

A switch for S phase

DNA 複製を開始させるスイッチの解明

Michael Botchan



真核細胞が分裂するには、あらかじめ DNA を複製しておかなくてはならない。DNA 複製を開始するには複雑な段取りが必要であり、そこにはさまざまなタンパク質がかかわっている。その主な段階の 1 つについて詳細が明らかになった。

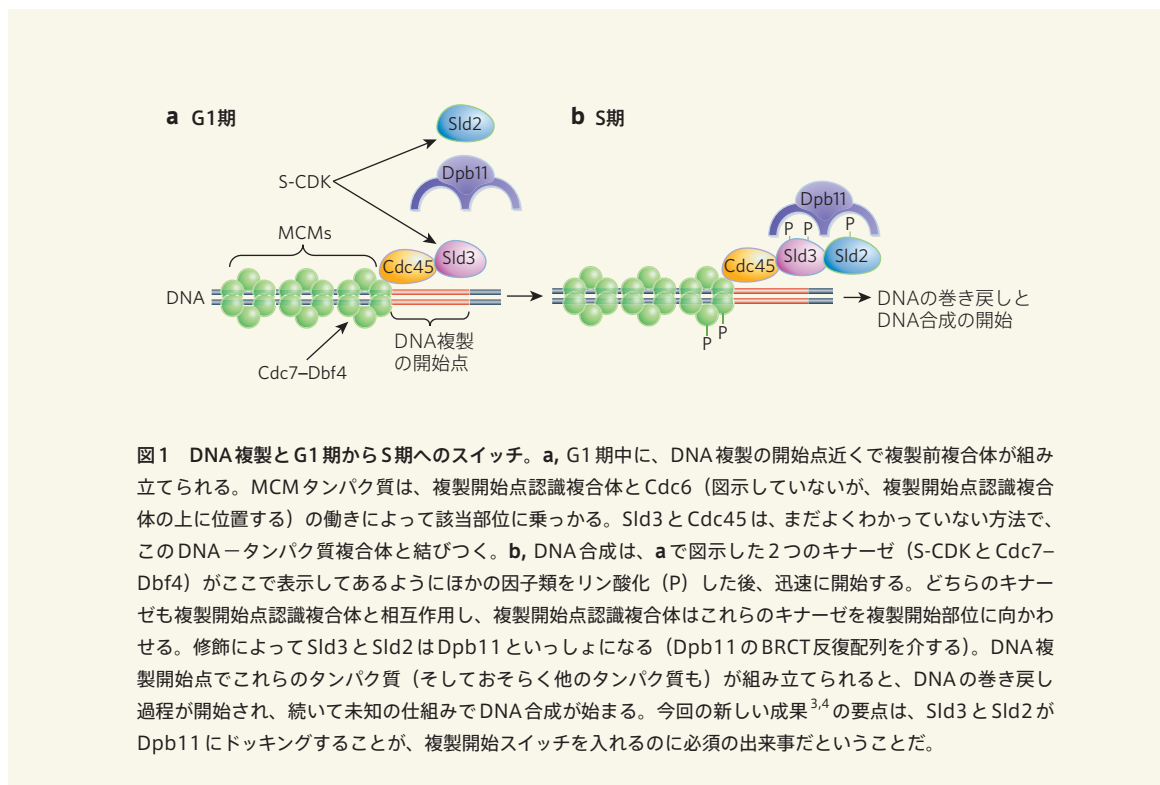
Nature Vol.445 (272-274)/18 January 2007

1992 年の *Nature* 誌上で Li と Alberts¹ は、同じ号に報告された創造的なある知見² について論評した。それは、DNA 上のスポットを認識して細胞周期の DNA 複製期を開始させるタンパク質因子を、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* で見つけたという知見だった。しかし、この「複製開始点認識複合体」を見つけ出すことは課題の 1 つにすぎず、DNA 合成を開始させる事実上のスイッチにいったい何が関与しているのかを突き止めることが、もう 1 つの課題として残されていた。後者の課題の達成が *Nature* 2007 年 1 月 18 日号で、Zegerman と Diffley³ および田中誠司たちのチーム⁴ によって報告されている。この複雑に入り組んだ過程の核心部分は、Sld3 と Sld2 という 2 種類のタンパク質のリン酸化（つまり活性化）と、Dpb11 という名の第 3 のタンパク質の関与にある。

DNA 複製過程は細胞周期の早い段階に、核の分裂の最後とその次の G1 期に起こる出来事とともに始まる。続いて S 期に DNA 合成が開始し、この DNA 合成の最中には全ゲノムの完全なコピー 1 組が作られる。細胞周期を区切る期から期への移行はいずれも、ほかのタンパク質のリン酸化を制御するサイクリン依存性キナーゼ（CDK）類の活性化と不活性化によって制御されている。したがって、複製開始点認識複合体

が見つかったからは、S-CDK(G1 期から S 期へのスイッチ切り替えを促す CDK) の実質上の標的を見つけることが大きな目標となった。

このスイッチの仕組みを解明するには、DNA 上の正しい位置にほぼ完全な複製装置をもって来る複雑な経路を調べる必要があった。最初に明らかになったのは、G1 期中に行われる複製前複合体の組み立ての解明だった（図 1）。この組み立てには、複製開始点認識複合体および低量の CDK と相互作用するさまざまな因子類が必要である。ヘリカーゼ酵素の一種によって行われる DNA 鎖の巻き戻しは、間違いなく DNA 合成の最も初期段階の 1 つであり、そうした酵素の不活性型が、この経路の早い段階で複製前複合体のところにやってくる。複製開始点認識複合体ともう 1 つの「プレーヤー」である Cdc6 が 1 つの装置を作り上げ、これが G1 期の最中に他のタンパク質（ミニ染色体維持タンパク質;MCM)を DNA 複製の開始点へ動員する⁵。MCM は最終的に、S 期中に不可欠なヘリカーゼ活性の担い手となる。他の研究⁶ から、複製前複合体の成分が S 期促進因子類によって破壊され、そのおかげで DNA 合成を一度だけ開始できる仕組みがすでに明らかにされていた。だが、DNA 合成開始の実質的なスイッチは謎に包まれたままだった。



Zegerman と Diffley³ および田中たちのチーム⁴は今回、分裂酵母でこのスイッチの構成成分、つまりS-CDKの標的にあたる成分を明らかにした。また両チームは、細胞がDNA合成を開始するためにG1期中に何を完了しておかなければならないかを驚くほど詳しく解明している。おそらくこのスイッチは、ポリメラーゼ(DNA合成を実質的に担う酵素)の基質を作り出すDNA巻き戻し過程の活性化に伴って登場し、Dpb11、Sld3、Sld2(略して11-3-2)を含んでいる。

荒木弘之たちによるこれまでの研究で、Sld2がS-CDKの非常に重要な標的であることや、Sld2とDpb11の間に遺伝的・生化学的な相互作用が存在することが明らかになっている。極めて重要なことに、リン酸化型のSld2はDpb11のBRCT反復配列という特定部分にしっかりと結合する。正常遺伝子のコピーに代わってリン酸化型類似の残基をコードする改変SLD2遺伝子を発現させると、機能は維持できたが、細胞はまだG1期通過と機能するS-CDKを必要とした。この知見は、S-CDKに他の標的が存在していることを実証したのではなく、あくまで暗示したものであった。Sld3にはCDK類によってリン酸化される部位が12か所あり、DPB11とSLD3に遺伝的相互作用があることから、実験のスポットライトがSld3に向けられた。

Zegerman と Diffley³ および田中たちのチーム⁴の新しい実験によって、Sld3の2つのアミノ酸残基およびSld2の1つのアミノ酸残基のリン酸化があれば、複製開始スイッチの作動に必要なものがすべて揃うことが明らかになったのである。重要なことに、リン酸化したSld2とSld3の2つのタンパク質はDpb11に結合しなければならず(図1)、この結合はおそらく、複製開始点認識複合体によってDNA複製開始点の印づけをなされた部位で起こっているのだろう。

この知識を武器に、2つの研究チーム^{3,4}はS-CDK-S-CDKがS期を促す必要のない「バイパス」状態を作り出すことができた。そして、このおかげでS期への進行を決定する機構を解きほぐすことができたのである。その研究手法には、細胞をG1期で停止させる α 因子という酵母由来ホルモンが使われた。この因子を遺伝子操作技術と併用することで、S-CDK活性なしにS期に入ることのできる酵母株がどういう経緯をたどるかを調べられる。

S-CDK活性が必要でない条件下では、DNA複製が早まりG1期は完全に回避されると予想できるだろう。Zegerman と Diffley³によれば、S-CDKバイパス系を備えた細胞を α 因子により停止させると、わずかなDNA複製しかみられない。G1期は細胞にとって

忙しい時期であるし、もう1つの必須なキナーゼである Cdc7 の調節サブユニット Dbf4 は、最初のうちは分解されてしまい、G1 期に特異的な CDK 類がタンパク質分解装置を不活性化させた後に初めて臨界値に達する。DNA 複製で Cdc7-Dbf4 キナーゼの主な標的になるものとして、MCM タンパク質群がある⁷ (図1)。Zegerman と Diffley は、バイパス系が適所にあつて Dbf4 が適正に発現すれば、 α 因子による G1 期停止細胞での DNA 複製を増強できること、そして、予想されるように死に至ることを報告している。したがって、G1 期に時期尚早の DNA 複製が起こらないようにするには、Cdc7 と S-CDK 両方の活性の調節が必要であり、図1にあるような一連の段取りが進められることになる。このようにして、細胞周期の次の期に入るため、あるいは少なくとも DNA 複製を行うために必要十分な条件を整えるには、G1 期中にどんなことを完了しなければならぬかが大まかに捉えられたわけである。

現在探し求められているのは、11-3-2 複合体がどんなことをやって DNA 複製を開始させているのかを知るための機構上の手がかりである。その機能が何であれ、11-3-2 複合体は一過性の存在であつて、DNA

合成を推進する段階を過ぎると必要でなくなる⁸。Box 1 に現在の考え方の一部を紹介した。この話題はこれから大きな関心を集めるだろう。

ところで、15年前に出されたコメントには私も共感を覚える。Li と Alberts は当時の News & Views で、複製開始点認識複合体を突き止めた成果を「聖杯」の発見に匹敵するものだと評価していたのだ。Zegerman と Diffley³ および田中たちのチーム⁴ が果たした今回の発見の重要性も、細胞生物学者や分子生物学者の立場からみれば15年前の言葉をそのまま当てはめて評価できると思う。 ■

Michael Botchan, カリフォルニア大学バークレー校 (米)

1. Li, J. J. & Alberts, B. *Nature* **357**, 114-115 (1992)
2. Bell, S. P. & Stillman, B. *Nature* **357**, 128-134 (1992)
3. Zegerman, P. & Diffley, J. F. X. *Nature* **445**, 281-285 (2007)
4. Tanaka, S. *et al.* *Nature* **445**, 328-332 (2007)
5. Randell, J. C. W., Bowers, J. L., Rodriguez, H. K. & Bell, S. P. *Mol. Cell* **21**, 29-39 (2006)
6. Blow, J. J. & Dutta, A. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 476-486 (2005)
7. Sheu, Y. J. & Stillman, B. *Mol. Cell* **24**, 101-113 (2006)
8. Kanemaki, M. & Labib, K. *EMBO J.* **25**, 1753-1763 (2006)
9. Moyer, S. E., Lewis, P. W. & Botchan, M. R. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **103**, 10236-10241 (2006)
10. Pacek, M. *et al.* *Mol. Cell* **21**, 581-587 (2006)
11. Gambus, A. *et al.* *Nature Cell Biol.* **8**, 358-366 (2006)

11-3-2 複合体と分子の仲人

11-3-2 (Dpb11-Sld3-Sld2) 複合体が DNA 複製を開始させるために何をしているかを知る手がかりは、田中たちの実験⁴の一部から得られた。彼らが探したのは、バイパス型の Sld2 と高レベルの Dbf4 が発現した場合に死に至る変異体だった。スクリーニングで、ある型の CDC45 遺伝子が見つかった。この遺伝子は JET1 として知られ、DNA 複製に必須なことがわかっている別のタンパク質をコードしている。JET1 を SLD2 バイパス型遺伝子と一しょに発現させると、G1 期と DNA 複製

開始の連結も切り離される。Cdc45 は、複製開始点認識複合体や Sld3、Cdc6、ミニ染色体維持タンパク質 (MCM) と一しょに複製開始点に乗っていることがわかっている (図1)。しかしこのタンパク質集団のうち、DNA ポリメラーゼとともにこの部位から移動するタンパク質は、MCM (結合したヘリカーゼとともに) と Cdc45 のみである。

おそらく、ヘリカーゼの活性化に必須の段階は、MCM に他の因子類が結合することだろう。これらの因子類の正体として、「GINS」複合体

が考えられている。これは、それぞれが DNA 複製に不可欠な4つのタンパク質から構成されている。11-3-2 複合体はいうなれば、DNA ポリメラーゼに従う複製装置全体の組み立てを完了させる分子の「仲人」だと考えられ、JET1 はこの複製装置と GINS 複合体の結びつきを安定化させているのかもしれない。MCM、Cdc45、GINS 複合体を含む複合体⁹ は *in vitro* 条件下でヘリカーゼ活性を示し、また、こうした因子類は実際に DNA ポリメラーゼとともに移動する^{10,11}。 M.B.