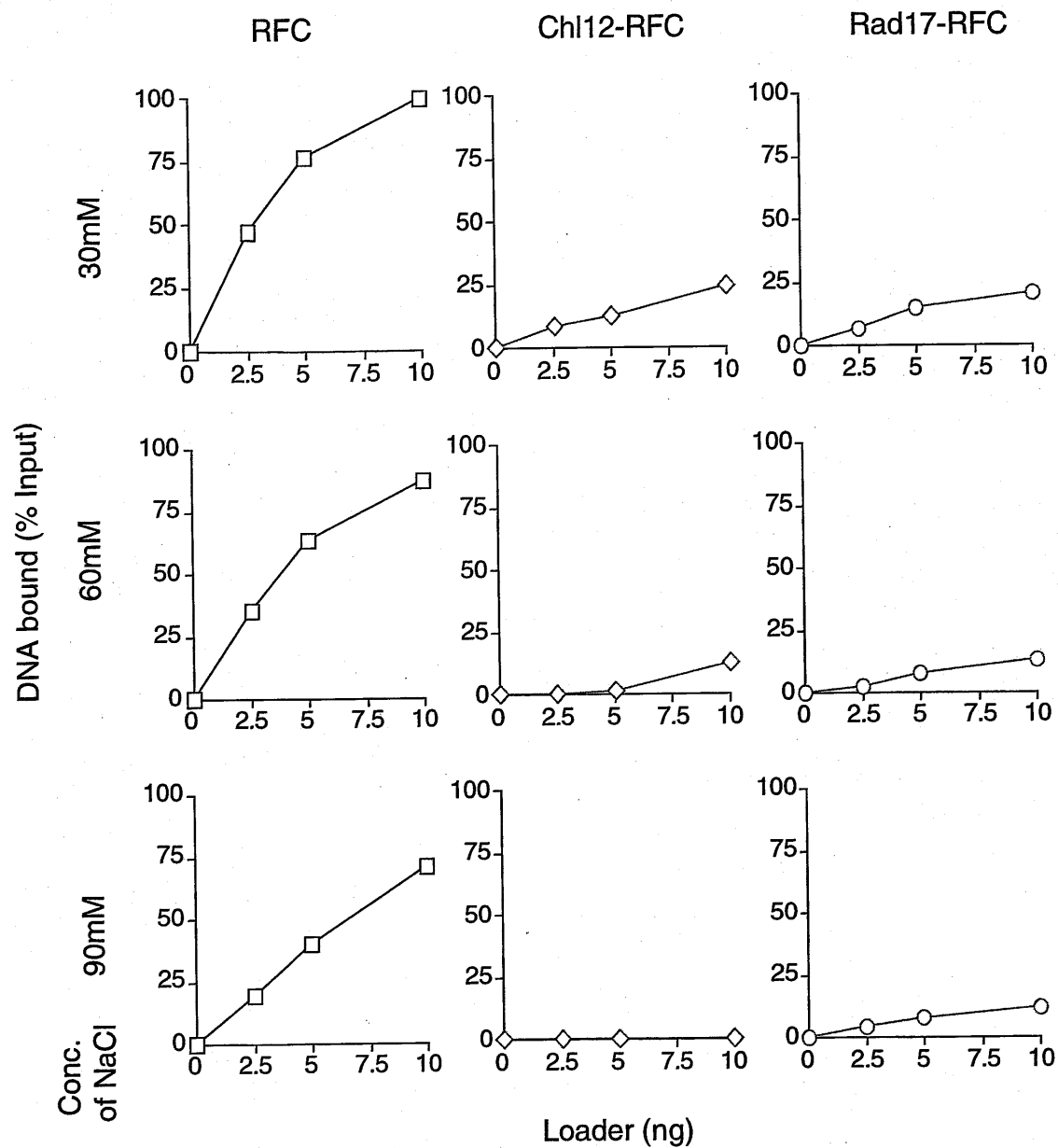


図6-7 DNA結合活性の解析

プライマー 3'末端構造を持つヘアピン型DNAを用いて、クランプローダーのDNA結合活性を異なるNaCl濃度条件下で解析した。グラフ縦軸にはDNA結合量を、横軸には反応系に加えたタンパク量を示した。

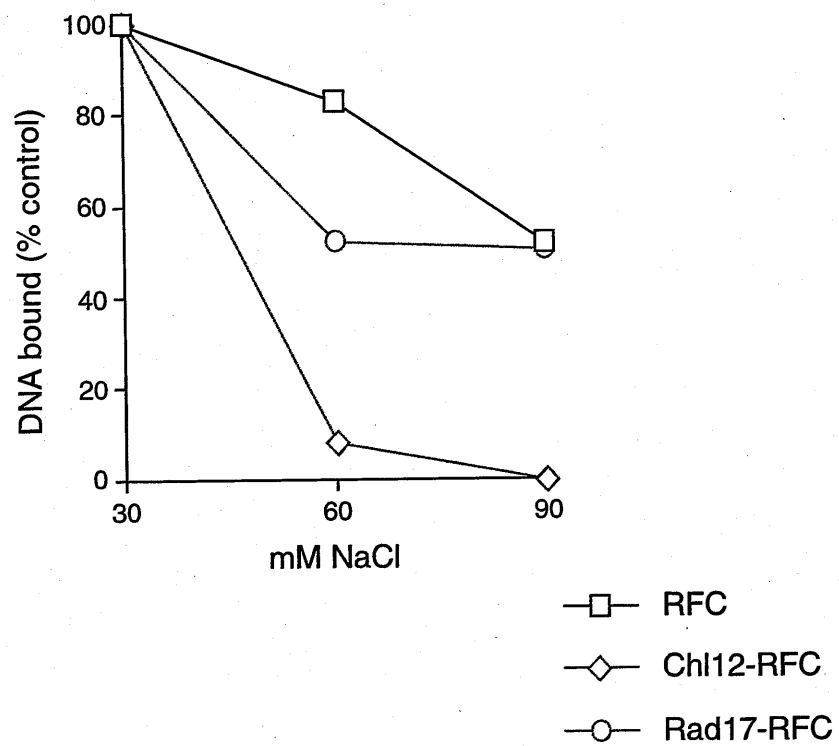


図6-8 NaCl濃度とDNA結合活性の関係

図6-7の結果から、5ngのタンパク量を用いた場合の塩濃度とDNA結合活性の関係を、30mM NaClの時のDNA結合活性を100%として示した。

結合条件を示すことがわかった。一方、Chl12-RFC の DNA 結合活性は強い塩感受性を示し、60mM NaCl の条件下では 8%にまで減少し、90mM NaCl の条件下では全く結合が見られなくなった。

クランプローディング活性の比較

次にクランプローディング活性の解析を行った。このクランプローディング活性は、ニックを持たせた開環状プラスミド DNA と各クランプローダー、PCNA または Rad9-1-1 を ATP 存在下、30、90、150mM の各 NaCl 濃度で反応させ、DNA に結合したクランプ量を測定した。はじめにこの条件下で、RFC を 7.5、15、30、45ng 用いて PCNA ローディング活性を解析した (図 5-9)。その結果、いずれの塩濃度でも RFC による PCNA ローディング活性が検出された。RFC は NaCl が高濃度になるほど高いローディング活性を示し、45ng のタンパク量を用いた時 30mM NaCl 濃度で 8%、90mM NaCl 濃度で 13%、150mM NaCl 濃度で 25%の PCNA がロードされた。この解析で、150mM の塩濃度で DNA に結合した PCNA が 25%で飽和しているが、これは DNA 1 分子あたり PCNA が 100 個ロードされたことになり、結合できる PCNA 量が飽和したためと考えられる。

次に、PCNA との特異的な結合が明かとなった、Chl12-RFC による PCNA ローディング活性を解析した (図 6-10)。その結果、45ng のタンパク量を用いた時 30mM の塩濃度で 4%の PCNA がローディングされることを見出した。この結果は、Chl12-RFC が第二の PCNA ローダーであることを初めてその活性から直接に証明したことになる。しかし、Chl12-RFC の PCNA ローディング活性は RFC とは異なり、90mM、および、150mM NaCl でロードされる PCNA が共に約 1.5%と高塩濃度になるのにしたがって活性は低下した。ここで示された、Chl12-RFC の PCNA ローディング活性が RFC と同様に ATP 加水分解に依存したものか調べるために、30mM の NaCl 濃度で 30ng の Chl12-RFC を用いてヌクレオチド未添加、2mM の ATP または ATP γ S を添加した時の活性を解析した (図 6-11)。同条件で行った RFC による PCNA ローディングでは、ATP の添加でヌクレオチド未添加、および、ATP γ S 添加での PCNA の約 10 倍のバンド強度を示し、ATP 特異的に PCNA が DNA にロードされたことが示された (lane 4)。ヌクレオチド未添加、および ATP γ S の添加の条件でみられる同程度のバンド強度の PCNA は、PCNA と結合した RFC が 30mM の低塩濃度で基質 DNA に対して高い結合活性を示したことによるバックグラウンドと考えられる (lane 3、5)。一方、Chl12-RFC は ATP の添加で、ヌクレオチド未添加、ATP γ S 添加 (lane 7、9) での PCNA の約 4 倍のバンド強度を示した (lane 8)。したがって、Chl12-RFC による PCNA ローディングは RFC と同様に ATP の加水分解に依存していることが示された。

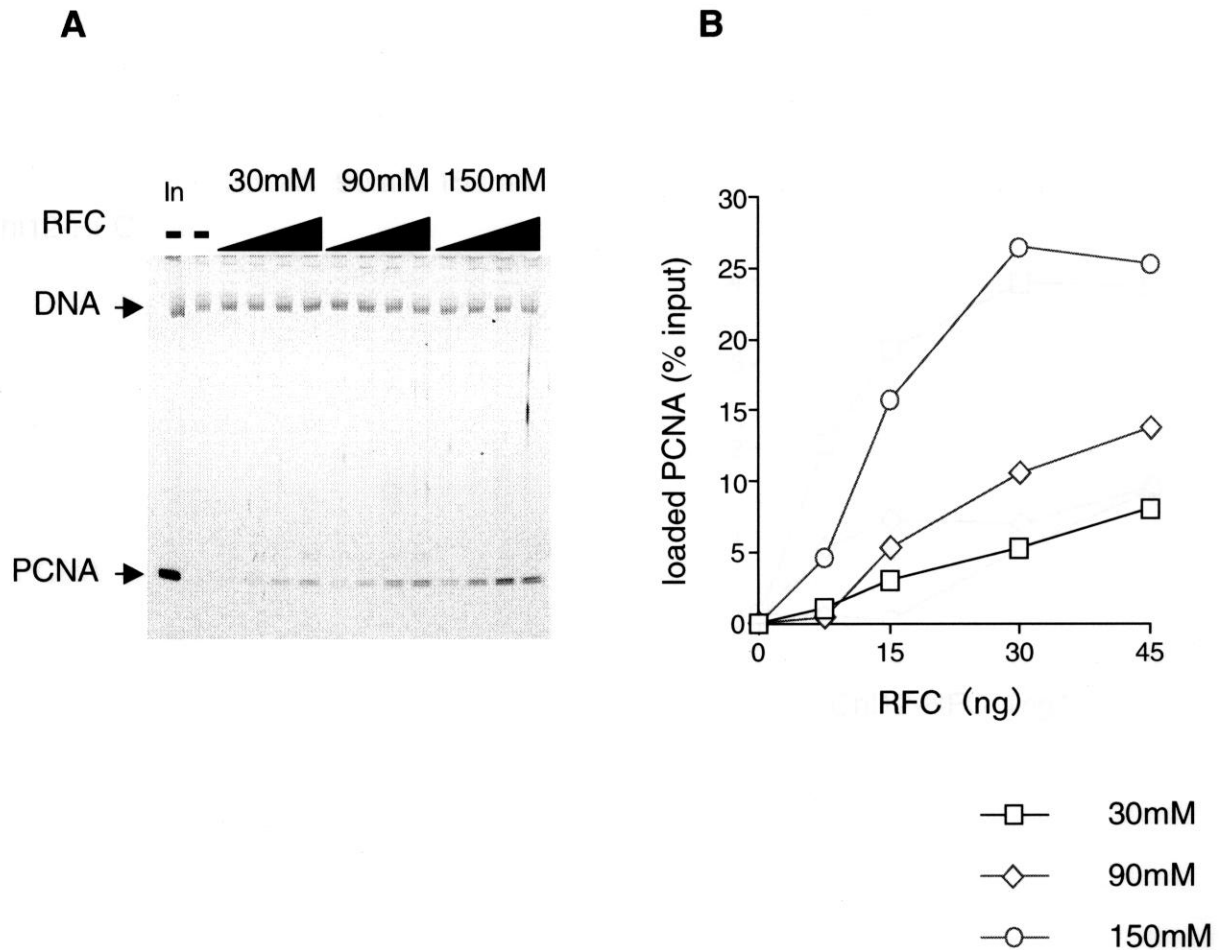


図6-9 RFCによるPCNAローディング活性の解析

(A) 7.5、15、30、45ngのRFCを、開環状プラスミドとPCNAとATP存在下で、30、90、150mMの各NaCl濃度条件下で反応させ、スピнкаラムでexcluded画分として回収したDNAとタンパク質の銀染色像。パネル左側にDNAとPCNAの泳動位置を示した。パネル左端のレーンは反応に加えたPCNAの1/2量を、その右隣はRFC未添加での反応産物を示す。(B) RFCによってDNAにローディングされたPCNA量を電気泳動のバンド強度から定量してグラフに示した。グラフ横軸に反応系に加えたRFC量を、縦軸にDNAにロードされたPCNA量の割合を示した。

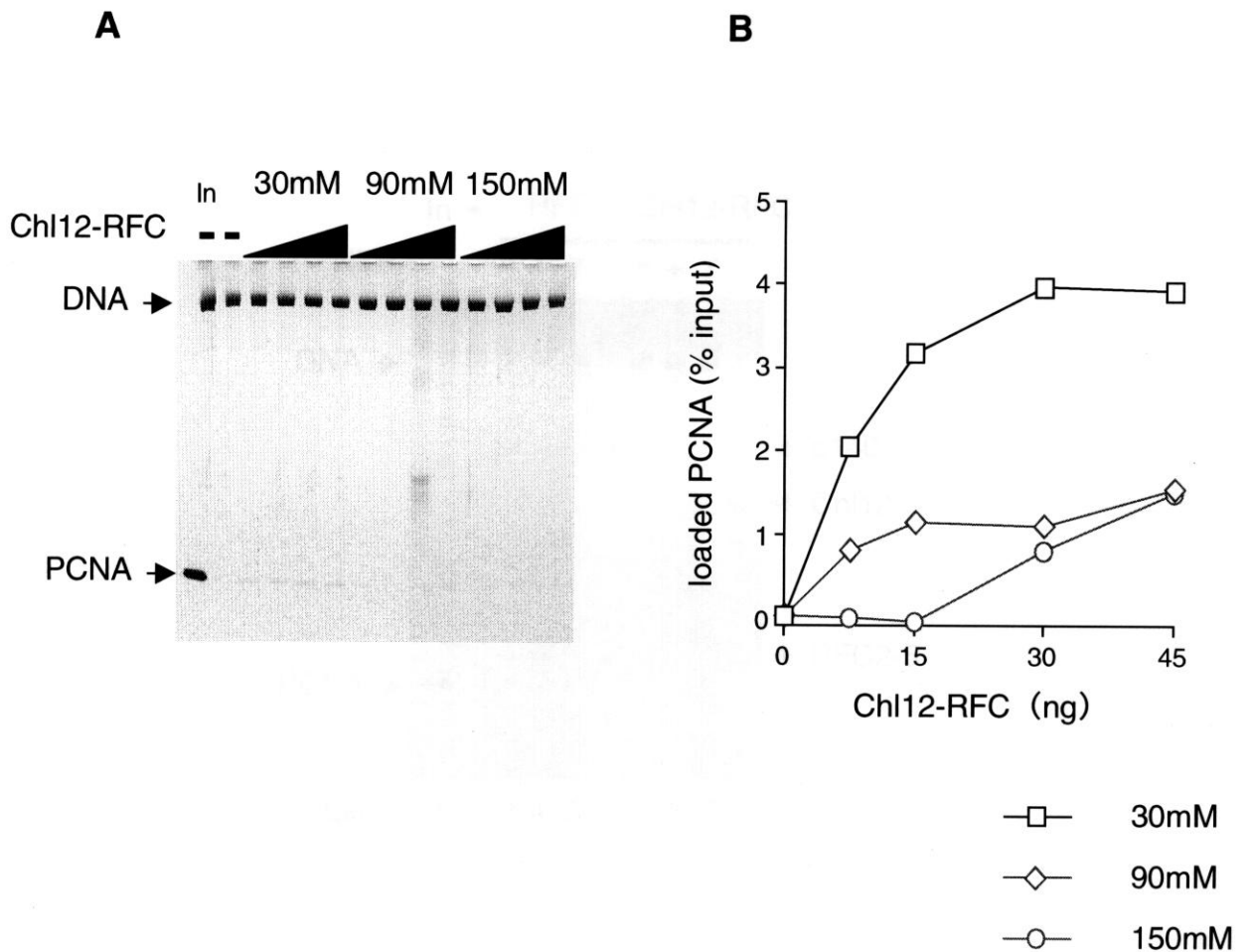


図6-10 Chl12-RFCによるPCNAローディング活性の解析

(A) 7.5、15、30、45ngのChl12-RFCを、開環状プラスミドとPCNAとATP存在下で、30、90、150mMの各NaCl濃度条件下で反応させ、スピンカラムでexcluded画分として回収したDNAとタンパク質の銀染色像。パネル左側にDNAとPCNAの泳動位置を示した。パネル左端のレーンは反応に加えたPCNAの1/2量を、その右隣はChl12-RFC未添加での反応産物を示す。(B) Chl12-RFCによってDNAにローディングされたPCNA量を電気泳動のバンド強度から定量してグラフに示した。グラフ横軸に反応系に加えたChl12-RFC量を、縦軸にDNAにロードされたPCNA量の割合を示した。

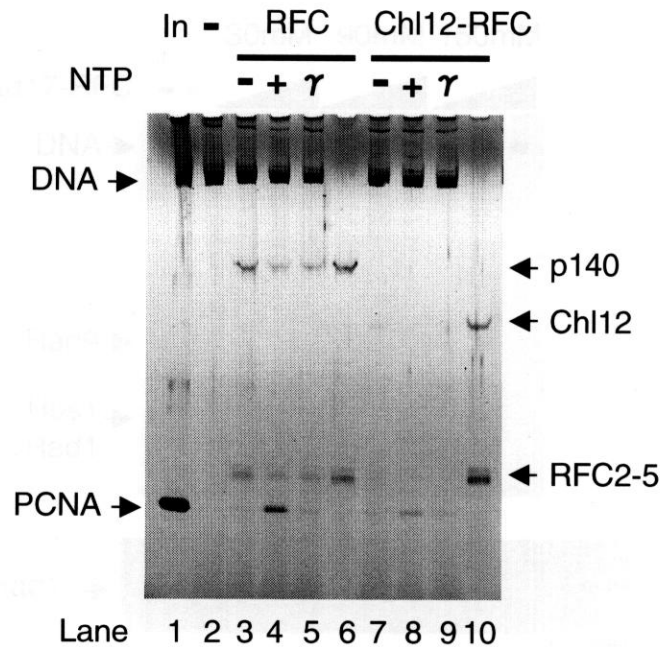


図6-11 RFC、Chl12-RFCによるPCNAローディングのATP依存性の解析

(A) RFC、Chl12-RFCによるPCNAローディング活性に対するATP、または、ATP γ Sの要求性を解析した。この解析は30mMのNaCl濃度で、30ngのクランプローダーを用いて行った。反応後、スピнкаラムでexcluded画分として回収したDNAとタンパク質の銀染色像。パネル左側にDNAとPCNAの泳動位置を、右側にp140、Chl12、RFC2-5の泳動位置を示した。レーン6、10はそれぞれ15ngのRFCとChl12-RFCを示す。

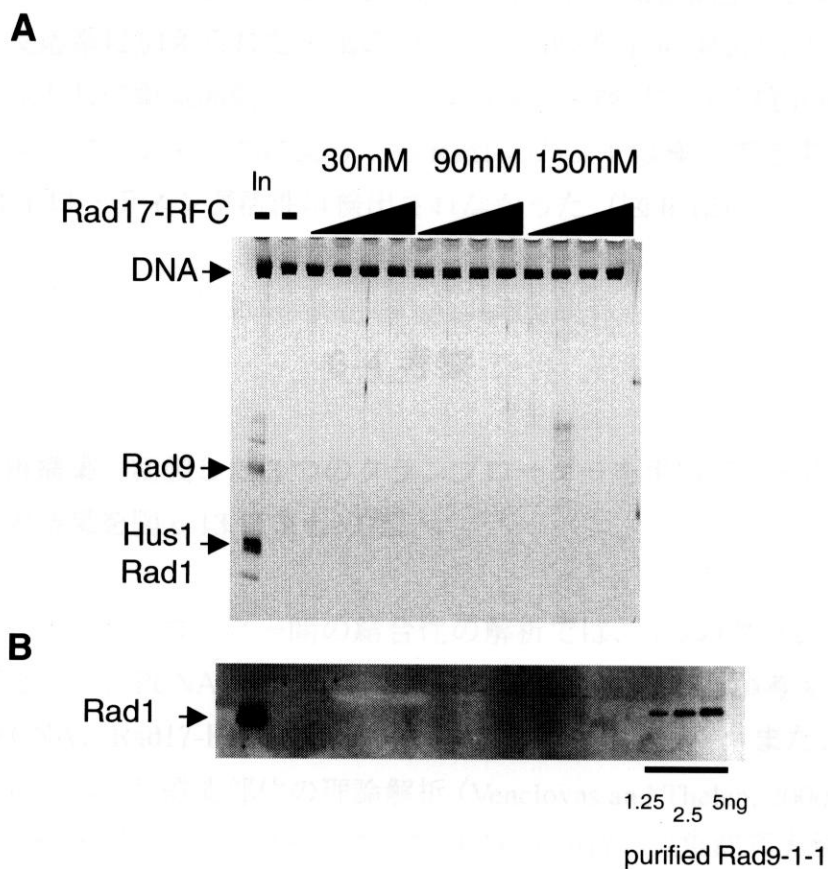


図6-12 Rad17-RFCによるRad9-1-1ローディング活性の解析

(A) 7.5、15、30、45ngのRad17-RFCを、開環状プラスミドとRad9-1-1とATP存在下で、30、90、150mMの各NaCl濃度条件下で反応させ、スピンカラムでexcluded画分として回収したDNAとタンパク質の銀染色像。パネル左側にDNAとRad9-1-1の泳動位置を示した。パネル左端のレーンは反応に加えたRad9-1-1の1/2量を、その右隣はRad17-RFC未添加での反応産物を示す。(B) 抗Rad1抗体によるウェスタンブロット。コントロールとして、精製Rad9-1-1を1.25、2.5、5ng電気泳動した。この量で検出されたRad1のバンド強度はそれぞれ、反応系に加えられたRad9-1-1全量の2.5、5、10%を示す。

次に行った、Rad17-RFC による Rad9-1-1 ローディング活性の解析では、どの反応条件でも DNA にロードされたと考えられる Rad9-1-1 は銀染色では検出できなかった。また、反応系に加えられた全量の 2.5、5、10%を示す Rad9-1-1 を対照として反応サンプルと共に電気泳動し、1ng 以下の Rad1 を検出できる抗 Rad1 抗体を用いたウエスタンブロッティングによっても Rad1 のバンドは検出できず、Rad17-RFC による Rad9-1-1 ローディング活性は検出されなかった (図 6-12)。

6-4 考察

本研究で再構築、精製した 3 つのクランプローダーを用いて、その活性の比較を行った。その結果を図 6-13 にまとめた。

1. クランプ・クランプローダー間の結合性の解析では、3 つのクランプローダーの標的クランプとして、PCNA と Rad9-1-1 の間に互換性はないことが考えられ、RFC と Chl12-RFC は PCNA、Rad17-RFC は Rad9-1-1 と特異的に結合した。また、タンパク質の一次構造にもとづいた機能部位の理論解析 (Venclovas and Thelen, 2000 ; Venclovas et al., 2002) と、ヒト K562 細胞で強制発現させた FLAG-Rad17 の免疫沈降実験 (Rauen et al., 2000) から Rad17 は Rad9-1-1 中の Rad1 と特異的に結合することが示唆されており、また、Chl12 はそのアミノ酸配列の比較から PCNA との結合が予測されていたが (Venclovas et al., 2002)、私の解析結果はその予測通り、標的クランプの識別はそれぞれの複合体中の大サブユニット p140、Rad17、Chl12 が担っていることを明らかにした。これは、p140 が PCNA のレンチ役になるように、Rad17、Chl12 が標的クランプを識別するとともに、それぞれのレンチ役となることを示唆している。

2. Chl12-RFC と Rad17-RFC は、RFC と同様にプライマー構造に対して特異的な結合活性を示した。しかし RFC と比較すると、その結合活性 1/5 であった。このことから、実際にこれらの複合体が機能するには、プライマー構造以外の特異的に結合する DNA 構造を標的としている可能性がある。

3. Chl12-RFC は RFC と同様に DNA、PCNA 依存的に促進される ATPase 活性を持ち、RFC の 1/6 程度の活性ではあるが、ニックの入った開環状 DNA に PCNA を ATP 加水分解依存的にローディングする活性を有した。これは Chl12-RFC が、PCNA に対してローダーとして機能することを直接示した最初の報告である。したがって、娘染色体接着の反応機構でもクランプ・クランプローダー系が要求され、PCNA が

		RFC	Ch112-RFC	Rad17-RFC
A	クランプ結合活性 (結合定数 K_a)	PCNA	2.6×10^6	3.2×10^6
		Rad9-1-1	0	0
				6.4×10^4
				1.1×10^7
B	DNA結合活性 (HP96)	100	16	20
C	ATPase活性	2.1	3.1	0.6
	+DNA	14.2	13.8	2.2
	+DNA & clamp (PCNA or Rad9-1-1)	23.7 (PCNA)	17.9 (PCNA)	1.6 (Rad9-1-1)
D	クランプローディング活性 (PCNA or Rad9-1-1)	100 (PCNA)	16 (PCNA)	not detected (Rad9-1-1)

図6-13 RFC、Rad17-RFC、Ch112-RFC比活性のまとめ

(A) クランプ・クランプローダー間結合の比較。結合定数 K_a を示した (図6-2、-3、-4参照)。 (B) HP96に対するDNA結合活性の比較。30mM NaCl濃度で5ngのRFCが示す活性を100として、同じ条件下で測定したRad17-RFC、Ch112-RFCの結合活性の相対値を示した (図6-7参照)。 (C) ATPase活性の比較。RFCとCh112-RFCをそれぞれ15ng、Rad17-RFCを40ng用いて37℃、10分間反応させた時のATP分解速度をローダー単独、poly dA/oligo dT添加、poly dA/oligo dTとPCNAまたはRad9-1-1との同時添加の各条件で測定した (図6-6参照)。 (D) クランプローディング活性の比較。45ngのRFCを用いて150mM NaCl濃度で開環状DNAにロードされたPCNA量を100として、等量のCh112-RFCが30mM NaCl濃度でDNAにロードしたPCNA量の相対値を示した。Rad17-RFCによるRad9-1-1ローディング活性は、検出できなかった (図6-9、-10、-12参照)。

DNA にロードされる過程が存在する。それでは Chl12-RFC によってロードされた PCNA クランプは、娘染色体接着の反応機構でどのように機能しているのだろうか (図 6-14)。現在のところ PCNA の娘染色体接着とのかかわりは、正確な娘染色体分配に必須な遺伝子として同定された出芽酵母 CTF7 (Toth et al., 1999) との遺伝学的な相互作用しか報告されていない (Skibbens et al., 1999)。しかし、出芽酵母の解析から娘染色体接着ではポリメラーゼ (pol) σ (発表当時は pol κ と呼ばれたが、その後 pol σ に改められた) の関与が示唆されていることから (Wang et al., 2000; Hubscher et al., 2002)、このポリメラーゼの補助因子として PCNA が機能する可能性が考えられる。これまでに、pol σ と PCNA との結合は見い出されていないが、今後は実際に精製したポリメラーゼを用いることで、これらの相互作用が明らかにできると考えられる。

ここで観察された Chl12-RFC による PCNA ローディング活性は、RFC が 150mM の NaCl 濃度で示した最も高い活性の 1/6 までの活性しか見い出せなかった。この原因には以下のことが考えられる。まず、この反応基質にはニックを持たせたプラスミドを用いているが、Chl12-RFC にはこの DNA 構造よりも高い特異性のある DNA 基質が存在する可能性がある。実際に DNA 結合活性も、プライマー/鋳型 DNA では RFC の 1/5 の活性しか示さなかった。したがって、もし Chl12-RFC により結合しやすい標的 DNA 構造があるならば、それを基質として細胞内で RFC と同様の効率で PCNA をロードしていることが考えられる。また、Chl12-RFC の PCNA ローディングと DNA 結合は活性が低いだけではなく、RFC とは異なり塩濃度による阻害を強く受けた。これは、本研究に用いた Chl12 が細胞内で発現しているものよりも、196 アミノ酸 N 末端領域が短いことが原因の一つに考えられる。RFC-p140 の N 末端領域には、RFC2-5 には保存されていない RFC box I (DNA ligase モチーフ) が存在し、DNA 結合に関与していることが示唆されている (Cullmann et al., 1995)。これまでに Chl12 に RFC box I が保存されているとの報告はないが、Chl12 でも N 末端領域が DNA 結合に関与する可能性を考えると、この N 末端欠失型の Chl12 を用いたために本来の DNA 結合、PCNA ローディング活性が得られなかったとも考えられる。第 3 の可能性として、Chl12-RFC の PCNA ローディング活性を促進する補助因子の存在が考えられる。実際に、出芽酵母から Chl12 を免疫沈降すると RFC2-5 と共に、Chl12 と同じ DNA 複製後の染色体接着に機能する Ctf8、Dcc1 が共沈降することが明らかにされている (Mayer et al., 2001)。これらのタンパク質の生化学的特性は明らかではないが、これらが加わることで再構築した Chl12-RFC が PCNA ローダーとして完全な活性を発揮する可能性がある。今後、Chl12-RFC が特異的に結合する DNA 構造の解析、あるいは、このクランプローダーと複合体を形成する因子の解析を進めていくことで、Chl12-RFC が RFC と異なった特性で

染色体接着特異的
ポリメラーゼ補助因子

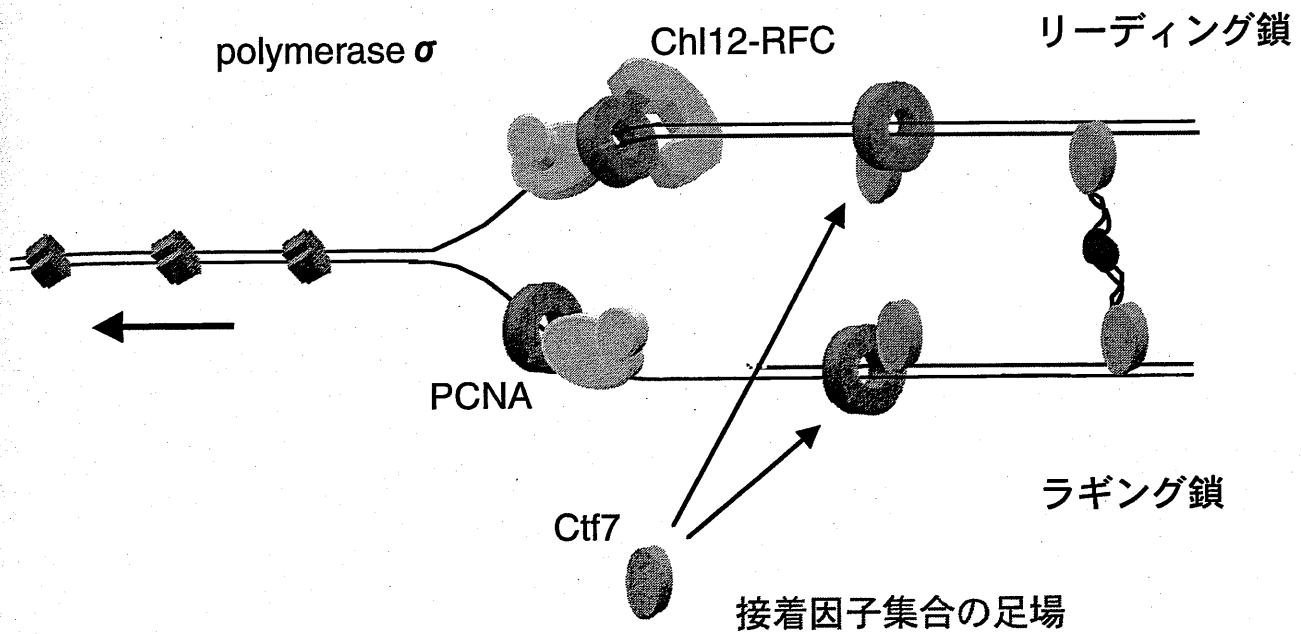


図6-14 娘染色体接着で機能するクランプ・クランプローダー、PCNA、Chl12-RFCの反応機構のモデル

Chl12-RFCによりDNAにロードされるPCNAは、娘染色体接着機構において染色体接着因子集合の足場、または、娘染色体接着特異的なポリメラーゼの補助因子として機能すると考えられる。詳細は本文参照。

PCNA をロードし、異なった反応経路で PCNA を機能させる機構を明らかにできることが期待される。

4. Rad17-RFC は RFC と比べて、プライマー／鋳型 DNA への結合性が低いだけではなく、単独での ATPase 活性が RFC、Chl12-RFC の 1/3 から 1/4 と低く、DNA と Rad9-1-1 の添加でもほとんど促進されなかった。電子顕微鏡観察による構造解析からは Rad9-1-1、Rad17-RFC がクランプ・クランプローダー系として機能することを強く示唆する分子構造を持つことが示されているにもかかわらず、ATPase 活性の結果に対応して Rad17-RFC による Rad9-1-1 ローディング活性を検出することはできなかった。おそらくそのローダー活性を発揮するためには、Chl12-RFC と同様に Rad17-RFC にもプライマー／鋳型 DNA よりも、さらに特異的に結合する DNA 構造が存在し、その基質にのみ Rad9-1-1 ローディングを行うのかもしれない。Rad17-RFC、Rad9-1-1 は DNA 傷害、DNA 複製停止チェックポイントのセンサー／トランスデューサーとして機能すると考えられている (Boddy et al., 2001)。したがって、本来標的となるのは単純なプライマー／鋳型構造ではなく、DNA 傷害に特異的な構造や DNA 複製中間体の構造のような、特殊構造なのかもしれない。しかしながら、2002 年に米国ソーック研究所で開催された「DNA replication and genome integrity」ミーティングにおいて、Stillman 研究室と Burger 研究室からそれぞれヒト細胞、出芽酵母から直接精製された Rad17-RFC 複合体を用いると、Rad9-1-1 ローディング活性が検出されることが報告された。このローディング活性が検出された反応系には、私が用いたものと比較していくつかの違いがあるが、基質 DNA として私が用いたニックを持ったプラスミドと基本的には同じ構造を持つ DNA が使用されていた。これは、Rad17-RFC の Rad9-1-1 ローディング活性には、ニックの入った DNA で十分なことを示している。したがって、ここでローディング活性が検出されなかった別の理由を考えると、2 つの研究室で使用された、活性を有した Rad17-RFC は本来の細胞を出発材料とし、異種の発現系が使われていない点が挙げられる。チェックポイント応答で機能する Rad17-RFC は細胞内において、リン酸化、脱リン酸化などの修飾で活性制御を受けている可能性があり (Bao et al., 2001 ; Post et al., 2001)、昆虫細胞由来のヒト Rad17-RFC にはそのような修飾が欠けているのかもしれない。逆に、クランプである Rad9-1-1 は昆虫細胞内で Rad9 が高度にリン酸化を受けている (Lindsey-Boltz et al., 2001)。Stillman 研究室ではローディング反応に大腸菌で発現させた Rad9-1-1 を使用していることから、この Rad9 に対するリン酸化が活性を阻害していることも考えられる。このことから、チェックポイント応答経路でのローディング活性には、厳密なタンパク質翻訳後修飾が要求される可能性がある。また、Stillman 研究室の発表では、Rad17-RFC の精製度を

高めていくことでそのローディング活性がなくなったことから、ローディング活性に必要な Rad17-RFC の付加因子の存在が示唆されている。以上を総合して考えると、私が行った再構成系を用いることで、Rad17-RFC のクランプローダー活性に必要な基質 DNA、付加因子、あるいは必須の翻訳後修飾の検出が行え、DNA 傷害応答経路のシグナル伝達機構の解明に有効であると考えられる。

第7章 総合考察

真核生物では相互に高い類似性を持つ複数のクランプ・クランプローダー系が存在し、複製反応を軸としたゲノムの情報維持機構に機能していると考えられる。本研究では、それらの反応機構の特異性と機能的連携を明らかにすることを目的として、ヒト由来の3つのクランプ・クランプローダー系について再構築と機能解析を行った。

クランプ・クランプローダー系の代表である PCNA と RFC の解析では、生化学的な解析に加えて、新たに電子顕微鏡観察、原子間力顕微鏡による分子構造解析を導入することで、クランプローダーに特徴的な U 字型構造を見出し、その構造が ATP 加水分解依存的に変化することを証明した。この解析により、リング構造の PCNA が結合した RFC の構造変化を駆動力として一時的に開環し、DNA にローディングされる機構が説明できた。

次に、第二、第三のクランプ・クランプローダー系と示唆される複合体の再構築を行い、精製、解析を行った。電子顕微鏡観察による構造解析から、チェックポイント応答因子 Rad9-1-1、および、Rad17-RFC はクランプ、クランプローダーに特有の分子構造をしており、クランプローダー型複合体である Rad17-RFC は ATPase 活性、プライマー／鋳型 DNA に対する結合、標的クランプである Rad9-1-1 に対する特異的な結合、といったクランプローダーの基本的生化学特性を有したが、Rad9-1-1 を DNA にローディングする活性を検出することはできなかった。したがって、そのローダー活性を発揮するために必要な、プライマー／鋳型 DNA 以外の特異的な基質 DNA、未同定の必須因子、あるいは関与する因子の翻訳後修飾の存在が強く示唆される。

Chl12-RFC については、その標的クランプが PCNA であることを明らかにした。再構築した Chl12-RFC はプライマー／鋳型 DNA との結合活性、RFC と同等の ATPase 活性を有し、ATP 依存的な PCNA ローディング活性を示した。以上の結果から Chl12-RFC は、細胞内での機能は RFC と異なるが、第二の PCNA ローダーであることをその活性から直接に証明した。しかし、そのローダーとしての活性は RFC よりも低いため、活性を促進する因子、あるいは、より特異的な基質 DNA 構造が必要と考えられる。この点については、本研究で用いた Chl12 が細胞内で発現しているものより、N 末端が 196 アミノ酸短い点も考慮して検討する必要がある。

以上、本研究の結果で示されたように、細胞内にはその役割に応じて少なくとも 3 つのクランプローダー複合体が存在し、これらはそれぞれ異なった反応経路で機能すると考えられる。では、このような 3 つの複合体の特性はどのように決定され

るのであろうか。新規クランプローダーは、RFC-p140 に相同性のある Rad17 や Chl12 が RFC2-5 と共に形成する。これら 3 つのクランプローダーの、クランプに対する特異性は各複合体中の大サブユニット (p140、Rad17、Chl12) によって決定されているように、この大サブユニットこそがそれぞれのクランプローダー特性を決定するキープレイヤーと考えることができる。最近、RFC の大サブユニット p140 に対して HDAC1 (histone deacetylase 1) が結合し、RFC の染色体構造制御への関わりを示唆した報告がなされた (Anderson et al., 2002)。その他にも細胞周期 G1/S 期制御に関与する Rb (網膜芽細胞腫、retinoblastoma) (Pennaneach et al., 2001)、細胞増殖や分化に要求される転写因子 C/EBP α (CCAAT/enhancer-binding protein α) の結合が示されており (Hong et al., 2001)、これらは様々な機能を RFC に付加すると考えられている。このような観点から考えると、細胞内には DNA 複製、チェックポイント、娘染色体接着以外の経路で機能するクランプローダー複合体が、まだ複数存在しているのかもしれない。

同様に、Chl12、Rad17 に対しても様々な因子が相互作用してこれらクランプローダーの機能制御を行っていることが考えられ、このような因子の同定やその機能の解析もクランプローダーの多様性を考える上で興味深い課題である。また、どのクランプローダーも RFC2-5 を基本構成として共有していることから、RFC2-5 を介した共通の機能制御や情報伝達のしくみを持つことが考えられる。今後、これらのクランプローダーに共通した制御系、あるいはクランプローダー間の情報伝達という観点から、細胞内での各サブユニットの局在や細胞周期による変動、分子集合の変化など解析を進めることが必要であり、また、このようなアプローチによって興味深い知見が得ることができると考えられる。

一方、細胞内では PCNA、Rad9-1-1 の 2 つのクランプの存在が明らかとなり、Rad9-1-1 は Rad17-RFC に特異的なクランプと示されたが、PCNA は RFC と Chl12-RFC に共通のクランプであることが示された。また、実際にこれら 2 つの複合体によって DNA へのロードが行われることから、PCNA は少なくとも DNA 複製フォーク、および、娘染色体接着で機能していると考えられる。また最近の報告では、RAD6 依存的な DNA 修復経路においてモノユビキチン化、マルチユビキチン化された PCNA の存在、また、DNA 修復経路とは別の SUMO (small ubiquitin-related modifier) 化された PCNA の存在も明らかにされた (Hoegge et al., 2002)。このような多様な修飾を受けた PCNA の存在は、PCNA が複数の反応機構に応じて修飾を切り替えることのできる多機能クランプとして細胞内反応の中枢をになっていることが想像できる。

以上のように細胞内では様々な特性を持つ、複数のクランプとクランプローダーが存在する可能性があり、複製反応を軸としたゲノムの情報維持伝達機構の中枢と

して、クランプ・クランプローダー系が細胞内イベントのメインプレイヤーとして機能していると考えられる（図 7）。したがって、クランプ・クランプローダー系を研究対照とした解析は今後重要となることが考えられる。そこで、本研究の成果を足がかりとしてさらに解析を進め、ゲノム情報の安定な維持伝達に複数要求される、クランプ・クランプローダー系について明らかにしていきたいと考えている。

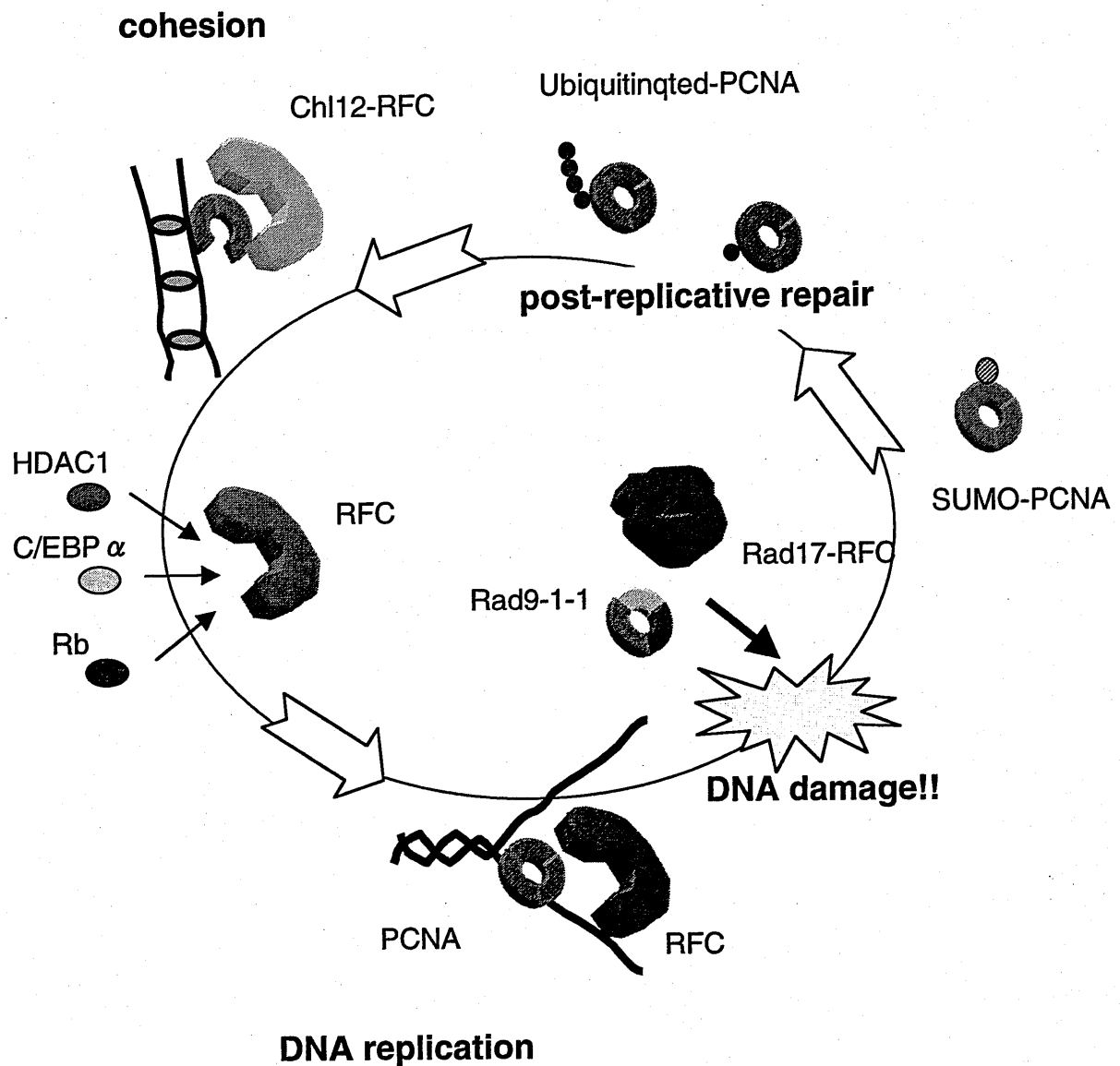


図7 細胞周期を通じて、ゲノムの維持伝達機構に機能するクランプ・クランプローダー系のモデル

本研究で解析したPCNA・RFC、PCNA・Chl12-RFC、Rad9-1-1・Rad17-RFCの他にも、細胞内には細胞周期進行に伴って様々な反応経路で機能する、複数のクランプ・クランプローダー系が存在していると考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導頂きました奈良先端科学技術大学院大学、加藤順也教授に感謝いたします。

また、博士前期課程から様々な御指導、御助言賜りました吉川寛名誉教授に深く感謝いたします。

同じく、博士前期課程から様々な御指導、御協力頂きました小布施力史助手、白髭克彦助手に感謝いたします。

共同研究で御指導、御協力頂きました名古屋大学医学研究科、臼倉治郎助教授、名古屋大学理学研究科、杉本勝則助教授、京都大学生命科学研究科、竹安邦夫教授に感謝いたします。

そして、本研究を直接御指導頂き、多大な御助力頂きました釣本敏樹助教授に心から感謝いたします。

最後に、本研究に協力頂いた篠崎彩子さん、ならびに色々とお世話になりまし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

Adachi Y, Usukura J, Yanagida M. (1997) A globular complex formation by Nda1 and the other five members of the MCM protein family in fission yeast. *Genes Cells*. **2**, 467-479.

Akita S, Nishijima H, Nakayama Y, Tokumasu F, Takeyasu K. (1999) Carbon nanotube tips for a scanning probe microscope: their fabrication and properties. *Journal of Physics D: Applied Physics* **32**, 1044-1048

Anderson LA, Perkins ND. (2002) The large subunit of replication factor C interacts with the histone deacetylase, HDAC1. *J Biol Chem*. **277**, 29550-29554.

Bambara RA, Murante RS, Henricksen LA. (1997) Enzymes and reactions at the eukaryotic DNA replication fork. *J Biol Chem*. **272**, 4647-4650.

Bao S, Tibbetts RS, Brumbaugh KM, Fang Y, Richardson DA, Ali A, Chen SM, Abraham RT, Wang XF. (2001) ATR/ATM-mediated phosphorylation of human Rad17 is required for genotoxic stress responses. *Nature* **411**, 969-974.

Beckwith W, McAlear MA. (2000) Allele-specific interactions between the yeast RFC1 and RFC5 genes suggest a basis for RFC subunit-subunit interactions. *Mol Gen Genet*. **264**, 378-391.

Bertram JG, Bloom LB, Hingorani MM, Beechem JM, O'Donnell M, Goodman MF. (2000) Molecular mechanism and energetics of clamp assembly in *Escherichia coli*. The role of ATP hydrolysis when gamma complex loads beta on DNA. *J Biol Chem*. **275**, 28413-28420

Benkovic SJ, Valentine AM, Salinas F. (2001) Replisome-mediated DNA replication. *Annu Rev Biochem*. **70**, 181-208.

Boddy MN, Russell P. (2001) DNA replication checkpoint. *Curr Biol*. **11**, R953-956.

Bruck I, O'Donnell M. (2001) The ring-type polymerase sliding clamp family. *Genome Biol*. **2**, REVIEWS3001.

Burtelow MA, Roos-Mattjus PM, Rauen M, Babendure JR, Karnitz LM. (2001) Reconstitution and molecular analysis of the hRad9-hHus1-hRad1 (9-1-1) DNA damage responsive checkpoint complex. *J Biol Chem.* **276**, 25903-25909

Cai J, Gibbs E, Uhlmann F, Phillips B, Yao N, O'Donnell M, Hurwitz J. (1997) A complex consisting of human replication factor C p40, p37, and p36 subunits is a DNA-dependent ATPase and an intermediate in the assembly of the holoenzyme. *J Biol Chem.* **272**, 18974-18981.

Cai J, Uhlmann F, Gibbs E, Flores-Rozas H, Lee CG, Phillips B, Finkelstein J, Yao N, O'Donnell M, Hurwitz J. (1996) Reconstitution of human replication factor C from its five subunits in baculovirus-infected insect cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 12896-12901

Caspari T, Dahlen M, Kanter-Smoler G, Lindsay HD, Hofmann K, Papadimitriou K, Sunnerhagen P, Carr AM. (2000) Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* Hus1: a PCNA-related protein that associates with Rad1 and Rad9. *Mol Cell Biol.* **20**, 1254-1262.

Cullmann G, Fien K, Kobayashi R, Stillman B. (1995) Characterization of the five replication factor C genes of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **15**, 4661-4671.

Dean FB, Lian L, O'Donnell M. (1998) cDNA cloning and *gitis elegans*, and *Drosophila melanogaster*. *Genomics* **54**, 424-436.

Ellison V, Stillman B. (1998) Reconstitution of recombinant human replication factor C (RFC) and identification of an RFC subcomplex possessing DNA-dependent ATPase activity. *J Biol Chem.* **273**, 5979-5987

Ellison V, Stillman B. (2001) Opening of the clamp: an intimate view of an ATP-driven biological machine. *Cell* **106**, 655-660.

Fujise K, Zhang D, Liu J, Yeh ET. (2000) Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.* **275**, 39458-39465.

Fukuda K, Morioka H, Imajou S, Ikeda S, Ohtsuka E, Tsurimoto T. (1995) Structure-

function relationship of the eukaryotic DNA replication factor, proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.* **270**, 22527-22534

Green CM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lowndes NF. (2000) A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Curr Biol.* **10**, 39-42.

Gerik KJ, Gary SL, Burgers PM. (1997) Overproduction and affinity purification of *Saccharomyces cerevisiae* replication factor C. *J Biol Chem.* **272**, 1256-1262

Griffiths DJ, Barbet NC, McCready S, Lehmann AR, Carr AM. (1995) Fission yeast rad17: a homologue of budding yeast RAD24 that shares regions of sequence similarity with DNA polymerase accessory proteins. *EMBO J.* **14**, 5812-5823.

Griffith JD, Lindsey-Boltz LA, Sancar A. (2000) Structures of the human Rad17-replication factor C and checkpoint Rad 9-1-1 complexes visualized by glycerol spray/low voltage microscopy. *J Biol Chem.* **277**, 15233-15236.

Hanna JS, Kroll ES, Lundblad V, Spencer FA. (2001) *Saccharomyces cerevisiae* CTF18 and CTF4 are required for sister chromatid cohesion. *Mol Cell Biol.* **21**, 3144-3158

Hingorani MM, O'Donnell M. (1998) ATP binding to the *Escherichia coli* clamp loader powers opening of the ring-shaped clamp of DNA polymerase III holoenzyme. *J Biol Chem.* **273**, 24550-24563.

Hingorani MM, Bloom LB, Goodman MF, O'Donnell M. (1999) Division of labor--sequential ATP hydrolysis drives assembly of a DNA polymerase sliding clamp around DNA. *EMBO J.* **18**, 5131-5144.

Hingorani MM, O'Donnell M. (2000) A tale of toroids in DNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol.* **1**, 22-30.

Hoege C, Pfander B, Moldovan GL, Pyrowolakis G, Jentsch S. (2002) RAD6-dependent DNA repair is linked to modification of PCNA by ubiquitin and SUMO. *Nature* **419**, 135-141.

Hohmura KI, Itokazu Y, Yoshimura SH, Mizuguchi G, Masamura YS, Takeyasu K, Shiomi Y, Tsurimoto T, Nishijima H, Akita S, Nakayama Y. (2000) Atomic force microscopy with carbon nanotube probe resolves the subunit organization of protein complexes. *J Electron Microsc. (Tokyo)* **49**, 415-421

Hong S, Park SJ, Kong HJ, Shuman JD, Cheong J. (2001) Functional interaction of bZIP proteins and the large subunit of replication factor C in liver and adipose cells. *J Biol Chem.* **276**, 28098-28105.

Hubscher U, Maga G, Spadari S. (2002) Eukaryotic DNA polymerases. *Annu Rev Biochem.* **71**, 133-163.

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

Jeruzalmi D, O'Donnell M, Kuriyan J. (2001) Crystal structure of the processivity clamp loader gamma (gamma) complex of *E. coli* DNA polymerase III. *Cell* **106**, 429-441.

Jeruzalmi D, O'Donnell M, Kuriyan J. (2002) Clamp loaders and sliding clamps. *Curr Opin Struct Biol.* **12**, 217-224.

Kai M, Tanaka H, Wang TS. (2001) Fission yeast Rad17 associates with chromatin in response to aberrant genomic structures. *Mol Cell Biol.* **21**, 3289-3301.

Keller RC, Mossi R, Maga G, Wellinger RE, Hubscher U, Sogo JM. (1999) Electron microscopic analysis reveals that replication factor C is sequestered by single-stranded DNA. *Nucleic Acids Res.* **27**, 3433-3437.

Kelman Z, O'Donnell M. (1995) DNA polymerase III holoenzyme: structure and function of a chromosomal replicating machine. *Annu Rev Biochem.* **64**, 171-200.

Kondo T, Matsumoto K, Sugimoto K. (1999) Role of a complex containing Rad17, Mec3, and Ddc1 in the yeast DNA damage checkpoint pathway. *Mol Cell Biol.* **19**, 1136-1143.

Kostrub CF, al-Khodairy F, Ghazizadeh H, Carr AM, Enoch T. (1997) Molecular analysis of *hus1+*, a fission yeast gene required for S-M and DNA damage checkpoints. *Mol Gen Genet.* **254**, 389-399.

Kouprina N, Tsouladze A, Koryabin M, Hieter P, Spencer F, Larionov V. (1993) Identification and genetic mapping of CHL genes controlling mitotic chromosome transmission in yeast. *Yeast* **9**, 11-19

Kouprina N, Kroll E, Kirillov A, Bannikov V, Zakharyev V, Larionov V. (1994) CHL12, a gene essential for the fidelity of chromosome transmission in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **138**, 1067-1079.

Krishna TS, Kong XP, Gary S, Burgers PM, Kuriyan J. (1994) Crystal structure of the eukaryotic DNA polymerase processivity factor PCNA. *Cell* **79**, 1233-1243

Lindsey-Boltz LA, Bermudez VP, Hurwitz J, Sancar A. (2001) Purification and characterization of human DNA damage checkpoint Rad complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 11236-11241.

Masutani C, Hanaoka F. (2001) [Translesion synthesis defective in the xeroderma pigmentosum variant cells] *Tanpakushitsu Kakusan Koso* **46**(8 Suppl), 1097-1106.

Mayer ML, Gygi SP, Aebersold R, 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

Melo JA, Cohen J, Toczyski DP. (2001) Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes Dev.* **15**, 2809-2821.

Mossi R, Hubscher U. (1998) Clamping down on clamps and clamp loaders--the eukaryotic replication factor C. *Eur J Biochem.* **254**, 209-216.

Mossi R, Jonsson ZO, Allen BL, Hardin SH, Hubscher U. (1997) Replication factor C interacts with the C-terminal side of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem.* **272**, 1769-1776.

Murray JM, Carr AM, Lehmann AR, Watts FZ. (1991) Cloning and characterisation of the rad9 DNA repair gene from *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3525-3531.

Naiki T, Kondo T, Nakada D, Matsumoto K, 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

Naiki T, Shimomura T, Kondo T, Matsumoto K, Sugimoto K. (2000) Rfc5, in cooperation with rad24, controls DNA damage checkpoints throughout the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* **20**, 5888-5896.

Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV. (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res.* **9**, 27-43.

Nishijima H, Kamo S, Akita S, Nakayama Y, Hohmura KI, Yoshimura SH, Takeyasu K. (1999) Carbon-nanotube tips for scanning probe microscopy: Preparation by a controlled process and observation of deoxyribonucleic acid. *Appl Phys Lett.* **74**, 4061-4063

O'Connell MJ, Walworth NC, Carr AM. (2000) The G2-phase DNA-damage checkpoint. *Trends Cell Biol.* **10**, 296-303.

Ogura T, Wilkinson AJ. (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* **6**, 575-597.

Ohta S, Shiomi Y, Sugimoto K, Obuse C, 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. *J Biol Chem.* **277**, 40362-40367.

O'Donnell M, Onrust R, Dean FB, Chen M, Hurwitz J. (1993) Homology in accessory proteins of replicative polymerases--*E. coli* to humans. *Nucleic Acids Res.* **21**, 1-3.

O'Donnell M, Jeruzalmi D, Kuriyan J. (2001) Clamp loader structure predicts the architecture of DNA polymerase III holoenzyme and RFC. *Curr Biol.* **11**, R935-946.

Onrust R, O'Donnell M. (1993) DNA polymerase III accessory proteins. II. Characterization of delta and delta'. *J Biol Chem.* **268**, 11766-11772.

Oyama T, Ishino Y, Cann IK, Ishino S, Morikawa K. (2001) Atomic structure of the clamp loader small subunit from *Pyrococcus furiosus*. *Mol Cell* **8**, 455-463.

Pennaneach V, Salles-Passador I, Munshi A, Brickner H, Regazzoni K, Dick F, Dyson N, Chen TT, Wang JY, Fotedar R, Fotedar A. (2001) The large subunit of replication factor C promotes cell survival after DNA damage in an LxCxE motif- and Rb-dependent manner. *Mol Cell.* **7**, 715-727.

Podust LM, Podust VN, Sogo JM, Hubscher U. (1995) Mammalian DNA polymerase auxiliary proteins: analysis of replication factor C-catalyzed proliferating cell nuclear antigen loading onto circular double-stranded DNA. *Mol Cell Biol.* **15**, 3072-3081.

Podust VN, Fanning E. (1997) Assembly of functional replication factor C expressed using recombinant baculoviruses. *J Biol Chem.* **272**, 6303-6310.

Post S, Weng YC, Cimprich K, Chen LB, Xu Y, Lee EY. (2001) Phosphorylation of serines 635 and 645 of human Rad17 is cell cycle regulated and is required for G(1)/S checkpoint activation in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 13102-13107.

Rauen M, Burtelow MA, Dufault VM, Karnitz LM. (2000) The human checkpoint protein hRad17 interacts with the PCNA-like proteins hRad1, hHus1, and hRad9. *J Biol Chem.* **275**, 29767-29771

Rowley R, Subramani S, Young PG. (1992) Checkpoint controls in *Schizosaccharomyces pombe*: rad1. *EMBO J.* **11**, 1335-1342.

Shao Z, Yang J, Somlyo AP. (1995) Biological atomic force microscopy: from microns to nanometers and beyond. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **11**, 241-265.

Shibahara K, Stillman B. (1999) Replication-dependent marking of DNA by PCNA facilitates CAF-1-coupled inheritance of chromatin. *Cell* **96**, 575-585.

Shiomi Y, Usukura J, Masamura Y, Takeyasu K, Nakayama Y, Obuse C, Yoshikawa H, Tsurimoto T. (2000) ATP-dependent structural change of the eukaryotic clamp-loader protein, replication factor C. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 14127-14132

Shiomi Y, Shinozaki A, Nakada D, Sugimoto K, Usukura J, Obuse C, Tsurimoto T. (2002) Clamp and clamp loader structures of the human checkpoint protein complexes, Rad9-1-1 and Rad17-RFC. *Genes Cells* **7**, 861-868.

Siegel LM, Monty KJ. (1966) Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochim Biophys Acta* **112**, 346-362

Skibbens RV, Corson LB, Koshland D, 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 ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, Kastan MB, O'Connor PM, Fornace AJ Jr. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* **266**, 1376-1380.

Spencer F, Gerring SL, Connelly C, Hieter P. (1990) Mitotic chromosome transmission fidelity mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **124**, 237-249.

Stillman B. (1994) Smart machines at the DNA replication fork. *Cell* **78**, 725-728.

St Onge RP, Udell CM, Casselman R, Davey S. (1999) The human G2 checkpoint control protein hRAD9 is a nuclear phosphoprotein that forms complexes with hRAD1 and hHUS1. *Mol Biol Cell* **10**, 1985-1995.

Takeyasu K, Omote H, Nettikadan S, Tokumasu F, Iwamoto-Kihara A, Futai M. (1996) Molecular imaging of *Escherichia coli* F₀F₁-ATPase in reconstituted membranes using

atomic force microscopy. *FEBS Lett.* **392**, 110-113.

Thelen MP, Venclovas C, Fidelis K. (1999) A sliding clamp model for the Rad1 family of cell cycle checkpoint proteins. *Cell* **96**, 769-770.

Toth A, Ciosk R, Uhlmann F, Galova M, Schleiffer A, Nasmyth K. (1999) Yeast cohesin complex requires a conserved protein, Eco1p(Ctf7), to establish cohesion between sister chromatids during DNA replication. *Genes Dev.* **13**, 320-333.

Trakselis MA, Benkovic SJ. (2001) Intricacies in ATP-dependent clamp loading: variations across replication systems. *Structure (Camb)* **9**, 999-1004.

Tsurimoto T, Stillman B. (1989) Purification of a cellular replication factor, RF-C, that is required for coordinated synthesis of leading and lagging strands during simian virus 40 DNA replication in vitro. *Mol Cell Biol.* **9**, 609-619.

Tsurimoto T, Stillman B. (1990) Functions of replication factor C and proliferating-cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 1023-1027

Tsurimoto T, Stillman B. (1991) Replication factors required for SV40 DNA replication in vitro. I. DNA structure-specific recognition of a primer-template junction by eukaryotic DNA polymerases and their accessory proteins. *J Biol Chem.* **266**, 1950-1960.

Turner J, Hingorani MM, Kelman Z, O'Donnell M. (1999) The internal workings of a DNA polymerase clamp-loading machine. *EMBO J.* **18**, 771-783.

Uhlmann F, Cai J, Flores-Rozas H, Dean FB, Finkelstein J, O'Donnell M, Hurwitz J. (1996) In vitro reconstitution of human replication factor C from its five subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6521-6526.

Umar A, Buermeier AB, Simon JA, Thomas DC, Clark AB, Liskay RM, Kunkel TA. (1996) Requirement for PCNA in DNA mismatch repair at a step preceding DNA resynthesis. *Cell* **87**, 65-73.

Usukura J, Nishizawa Y, Shimomura A, Kobayashi K, Nagatsu T, Hagiwara M. (2000) Direct imaging of phosphorylation-dependent conformational change and DNA binding of CREB by electron microscopy. *Genes Cells* **5**, 515-522

Vale RD. (2000) AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol.* **150**, F13-19.

Venclovas C, Thelen MP. (2000) Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 2481-2493.

Venclovas C, Colvin ME, Thelen MP. (2002) Molecular modeling-based analysis of interactions in the RFC-dependent clamp-loading process. *Protein Sci.* **11**, 2403-2416.

Volkmer E, Karnitz LM. (1999) Human homologs of *Schizosaccharomyces pombe* rad1, hus1, and rad9 form a DNA damage-responsive protein complex. *J Biol Chem.* **274**, 567-570.

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

Wang Z, Castano IB, De Las Penas A, Adams C, Christman MF. Pol kappa: A DNA polymerase required for sister chromatid cohesion. *Science* **289**, 774-779.

Weinert TA, Kiser GL, Hartwell LH. (1994) Mitotic checkpoint genes in budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev.* **8**, 652-665.

Yu RC, Hanson PI, Jahn R, Brunger AT. (1998) Structure of the ATP-dependent oligomerization domain of N-ethylmaleimide sensitive factor complexed with ATP. *Nat Struct Biol.* **5**, 803-811.

Xiong Y, Zhang H, Beach D. (1992) D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. *Cell* **71**, 505-514.

Zhou BB, Elledge SJ. (2000) The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* **408**, 433-439.

Zou L, Cortez D, Elledge SJ. (2002) Regulation of ATR substrate selection by Rad17-dependent loading of Rad9 complexes onto chromatin. *Genes Dev.* **16**, 198-208.

太田聡 (2003) 「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-」 博士論文

篠崎彩子 (2003) 「PCNA ファミリータンパク質と、RFC ファミリータンパク質の解析」 修士論文

辻本貴士 (1997) 「バキュロウイルスを用いたヒト RF-C の大量発現系の構築」 修士論文

釣本ら、日本生化学会 編 (1993) 新生化学実験講座 2 核酸 4 遺伝子の複製と発現、77-89

参考資料

ATP-dependent structural change of the eukaryotic clamp-loader protein,
replication factor C.

Shiomi Y, Usukura J, Masamura Y, Takeyasu K, Nakayama Y, Obuse C,
Yoshikawa H, Tsurimoto T.

Proc Natl Acad Sci U S A 2000 Dec 19;97(26):14127-32

Clamp and clamp loader structures of the human checkpoint protein complexes,
Rad9-1-1 and Rad17-RFC.

Shiomi Y, Shinozaki A, Nakada D, Sugimoto K, Usukura J, Obuse C,
Tsurimoto T.

Genes Cells. 2002 Aug;7(8):861-8.

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.

Ohta S, Shiomi Y, Sugimoto K, Obuse C, Tsurimoto T.

J Biol Chem. 2002 Oct 25;277(43):40362-7.