

論文の内容の要旨

論文題目 Phosphorylation of MCM complex by human Cdc7 kinase complex: sites and physiological significance

和訳 ヒト Cdc7 キナーゼ複合体による MCM タンパク質リン酸化の解析

指導教官 新井 賢一 教授

東京大学大学院医学研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 趙 民権

細胞周期制御において、染色体 DNA 複製の開始は重要な制御段階である。真核細胞の染色体複製開始には、複製起点上に ORC や CDC6, Cdt1 及び MCM を含む前複製開始複合体(preRC)が形成されることが必要である。この preRC が G1/S CDK 及び Cdc7 キナーゼにより活性化され、複製起点の二本鎖 DNA の巻き戻しが誘導され、さらに CDC45 や DNA ポリメラーゼが複製複合体にロードされて複製が開始、進行する。

CDC7 は出芽酵母の染色体複製開始に必須なセリン/スレオニンキナーゼをコードする。Cdc7 キナーゼはその活性化サブユニットとして機能する Dbf4 と複合体を形成し、複製開始複合体の一部としてその構成因子をリン酸化することにより複製開始を制御すると考えられてきた。Cdc7 キナーゼ複合体は酵母からヒトまで保存されて存在し、Cdc7 による複製開始制御が真核細胞全般に保存されている可能性が示唆された。しかし、Cdc7 キナーゼによるリン酸化に伴う複製複合体の機能調節の構造的、生化学的な実体については不明である。

MCM(minichromosome maintenance)2~7 の6つの MCM はそれぞれ互いに高いホモロジーをもっており、MCM ファミリーを形成している。MCM は1回の細胞分裂でただ1度の DNA 複製を保証する DNA 複製許可因子(replication licensing factor)に含まれることが報告された。哺乳動物細胞において MCM は6つの MCM サブユニットからなるヘテロ六量体として存在し機能しているようである。この複合体はやや不安定で、MCM3-5 及び MCM4-6-7 からなる小複合体に分解されやすい。最近、ヒト MCM4, 6, 7 から成る3量体が重合した6量体中に DNA ヘリカーゼ活性が検出され、MCM が

DNA 複製過程での2本鎖 DNA の巻き戻しに機能する可能性が示された。また、MCM2 及び MCM3, 5 は MCM4, 6, 7 複合体(3量体のダイマー)に結合してそのサブユニット構造を変化させることによりヘリカーゼ活性を阻害し、調節機能を有することが示唆された。

In vitro で Cdc7 キナーゼ複合体はそれ自身のサブユニットを自己リン酸化するとともに、MCM 複合体を効率よくリン酸化する。なかでも、MCM2 サブユニットは *in vivo* においても Cdc7 により S 期にリン酸化される。また、出芽酵母あるいは分裂酵母の *cdc7* あるいは *hsk1*⁺ の温度感受性変異体では G1/S 境界期に見られる Mcm2 のリン酸化が観察されなかった。さらに、*cdc7*⁺ の機能をバイパスするサプレッサー変異(*bob1*)が MCM5 にマップされた。これらの生化学的、遺伝学的解析から MCM 複合体が Cdc7 キナーゼの重要な基質であることが明らかになってきた。

ヒト Cdc7 キナーゼ(huCdc7)による MCM のリン酸化がどのような分子機構で複製起点の活性化をもたらすかを明らかにするためには、MCM タンパク質上のリン酸化部位を決定し、そのアミノ酸残基を置換した変異体を作製して、その機能を野生型と比較する必要がある。Cdc7 キナーゼによる生理的に意義がある MCM リン酸化部位の特定によって、Cdc7 による複製開始及び進行の制御メカニズムが明らかになるであろう。

MCM のリン酸化の意義を解析するために、私は、次のような戦略で実験を計画した。1) 生化学的に最も解析がすすんでいる動物細胞 MCM と Cdc7 キナーゼ複合体を用いて、まず生化学的に *in vitro* における Cdc7 によるリン酸化部位の同定を試みる。2) そのリン酸化の生体内での機能を明らかにするために、リン酸化部位変異体を作製し、*in vivo* における機能解析を行う。3) 機能的に保存されている酵母の MCM においても保存リン酸化部位の変異体を作製し、その機能を遺伝学的に解析する。これらの一連の解析により、Cdc7 による MCM のリン酸化が複製起点活性化を誘導する分子機序を明らかにすることを目標とした。本研究では、主に、動物細胞 Cdc7 キナーゼ複合体による MCM 複合体の *in vivo* 及び *in vitro* でのリン酸化部位の同定と、その機能解析を行った。

1) ヒト Cdc7 キナーゼ複合体による MCM 複体内及び単独の MCM2 のリン酸化

触媒サブユニット huCdc7 及び活性制御サブユニット ASK から構成される huCdc7-ASK キナーゼ複合体を昆虫細胞で発現し精製した。精製された huCdc7 キナーゼ複合体は *in vitro* で、同様に昆虫細胞で発現、精製した単独のマウス MCM2 タンパク質とともに、MCM2-4-6-7 複合体中の MCM2 タンパク質を効率よくリン酸化し、リン酸化の結果 MCM2 タンパク質は SDS-PAGE 上で早い移動度の方向にシフトした。細胞内での S 期初期の MCM2 もリン酸化により類似した移動度シフトを示すことから、複合体中における MCM2 の Cdc7 によるリン酸化が生理的に意義があるリン酸化である可能性が示唆された。MCM2-4-6-7 複合体中の MCM4 及び MCM6 タンパク質も程

度は低いが *in vitro* で huCdc7 キナーゼ複合体によりリン酸化された。

複合体特異的な MCM2 タンパク質のリン酸化は、トリプシン限定分解-2次元電気泳動によって、MCM2 単独の場合と複合体の場合とで一部異なったペプチドマッピングパターンを示すことから確認された。MCM2 は Cdk2-CyclinE, Cdk2-CyclinA, Cdc2-CyclinB によってもリン酸化されるが、ペプチドマッピングで調べたそれらのパターンは一部異なっており、Cdc7 は Cdk とは異なる領域をリン酸化することが示唆された。

2) *In vivo* 及び *in vitro* における MCM2 のリン酸化部位のマッピング

In vivo においては、細胞周期を同調した HeLa 細胞抽出液中の MCM2 タンパク質が S 期に進行するにつれてリン酸化され SDS-PAGE 上で早く移動する。さらに、分裂酵母の Mcm2 もリン酸化に伴い同様の移動度の変化があると報告された。細胞内での MCM2 タンパク質のリン酸化部位を検出するために、マウス Ba/F3 細胞を^[32P]正リン酸で標識して、MCM2 タンパク質の2次元ペプチドマッピングを行った。その結果、*in vivo* と *in vitro* で MCM2 のリン酸化部位は、類似したパターンを示すことから、*in vitro* で MCM2-4-6-7 複合体中における MCM2 の Cdc7 キナーゼによるリン酸化は生理的に意義があり、複製起点活性化に重要な役割を果たしている」と結論した。

MCM2 上の Cdc7-ASK キナーゼ複合体による *in vitro* でのリン酸化部位は複数個存在し、ペプチドや一部分を含む組み換えタンパク質のリン酸化から、マウス MCM2 上の S26 及び S40 がリン酸化されうること(後述)、S754, T757, S759, T763, S769 及び S802, T806, S810, S814, T818 のクラスター内に *in vitro* リン酸化部位が存在することが明らかになった。これらのリン酸化部位は他の真核生物種においても保存されており、機能的な重要性が示唆される。

3) Cdk と Cdc7 の協同作用による MCM2タンパク質のリン酸化:N 端近傍に存在する Cdk 及び Cdc7 リン酸化部位の同定

Cdc7 とともに、Cdk2-CyclinE は動物細胞の G1-S 移行に必要とされるが、S 期移行に必須な Cdk2-CyclinE の標的はまだ明らかになっていない。昆虫細胞で発現し脱リン酸化の後、精製したマウス MCM2-4-6-7 複合体は、脱リン酸化の前処理を行わない MCM 複合体に比べて、Cdc7 によるリン酸化の効率が低下するが、Cdk2-CyclinE であらかじめリン酸化してから、Cdc7 でリン酸化すると、Cdc7 によるリン酸化が特異的に促進されることが明らかとなった。さらに、この活性化に critical な Cdk によるリン酸化部位は S27 と S41 であることが明らかとなった。S27 及び S41 残基をアラニンに置換した MCM2 変異体(SASA 変異体)は、Cdc7 でリン酸化しても、SDS-PAGE 上でリン酸化のシフトが見えなくなる。一方、S27 及び S41 残基をグルタミン酸に置換した MCM2 変異体(SESE 変異体)は Cdk によりリン酸化しなくても huCdc7 により野生型 MCM2 と

ほぼ同様の効率でリン酸化され、SDS-PAGE 上での移動度も類似したパターンを示した。このように、CdkとCdc7キナーゼはともにMCMを標的として、協同作用により複製開始を誘導する可能性が示された。

S26 及び S40 のリン酸化は、細胞内の MCM2 の S 期特異的リン酸化部位と一致する。さらに、シフトを与える Cdc7 によるリン酸化は S26 及び S40 であることが明らかとなった。S27 及び S41 残基がグルタミン酸に置換され、さらに S26 及び S40 がアラニンに置換された変異 MCM2 を含む複合体では、Cdc7 による特徴的なシフトが観察されなかった。これらの結果から、*in vitro* で、Cdk はマウス MCM2 上の S27 と S41 をリン酸化し、その結果、Cdc7 による S26 及び S40 残基のリン酸化が特異的に促進されると結論した。

4) リン酸化部位変異体の機能解析

動物細胞内において、Cdc7 キナーゼにより生じると考えられるリン酸化型 MCM2 は主に、クロマチンから遊離した画分に回収される。また、S26, 27, 40, 41 をすべてアラニンに置換した AAAA 変異体は、核内への局在を失うことが示された。これに対し、グルタミン酸に置換した EEEE 変異体は核に局在する。これらの事実から、S26, 27, 40, 41 のリン酸化は核移行を促進する可能性も示唆された。この事実は、Cdc7 のリン酸化は MCM サブユニットのクロマチン結合及び細胞内局在を制御する可能性を示唆する。さらに、Cdc7 による MCM2 あるいは他の MCM サブユニットのリン酸化は MCM 複合体の高次構造の変化を誘起し、そのヘリカーゼ活性の活性化あるいは他のタンパク質との結合を促進し、最終的に複製起点の活性化(二本鎖 DNA のメルティング)をもたらす可能性を考えている。現在、作製した各種の MCM2 変異体をレトロウィルスベクターを用いて動物細胞内で発現し、その生化学的性状の解析及び、発現が細胞周期進行に及ぼす影響を検討している。また、N 端に存在する Cdk 及び Cdc7 リン酸化部位は、他の生物種でも保存されており、酵母を用いた変異体の遺伝学的解析結果とあわせて、そのより詳細な機能が明らかになることが期待される。

5) 結論

本研究においては、染色体複製の開始を制御する Cdc7 キナーゼによる MCM 複合体のリン酸化の解析を行い、MCM2 上の特異的なリン酸化部位を同定した。さらに、Cdk 及び Cdc7 キナーゼの協同作用による MCM のリン酸化が MCM の機能を制御する機構の一端を明らかにした。