

論文内容の要旨

論文題目

動物細胞を用いた

DNA 複製/チェックポイント因子 Claspin の

発現、精製と機能解析

氏名

宇野 修司

研究の背景、及び目的

DNA 複製期(S 期)では、DNA 複製が開始する場所に多くの関連因子が集合しており、DNA 複製複合体として機能している。一方で、紫外線やヒドロキシウレア(HU)などの複製を阻害する因子が細胞に加わると、DNA 複製複合体因子のリン酸化を通して、DNA 複製反応が一旦停止し、環境が改善されるまで安定的に複合体が維持される(チェックポイント経路)。

Claspin は *Xenopus laevis* において、Chk1(チェックポイント因子)と相互作用する分子として発見され、酵母(Mrc1)からヒトまで保存されている。Claspin は複製ストレスに応答するチェックポイント因子である(ATR/Chk1 の経路の Mediator であるとされる)とともに DNA 複製フォークとともに移動する DNA 複製因子である。Claspin は G1/S 期に、クロマチンにロードされ、複製複合体の一部として機能し、その後 Claspin は proteasome や caspase などによる分解を受け、G2/M 期へ移行するとされる。また、細胞内においては、Chk1 を始めとする複製チェックポイント因子の他に、多数の DNA 複製関連因子との相互作用も報告されている。実際に、動物細胞において Claspin の発現抑制により増殖が抑制されることが報告されている。また、酵母の Claspin ホモログの Mrc1 は効率のよい複製フォークの進行に必要なことが知られている。

このように Claspin が、DNA 複製複合体の一員として機能するということが、効率の良い DNA 複製に必要なであるということが想定されるが、その Claspin の具体的な機能を示す生化学的なデータは、これまでにほとんど報告されていない。その理由の一つとして、ヒト Claspin のサイズは非常に大きく(約 230kDa、1339a.a.)、かつ分解を受けやすいことから、昆虫細胞や大腸菌等を用いた既存の発現系では、全長の精製画分を獲得することが困難であったということが挙げられる。

本研究では、まずヒト Claspin の全長精製画分を獲得することを目指し、ヒト細胞を用いた巨大タンパク質の低分解、低コストでの高発現系を開発することを第一とした。次に、この系により得られた Claspin 精製画分を用い、生化学的な機能解析を行い、DNA 複製フォークにおけるヒト Claspin 分子の機能、特徴を解析した。

実験と結果

① Claspin ノックダウンの表現型

HeLa 細胞、及びヒト正常細胞(NHDF)にて、Claspin siRNA により発現を抑制させると、 ^3H -thymidine の取り込みは著しく減少した。この現象は DT40 Claspin $^{-/-}$ 条件変異株でも確認され、Claspin 非存在下では DNA 複製が遅延することが定量的に示された(Fig. 1)。

② チェックポイント因子、DNA 複製因子との相互作用

293T で mAG-Claspin-3xFlag を一過性に発現させ、Flag タグを利用した免疫沈降により、相互作用する分子を解析した。ATR、Cdc45、MCM、Cdc7、DNA polymerase epsilon、Tim/Tipin などの DNA 複製関連因子との相互作用が確認された(Fig. 2)。

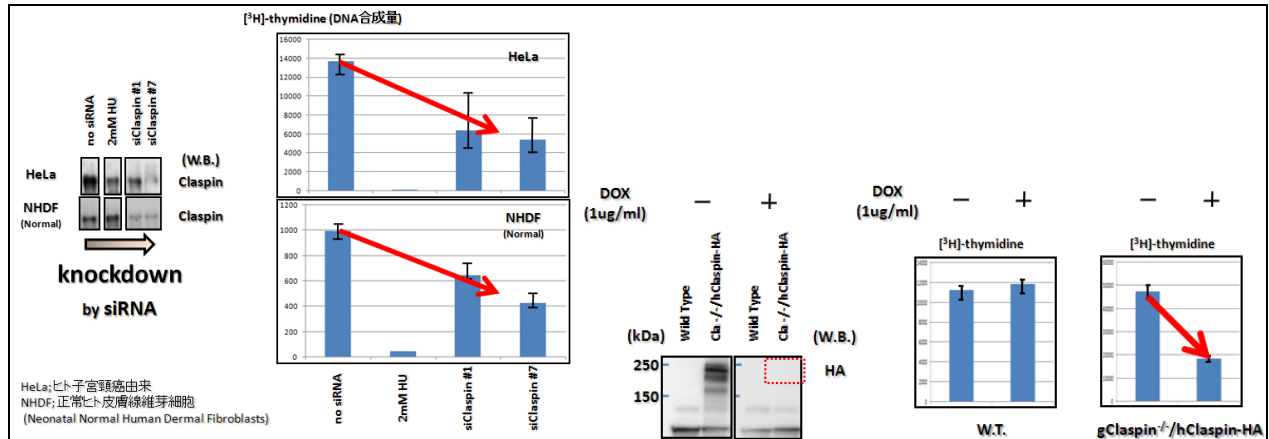


Fig. 1. Claspin の有無と DNA 複製

左図: HeLa 細胞、及び NHDF 正常細胞において Claspin の siRNA を行い、 ^3H -thymidine の取り込みを測定した。

右図: DT40 細胞に DOX を添加し、条件的に Claspin を knockout し、 ^3H -thymidine の取り込みを測定した。

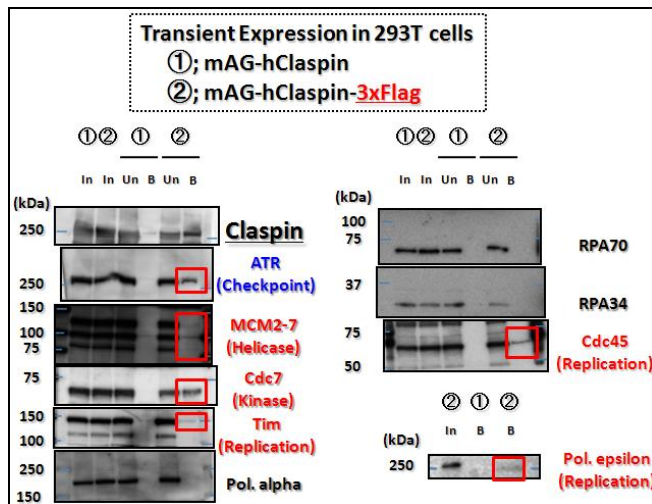


Fig. 2. ヒト細胞内で、Claspin と相互作用する因子

\pm Flag タグの Claspin を発現させた 293T 細胞を回収し Flag タグを使用した Pull down を行い、相互作用する因子を Western Blotting により検出した。

In = Input

Un = Unbound; Beads に結合しなかった sample

B = Bound; Beads に結合した sample

③ Polyethyleneimine (PEI)高分子と CSII-EF-MCS cDNA 発現ベクターを用いた Claspin タンパク質の高発現、及び精製法の確立

PEI は市販の試薬に比して 1000 倍以上安価な Transfection 試薬であり、cDNA を発現する細胞を大量に獲得したい場合に非常に強力な簡便なツールであることが判明した。実際驚いたことに、市販の TransIT293 試薬と比較して、PEI 試薬を用いた方が、一過性に発現された Claspin の分解が少ないことが観察された。

一方で、EF-1 α promoter と Kozak sequence を備えた Plasmid (CSII-EF-MCS)に cloning された cDNA は、293T 細胞の中で効率よく発現されることが分かった。293T 細胞はピペッティング操作により短時間で回収でき、かつ僅かな界面活性剤により容易に抽出液を得ることができるので、大腸菌や昆虫細胞と比べて操作が簡便である。

またこの系を用いて、ヒト cDNA を発現させた場合、付加したタグによる Pull down 法を用いて、相互作用の解析が即座に可能である上、発現させたタンパク質のリン酸化や糖鎖の付加といった修飾も期待できる、という利点がある。また本研究では、Claspin の N 端に mAG (monomeric Azami-Green) という GFP を改良した蛍光タンパク質が付加して発現をさせているが、この蛍光タンパク質は TEV プロテアーゼにより切り離し可能である(Fig. 3.)。

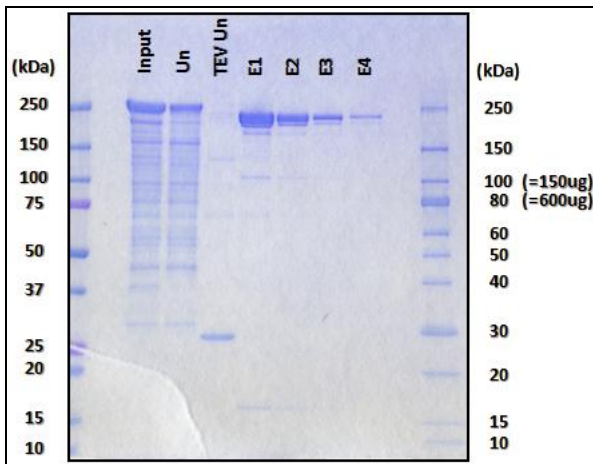


Fig. 3. 全長ヒト Claspin の精製

293T (15cm x 10plates)

で mAG-TEV-6xHis-hClaspin-3xFlag を発現させ、

Ni 精製→Flag beads 上で TEV 切断→Flag 精製を行った。

Input; Ni 精製画分

Un; Flag beads に結合しない sample

TEV Un; TEV protease を作用させて切り離される sample

④ PEI 試薬を使用した siRNA オリゴの Transfection

PEI は、siRNA オリゴの Transfection も可能であり、ヒト Cdc7 やヒト Claspin の knockdown が可能であることを確認した。また、cDNA の発現と siRNA による同時抑制を目的とした PEI/DNA, PEI/siRNA の複合体が、同一チューブ内で同時に形成され、Transfection が可能であった。このように PEI を用いた transfection system は今後様々な遺伝子解析に使用できる有用な方法である。

⑤ 精製 Claspin がマウス MCM4-6-7 helicase 活性に与える影響

マウス MCM4-6-7 は *in vitro* で helicase として機能する複合体である。今回精製したヒト Claspin 画分が、マウス MCM4-6-7 helicase 活性に影響を及ぼすデータを得た(Fig. 4.)。

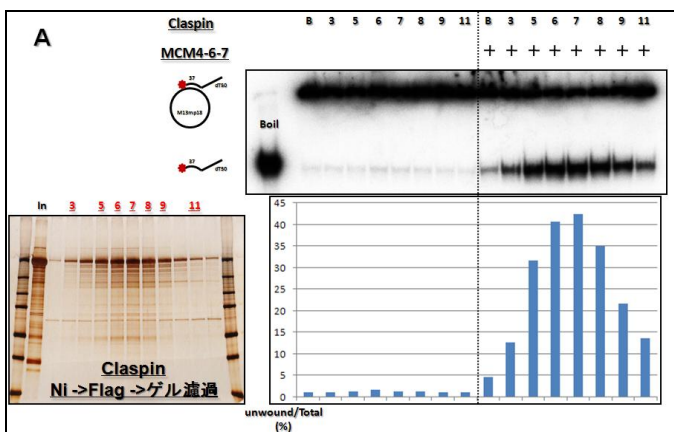


Fig. 4. MCM4-6-7 Helicase 活性に与える Claspin の影響

M13mp18 に、標識した 37mer-dT50 ssDNA を Annealing させた DNA を基質として、精製 hClaspin 画分を、mMCM4-6-7 の Helicase assay (標識した ssDNA が剥がされるかどうか) に加えた。A; Ni, Flag, ゲル濾過精製した Claspin 画分を、画分別に Assay に加えた。B; Ni Flag monoQ 精製した Claspin 画分の量を titration して Assay に加えた。

⑥ 精製 Claspin 画分の DNA 結合性

精製 Claspin 画分をゲルシフトアッセイに用い、報告のある DNA 結合性を確認した。

⑦ Claspin と MCM の相互作用

精製 Claspin 画分と、精製 MCM 画分を用い、Claspin と MCM が直接結合、さらに DNA 上で複合体を形成

することを確認した。

⑧ Claspin 欠失変異体を用いた相互作用因子の結合部位の同定

予測される DNA 結合ドメイン (Helix-turn-Helix)の他、ホモロジーサーチ(BLAST)により、保存性が高かった部分の欠失変異体を作成し、Pull down により、Tim/Tipin、Cdc7、MCM の、Claspin 上の結合部位を解析した。その結果――

結論

本研究により Claspin について、

- ・ MCM を含む各種複製因子、チェックポイント因子と相互作用する、
- ・ 動物細胞での効率よい発現系を利用して、生化学的解析に十分な量の高度に精製した画分を取得できた
- ・ 精製 Claspin は MCM helicase 活性を促進する
- ・ Claspin は動物細胞において効率の良い DNA 複製に必要とされる

ということが示された。また、今回構築した発現系は、既存のスタンダードな発現系と比較して、多くのメリットを持つことが判明した。これによりサイズが大きく、分解しやすいタンパク質の発現が、コストをかけずに可能になったので、今後の遺伝子機能解析が容易になることが期待される。

今後の予定

本研究において Claspin は MCM4-6-7helicase 活性を促進することを発見した。しかし、MCM helicase は *in vivo* では 2-3-4-5-6-7 の 6 量体を形成し、さらに Cdc45 や GINS と相互作用して巨大な helicase 複合体(CMG complex)を形成するとされている。今後この CMG 複合体に対する Claspin の影響を調べたい。Claspin の分子解剖から、種々の複製、チェックポイント因子との結合領域を同定した。Claspin は細胞内での DNA 複製に必要とされるが、作製した種々の変異体を用いて、複製能を維持するのに必要な領域を決定する。これらのデータを合わせ、Claspin を中心とした複製開始と複製フォーク進行の制御機構の解明をめざす。Claspin は複製ストレス時のみでなく、通常の細胞周期進行時にも(主に S 期)、リン酸化を受けることを見出している。さらに細胞周期の進行に必須な Cdc7 が、Claspin をリン酸化することを以前所属する研究室は報告した。リン酸化型の Claspin と、非リン酸化型の Claspin に機能の違いがあるか、DNA 複製や helicase 活性に与える影響を中心に調べていきたい。すでに質量分析(nano-ESI-MS)で同定したリン酸化部位(Fig. 5.)のアラニン置換変異 Claspin を作製し、それらの細胞内での発現は既に確認できている。

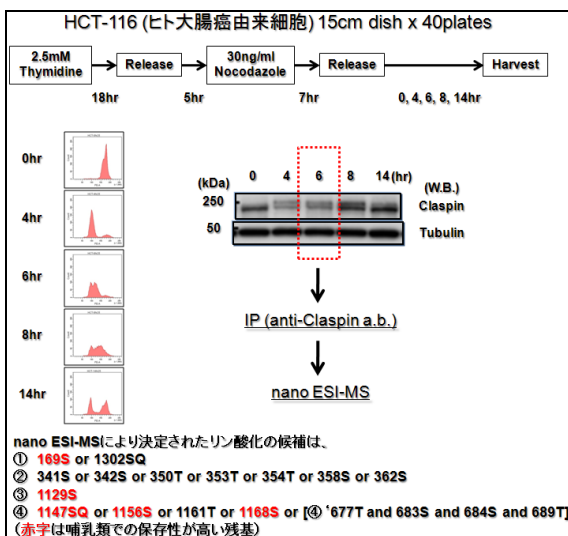


Fig. 5. ヒト Claspin のリン酸化部位

Thymidine と Nocodazole により G1/S 期に同調され、その後リリースされた HCT-116 細胞を 15cm x 40plates 分集めて(リリース 6 時間後)、内在 Claspin を免疫沈降により回収し、nano ESI-MS によりリン酸化部位を決定した。候補となったリン酸化部位のうち、赤字の残基は哺乳類での保存性が非常に高くなっている。