

- 15) Yoshikawa, T., Uchimura, E., Kishi, M., Funeriu, D.P., Miyake, M., & Miyake, J. (2004) *J. Control Release*, 96, 227–232.
- 16) Onuki-Nagasaki, R., Nagasaki, A., Hakamada, K., Uyeda, T.Q., Fujita, S., Miyake, M., & Miyake, J. (2008) *Lab. Chip*, 8, 1502–1506.

長崎 晃, 長崎 玲子, 藤田 聡史, 上田 太郎
(産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門)

Genome-wide screening methods for genes involved in cell migration

Akira Nagasaki, Reiko Nagasaki, Satoshi Fujita, and Taro Q. P. Uyeda (Research Institute for Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8562, Japan)

真核生物の染色体複製における多重クランプ・クランプローダー系の役割

1. はじめに

真核生物の染色体複製では、クランプである増殖細胞核抗原 (PCNA) とそれを DNA に結合させるクランプローダー (以下ローダーと略す) の複製因子 C (RFC) が対となって機能し、複製フォーク進行の中心的役割を果たしている。さらに、PCNA の多くの機能因子との結合や修飾による機能変換により、PCNA を足場とした染色体の維持伝達に機能する様々な反応が複製フォークの進行と連係して行われている。また PCNA 以外のクランプとしてチェックポイント応答で機能する Rad9-1-1, RFC 以外のローダーとしてチェックポイントの Rad17-RFC, 娘染色体接着の Ctf18-RFC, 染色体構造維持の Elg1-RFC など様々な反応に要求される複合体が存在する。これら複数のクランプとローダーは、それぞれに特異的な DNA 構造に対応して機能し、正常な複製フォーク進行のキープレイヤーとして働くと考えられている。

ここでは、我々がこれまでに PCNA・RFC の解析を足がかりとして研究してきた、染色体の複製から分配に至るまでの維持伝達機構における多様なクランプ・ローダー系の特性と機能連係について話を進めたい。特に、これまで積極的に解析を進めてきた Rad17-RFC と Ctf18-RFC, そして最近報告したローダーと DNA ポリメラーゼ間の相互作用を中心に紹介する。

2. 複製系の PCNA と RFC

PCNA に代表されるクランプは真核生物だけでなく、大腸菌の β サブユニット, T4 ファージの gp45, 古細菌の PCNA と生物種を超えて存在する。複製に必須なこれらのタンパク質は、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、その立体構造は全て特徴的なリング構造をとっている^{1,2)}。そしてこのリングの中央に DNA を通す様式で結合し、その上を自由にすべるため DNA スライディングクランプとも呼ばれる。我々が解析対象にしているヒト PCNA は、単一サブユニットが head-to-tail 様式で相互作用し形成される三量体のリングで、複製型 DNA ポリメラーゼ (Pol) δ/ϵ と結合し活性促進因子として機能する。これに加えて染色体の複製, 修復, 組換え, 接着, 分配, 再構築と修飾などに機能する 50 をこえる様々なタンパク質と結合することが明らかにされており³⁾, 複製から始まる一連の染色体維持伝達機構において中枢的な機能を担っている。さらに PCNA は、DNA 損傷に応答してユビキチン化や SUMO 化の修飾を受ける。この修飾により、複製型 Pol から DNA 損傷に対応した Pol への変換が起こり、フォークを進めることが示唆されている⁴⁾。さらに、特定のユビキチン化酵素の活性化に関与することで、いくつかのタンパク質の安定化制御も行っており⁵⁾, PCNA の多機能性はこれからも拡大していくと考えられる。

このような PCNA の機能は DNA に結合していることで発揮されるが、その結合には PCNA の閉じたリング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、ローダーがこの反応を触媒する。

ローダーも大腸菌の γ 複合体, T4 ファージの gp44/62 複合体, 古細菌と真核生物の 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²⁾。ヒトのローダーである RFC は、AAA+ATPase ファミリーに属する大サブユニット (RFC1) と四つの小サブユニット (RFC 2-5) から成るヘテロ五量体で、DNA と PCNA に依存して促進される ATPase 活性, 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 加水分解依存的に PCNA を鋳型 DNA に結合させる。我々はこれら PCNA と RFC の解析で、従来の生化学的解析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を行った。その結果、RFC は五つのサブユニットがリング状に集合した分子形態を持つこと、さらにこの構造が ATP 添加時に変化することを見いだした。このことから、この構造変化を通して PCNA リングの一時的な開環を仲

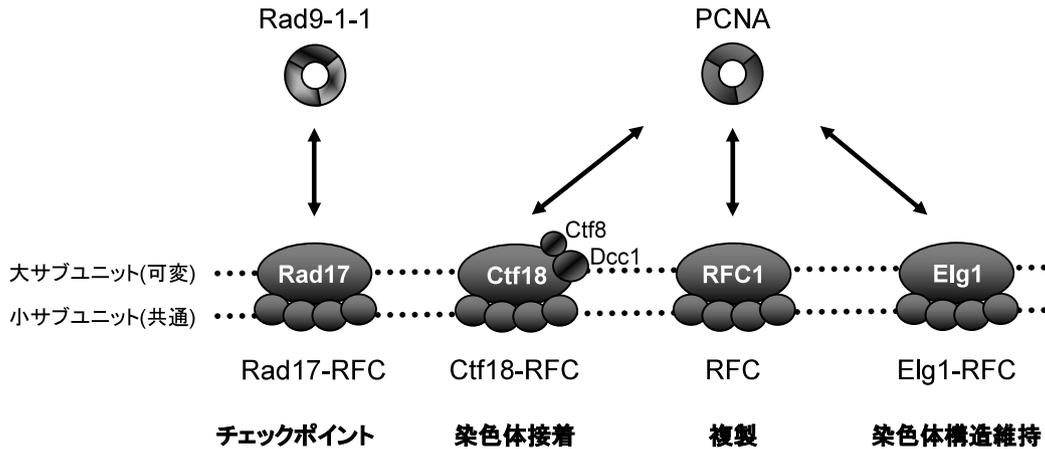


図1 二種のクランプと四種のローダー

PCNAは単一サブユニットから、Rad9-1-1は三つの異なるサブユニットから三量体リングを形成する。ローダーは共通の四つの小サブユニット(RFC2-5)と、ローダーごとに異なる一つの大サブユニットからなる五量体を形成する。Ctf18-RFCはさらにCtf8, Dcc1の二つを加えた七量体を形成している。

介するモデルを提唱した⁶⁾。その後、O'Donnellらによって酵母RFCの結晶構造が解かれ、五つのサブユニットのリング状の配置と詳細なATP加水分解機構、それに伴う構造変化とそれに伴う構造変化とDNAへのPCNA結合機構が示されており、以下に述べる多様なクランプとローダーによる反応を考える場合の基本となっている⁷⁾。

このようなクランプ・ローダー系は、複製で機能するPCNA・RFCに特有のしくみと考えられていたが、チェックポイント、染色体接着、染色体構造維持に関与する因子にクランプ・ローダーに相当するものが次々と見いだされてきた⁸⁾(図1)。そこで我々は、ヒト由来の多様なクランプ・ローダーをバキュロウイルスによる昆虫細胞発現系で再構築、精製し解析を行った。

3. チェックポイント系のRad9-1-1とRad17-RFC

DNA傷害による複製停止チェックポイント応答で機能する遺伝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。これらはヒトに至るまで高度に保存されており、PCNAの類縁タンパク質をコードしている。これらは互いにhead-to-tail様式で相互作用しRad9-Hus1-Rad1の形の複合体を形成することが再構成系で示され、Rad9-1-1と呼ばれ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、RFCの四つの小サブユニットとRad17-RFCと呼べる複合体を形成することが示

された。したがって、この複合体がRad9-1-1クランプに対応するローダーと考えられ、チェックポイント応答においても、複製のPCNA・RFCのようなクランプ・ローダー系が存在すると考えられるようになった。我々が精製したRad17-RFCはRad9-1-1との特異的な結合を示し、その比活性は低いもののローダーの特性であるプライマー/鋳型DNAとの結合、およびATPase活性を示した。さらに電子顕微鏡による分子構造解析では、Rad9-1-1, Rad17-RFCがそれぞれPCNA, RFCと類似の分子構造をしていることを明らかにした⁹⁾。以上の結果から、Rad9-1-1とRad17-RFCは新規のクランプ・ローダー系であることが強く示唆された。当時、我々の解析ではRad17-RFCによるRad9-1-1のDNAへの結合活性を直接証明することはできなかったが、その後、RFCがDNAの3'末端にPCNAを結合させるのに対し、Rad17-RFCはRad9-1-1を5'末端に結合させることがStillmanのグループによる精製タンパク質を用いた解析で示された¹⁰⁾。この特性は、Rad9-1-1を修復、組換えなどのDNA代謝中間体に結合させる特性に対応していると考えられる。また、Rad9-1-1はPol β , Polk, Fen1, DNAリガーゼIなどの相互作用が報告されている。これらはPCNAとも結合し協調的に機能することが知られているが、Rad9-1-1との結合の機能についてはまだよくわかっていない。

4. 染色体接着系のCtf18-RFC

複製の進行に伴って形成される娘染色体の接着と娘細胞への適切な分配に必須な出芽酵母の遺伝子として、*CTF18*

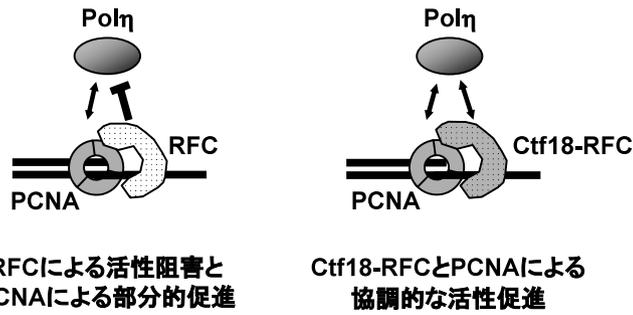


図2 二つのPCNAローダーによるPolηの活性制御機構のモデル
 通常の複製ではRFCがTLS Polを抑制し、Ctf18-RFCに対して特異的な鋳型DNA構造ではTLS Polを積極的に呼び込む。

が見いだされた。また *CTF18* は、*RAD24* (ヒト *RAD17*) と重複して複製停止チェックポイントへ関与することも明らかにされている。この遺伝子も RFC 類縁タンパク質をコードしており、RFC の四つの小サブユニットと複合体を形成する。さらに染色体接着に要求される Ctf8, Dcc1 を加えた七量体の Ctf18-RFC と呼べる新規ローダーが染色体接着でも機能していると考えられるようになった¹¹⁾。当初、Ctf18-RFC と対になるクランプは不明であったが、我々が細胞抽出液中の PCNA 結合タンパク質を質量分析法で網羅的に検索した際に、Ctf18 が含まれていることを見いだした¹²⁾。さらに精製した Ctf18-RFC は PCNA やプライマー/鋳型 DNA との特異的な結合、および、DNA と PCNA に依存して促進される ATPase 活性を示した。さらに Ctf18-RFC により DNA に結合された PCNA は、RFC で結合された PCNA と同等に Polδ 活性を促進し、Ctf18-RFC が第二の PCNA ローダーであることを初めて直接的に証明した¹³⁾。このように精製タンパク質を用いた解析では、二つの PCNA ローダーは同等の生化学的活性を示す。しかし複製と染色体接着、関与する機構に違いがあることから考えて、細胞内ではこれらを使い分ける仕組みがあるはずである。そこで我々は、この二つの PCNA ローダーの機能的特異性に焦点を絞り、これに関与する因子の解析を進めた。

5. 二つの PCNA ローダーによる Polη の活性制御

ヒト細胞抽出液から Ctf18-RFC と PCNA に特異性を持つ因子の検索を行った結果、これらによって特異的に促進される Pol 活性を見いだした。この活性画分を質量分析により解析した結果、損傷乗り越え型 DNA 合成 (TLS) を行うことが知られている Polη が含まれていることが明らかになった。そこで組換えタンパク質として精製した

Polη を用いて解析を行った結果、実際にその活性は Ctf18-RFC によって促進された。Polη は RFC によって DNA に結合した PCNA で活性が促進されることが既に報告されていたが、Ctf18-RFC では RFC より高い活性促進が見られた。さらに、PCNA と協調的に Polη を促進するだけではなく、Ctf18-RFC 単独でも活性促進することが明らかになった。これは、Ctf18-RFC と Polη の直接の相互作用を意味しており、実際に *in vivo*, *in vitro* で物理的な結合が見られた。この時、RFC と Polη の間にも直接結合が見られたが、RFC 単独では Polη 活性に阻害的に作用することを見いだした¹⁴⁾。以上の二つの PCNA ローダーが Polη と直接相互作用し、その活性を制御する特性は、複製フォークの進行が染色体接着や TLS 関連因子と密接に、また機能的に連係していることを示唆している (図 2)。

以上のように、複製進行過程でフォーク複合体の機能変換の足場として働いているのがクランプで、これに機能的特異性を持たせるのが RFC に代表されるローダーであるといえる。これらの組み合わせで、複製フォークは鋳型 DNA の多様な状況に対応できる特性と機能を持つことができると考えられる。後半で紹介したローダーと Pol の物理的、機能的相互作用の解析はまだ始まったばかりで、他の Pol の機能制御についても解析が待たれるところである。

6. おわりに

ヒトの PCNA, RFC が発見されてからおよそ 15 年が過ぎ、これまでに多くの生化学的、構造学的解析によりクランプ・ローダー反応の基本的な作用機序はかなり明らかになった。しかし、多重クランプ・ローダー系による複製フォーク機能の多様性、特に複製フォークを中心にした染色体維持伝達機構との機能連係についてはまだ不明な点が

多く残されている。そこで我々は、多重クランプ・ローダー系の細胞内相互作用因子の網羅的検索を行い、各系の共通性や特異性の比較、そして複製フォークにおける新規機能を明らかにするための解析を進めている。また同時に、PCNA修飾によるPolの切り換え機構や、機能がほとんど分かっていないEg1-RFCについても、精製タンパク質を用いた解析を積極的に進めているところである。そして、今後これらの解析が進展して新しい発見が蓄積することにより、クランプとローダーが中心となる複製フォーク進行と多様な染色体維持伝達のしくみについての新たな局面が明らかになっていくと考えている。

- 1) Tsurimoto, T. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, 1443, 23-39.
- 2) Indiani, C. & O'Donnell, M. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 751-761.
- 3) Moldovan, G.L., Pfander, B., & Jentsch, S. (2007) *Cell*, 129, 665-679.
- 4) Ulrich, H.D. (2004) *Cell Cycle*, 3, 15-18.
- 5) Nishitani, H., Shiomi, Y., Iida, H., Michishita, M., Takami, T., & Tsurimoto, T. (2008) *J. Biol. Chem.*, 283, 29045-29052.
- 6) Shiomi, Y., Usukura, J., Masamura, Y., Takeyasu, K., Nakayama, Y., Obuse, C., Yoshikawa, H., & Tsurimoto, T. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 14127-14132.
- 7) Bowman, G.D., O'Donnell, M., & Kuriyan, J. (2004) *Nature*, 429, 724-730.
- 8) Kim, J. & MacNeill, S.A. (2003) *Curr. Biol.*, 13, R873-875.
- 9) Shiomi, Y., Shinozaki, A., Nakada, D., Sugimoto, K., Usukura, J., Obuse, C., & Tsurimoto, T. (2002) *Genes Cells*, 7, 861-868.
- 10) Ellison, V. & Stillman, B. (2003) *PLoS Biol.*, 1, E33.
- 11) Naiki, T., Kondo, T., Nakada, D., Matsumoto, K., & Sugimoto, K. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, 21, 5838-5845.
- 12) Ohta, S., Shiomi, Y., Sugimoto, K., Obuse, C., & Tsurimoto, T. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 40362-40367.
- 13) Shiomi, Y., Shinozaki, A., Sugimoto, K., Usukura, J., Obuse, C., & Tsurimoto, T. (2004) *Genes Cells*, 9, 279-290.
- 14) Shiomi, Y., Masutani, C., Hanaoka, F., Kimura, H., & Tsurimoto, T. (2007) *J. Biol. Chem.*, 282, 20906-20914.

塩見 泰史*, 釣本 敏樹

(九州大学大学院理学研究院染色体機能学)

(*現所属 兵庫県立大学大学院生命科学研究科

生体情報学 II)

Function of multiple clamp and loader systems in eukaryotic chromosome replication

Yasushi Shiomi* and Toshiki Tsurimoto (Department of Biology, Faculty of Sciences, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812-8581, Japan; *Present address: Graduate School of Life Science, University of Hyogo, Kamigori, Ako-gun, Hyogo 678-1297, Japan)

胃酸分泌細胞における K^+ - Cl^- 共輸送体と P 型 ATPase の機能連関

1. はじめに

K^+ - Cl^- 共輸送体 (KCC) は、上皮イオン輸送や細胞容積調節機構等に関与し、これまでに四つのアイソフォーム (KCC1-KCC4) が同定されている¹⁾。KCC3 には三つのスプライシングバリエーション (KCC3a-KCC3c) が存在する。KCC1 は多くの組織に分布しているが、KCC2 と KCC3b の発現はそれぞれ神経系と腎臓に限られる。KCC3a と KCC4 は主として上皮細胞に発現している。これまでに胃における KCC の発現については報告されていなかった。本稿では、最近我々が胃酸分泌細胞において見出した KCC の発現とその生理機能について紹介したい。特に P 型 ATPase の Na^+ , K^+ -ATPase, H^+ , K^+ -ATPase と KCC との機能連関について述べる。

2. 胃酸分泌細胞基底側膜における KCC3a の発現²⁾

ノーザンブロットおよびウエスタンブロットにより、ラット、ウサギ、ヒト胃酸分泌細胞に KCC3a が発現していることを見出した。そこでラット胃粘膜標本の免疫組織染色により、胃腺における KCC3a の分布を調べた。胃酸分泌細胞は、胃腺の上部 (頸部) から下部 (深部) に至るまで分布しているが、上部の胃酸分泌細胞は酸分泌能が高く (分泌される酸の pH は約 1)、下部の胃酸分泌細胞は酸分泌能が低い (分泌される酸の pH は約 3) ことが知られている。KCC3a は酸分泌能の高い胃腺上部の胃酸分泌細胞に分布しており、胃酸分泌細胞の基底側膜に局在していた。ラット胃粘膜由来の膜標品における免疫沈降で、KCC3a は基底側膜の Na^+ , K^+ -ATPase $\alpha 1$ サブユニット ($\alpha 1NaK$) と共沈したが、分泌膜の H^+ , K^+ -ATPase α サブユニット (HK α) とは共沈しなかった。

両性界面活性剤の CHAPS (1%) で処理した胃粘膜標品をスクロース密度勾配遠心にかけ、界面活性剤不溶性画分 (detergent-resistant membrane; DRM) と可溶性画分 (non-DRM) をそれぞれ単離し、各タンパク質の分布を調べた。その結果、KCC3a, $\alpha 1NaK$ および脂質ラフトマーカーの flotillin-2 はすべて DRM において検出された。DRM はコレステロールとスフィンゴミエリンに富む、脂質ラフトやカベオラに由来するものと考えられている³⁾。