

MCM ヘリカーゼファミリー因子の構造と機能

鐘巻 将人

1. はじめに

DNA 複製は二本鎖 DNA をほどこき各々の鎖を鋳型に新生鎖が合成されるプロセスである。DNA 複製には DNA ヘリカーゼと DNA ポリメラーゼが必須であり、特に前者の制御が複製開始から複製フォークを形成する過程において重要である。これまでの研究により、真核生物の複製ヘリカーゼは Mcm2-7 複合体であることが明らかにされている。AAA+ATPase スーパーファミリーに属する六つの構成サブユニットは ATPase/ヘリカーゼ活性を担う中央部分を中心に互いに相同性を持っており、単一の祖先分子から六つに進化したと考えられている¹⁾。多くの真核生物は、同じ MCM (minichromosome maintenance) 祖先分子から進化したと考えられる、さらに二つの MCM 因子 (Mcm8 と Mcm9) を保持している。本稿ではこれら MCM ヘリカーゼファミリー因子の構造と機能を説明するとともに、これら因子が実際に機能する DNA 複製と組換え修復の進化的関連性に関して解説する。

2. MCM ヘリカーゼファミリーの構造と進化的保存性

すべての MCM ヘリカーゼファミリー因子は、中央部分にファミリー間で保存されたドメインを持つ (図 1A)²⁾。この MCM ファミリードメインには ATP 加水分解に役割を果たす Walker A, B モチーフや、隣り合ったサブユニットの ATP 加水分解活性化に役割を果たす Arg フィンガーモチーフを含んでいる。その他、N 末端には多量体形成 (特にダブル六量体構造形成) に重要と考えられる Zn フィンガー構造が保存されている。N 末端と C 末端部分は因子により長さが異なっており、多数のリン酸化部位やほかの因子との結合部位があることから、これら部位により機能的分化が起きたようである。 *Sulfolobus solfataricus*

や *Methanothermobacter thermoautotrophicus* などの古細菌においては、単一の MCM 因子がホモ六量体を形成し、複製ヘリカーゼとして機能している。一方、真核生物においては Mcm2-7 がヘテロ六量体を形成しており、複製ヘリカーゼとして機能している。古細菌 MCM, 真核生物 Mcm2-7 とともに *in vitro* において 3'→5' ヘリカーゼ活性を持っている²⁾。複製フォークにおいて、鋳型一本鎖 DNA は MCM の六量体リング構造を通過しており、ATPase 加水分解に伴い MCM が移動することで一本鎖 DNA を露出させる立体排除 (steric exclusion) モデルがこれまでの研究から支持されている。これらの結果から、古細菌 MCM と真核生物 Mcm2-7 はリーディング鋳型鎖上を移動すると考えられている。

Mcm2-7 がすべての真核生物において高度に保存されているのに対し、Mcm8 と Mcm9 は酵母や線虫を含む一部の生物種では両方とも欠失している (図 1B)。進化系統研究は、真核生物の共通祖先が Mcm8 と Mcm9 を保持していたことを支持しており、両因子は種分化に伴い酵母や線虫で独立に失われたと考えられる¹⁾。このことは、Mcm8 と Mcm9 の機能的な関連性を示唆しており、実際近年二つの因子が複合体を形成していることが示された^{3,4)}。ニワトリ DT40 細胞において、Mcm8-9 は Mcm2-7 とは独立の複合体を形成しており、抽出液をゲル濾過分画すると Mcm2-7 とほぼ同じフラクションに検出される。また、Mcm8 と Mcm9 には強い結合がみられるが、Mcm8-Mcm8 や Mcm9-Mcm9 での強い結合はみられていない (未発表データ)。このことは、図 1A に示すヘテロ六量体として Mcm8-9 複合体が機能している可能性を示唆している。

ショウジョウバエは REC と呼ばれる Mcm8 のホモログを単独で保持する唯一の例外である¹⁾。蚊などほかの昆虫は Mcm8 と Mcm9 を両方保持していることから、ショウジョウバエ特有の進化と考えられ、実際に REC の進化速度は他生物種の Mcm8 より速い。REC は減数分裂時の組換えに機能することが知られているが、その際に新たな機能を取り込んだ可能性が考えられる⁵⁾。

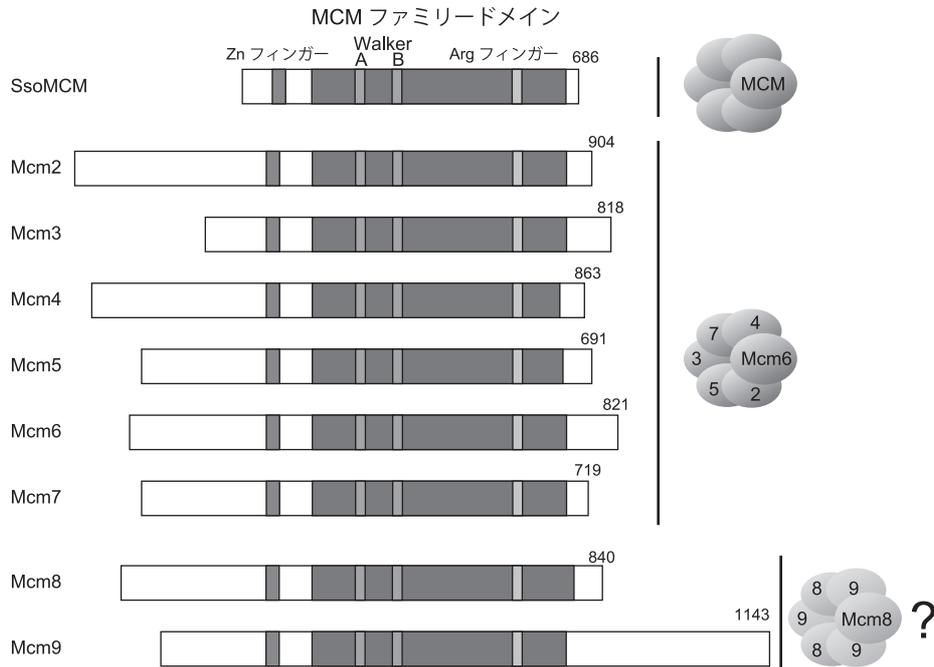
Mcm8 と Mcm9 の喪失は比較的ゲノムサイズの小さい真核生物種で起きているように思われる (図 1B)。このことは、Mcm8-9 複合体が比較的大きなゲノムの安定性を維持することに役立っている可能性を示唆している。実際、近

国立遺伝学研究所・新分野創造センター/JST さきがけ (〒411-8540 静岡県三島市谷田 1111)

Structure and function of the MCM family proteins

Masato T. Kanemaki (Center for Frontier Research, National Institute of Genetics/JST PRESTO, Yata1111, Mishima, Shizuoka 411-8540, Japan)

A



B

	MCM2-7	MCM8	MCM9	ゲノムの大きさ (bp)
LCAE	○ (予想)	○ (予想)	○ (予想)	?
<i>S.cerevisiae</i>	○	X	X	1.2 x 10 ⁷
<i>S.pombe</i>	○	X	X	1.2 x 10 ⁷
<i>N.crassa</i>	○	X	X	3.8 x 10 ⁷
<i>Dictyostelium</i>	○	○	○	3.4 x 10 ⁷
<i>C.elegans</i>	○	X	X	1 x 10 ⁸
<i>Drosophila</i>	○	○	X	1.2 x 10 ⁸
chicken	○	○	○	1 x 10 ⁹
mouse	○	○	○	3.4 x 10 ⁹
human	○	○	○	3.3 x 10 ⁹

○: 存在する X: 存在しない

LCAE: 真核生物の共通祖先 (last common ancestor of eukaryotes)

図1 MCM ファミリータンパク質の構造と保存性

(A) 古細菌 *S. solfataricus* MCM と真核生物に存在する八つの MCM タンパク質の模式的構造. 古細菌 MCM はホモ六量体を形成し, 真核生物 Mcm2-7 はヘテロ六量体を形成する. Mcm8-9 は互いに結合するがその構造はまだ明らかになっていない. (B) 真核生物における MCM タンパク質の保存性とゲノムサイズの相関性. 真核生物の共通祖先 (LCAE) は八つすべてを保持していたと予想される.

年の研究により Mcm8-9 複合体がある種の組換え修復に機能していることが明らかになった^{3,4)}.

3. Mcm2-7 複製ヘリカーゼの制御と機能

Mcm2-7 を構成するサブユニットは出芽酵母の細胞周期異常 (*cdc* 変異) やミニ染色体保持異常 (*mcm* 変異) および分裂酵母の染色体分裂異常 (*mis* 変異) を引き起こす原因因子として同定された。一方, Mcm2-7 はアフリカツメガエルの卵抽出液中において1細胞周期に一度の DNA 複製を保証するライセンス因子としても同定された。ライセンス機構の実体は, 下記に述べる細胞周期依存的な Mcm2-7 複合体の染色体結合とヘリカーゼ活性化制御にあると考えられる。

真核生物の DNA 複製は染色体上に複数存在する複製開始点から開始するが, その分子メカニズムは出芽酵母において最も詳細に研究されている。複製開始点には ORC (origin recognition complex) が結合しているが, CDK 活性が低い M 期終期から G1 期にかけて, Mcm2-7 が複製開始点に結合する。この過程には ORC だけでなく, Cdc6 と Cdt1 が必要であり, 形成される複合体は pre-RC (pre-replicative complex) と呼ばれる (図2A)。ORC, Cdc6, Cdt1 は S 期における複製開始反応には必要でないことから, これら因子は Mcm2-7 の複製開始点への呼び込み反応に特化した機能を持つと考えられる。1 サイクルのローディング反応において Mcm2-7 はダブル六量体として DNA に結合する。また, pre-RC 中の Mcm2-7 リングには二本鎖 DNA が通過していると考えられている。Mcm2-7 はこの状態では

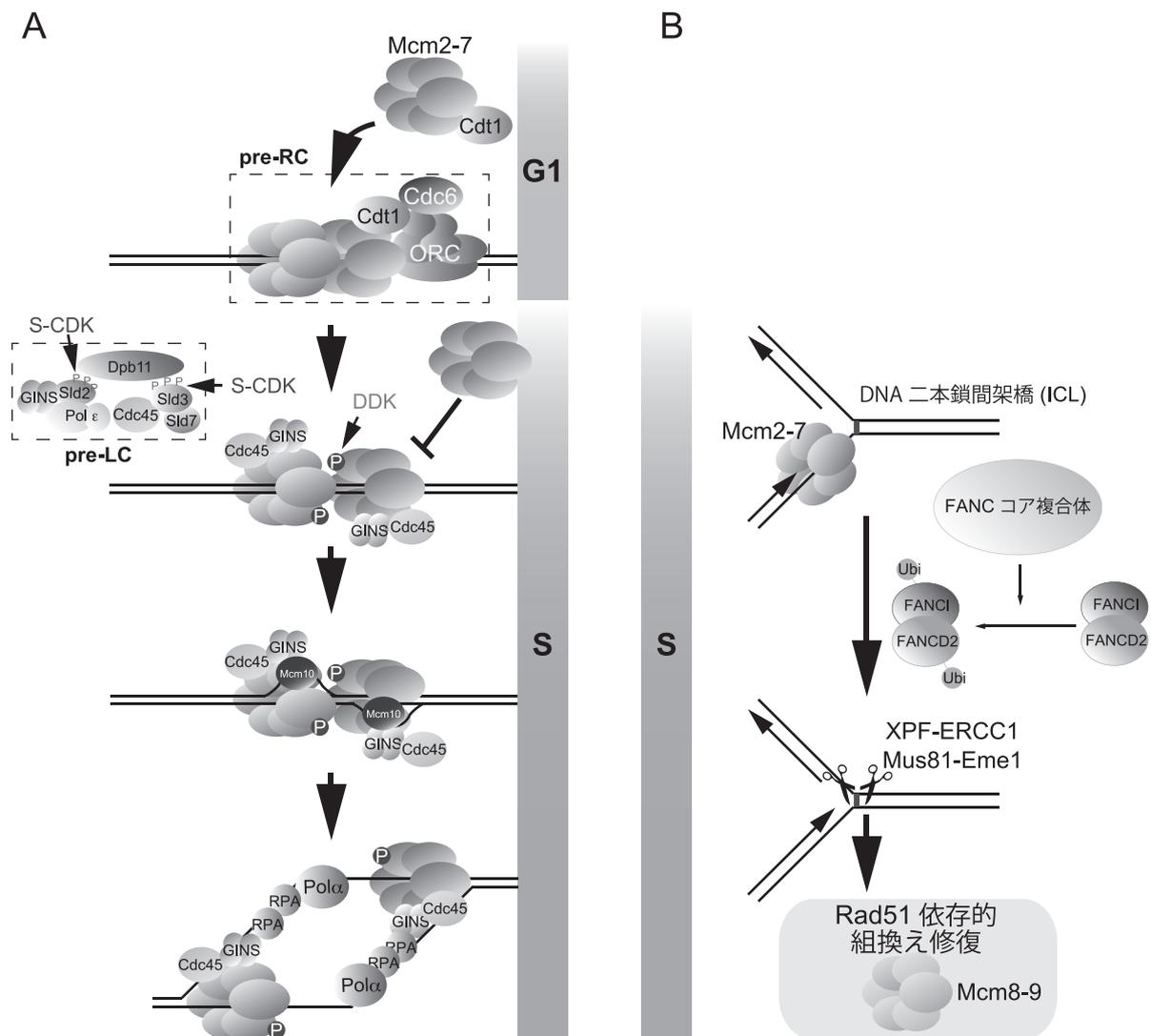


図2 Mcm2-7 と Mcm8-9 の機能モデル

(A) 出芽酵母における Mcm2-7 複合体を中心とした複製開始反応のモデル図。(B) 高等真核生物における, ICL 修復モデル図。Mcm8-9 複合体は二本鎖 DNA 切断後の Rad51 依存的相同組換え反応に寄与する。

ヘリカーゼとして不活性であるため DNA 複製は開始しない。このことは Mcm2-7 が単体ではほとんど DNA ヘリカーゼ活性を持たず、以下に示す Cdc45 と GINS というコファクターが結合した際にヘリカーゼ活性を持つという *in vitro* の生化学実験結果と一致する。

細胞が S 期に入る直前から Cdc7-Dbf4 から構成される DDK (Dbf4-dependent kinase) が活性化され、S 期には S-CDK (出芽酵母では Cdc28-Clb5, 6) が活性化される。これに伴い、DDK は Mcm2-7 (特に Mcm4) の N 末端部分をリン酸化し、S-CDK は Sld2 と Sld3 をリン酸化する。後者のリン酸化は Dpb11 を介した pre-LC (pre-loading complex) の形成を促進する (図 2A)。DDK による Mcm2-7 のリン酸化は Sld3-Sld7 の pre-RC 結合を促進すると予想されており、結果として Cdc45 と GINS 複合体が pre-RC に呼び込まれる。Mcm2-7 に Cdc45 と GINS が結合した複合体は CMG (Cdc45-Mcm-GINS) 複合体と呼ばれており、*in vitro* においてヘリカーゼ活性を示すことから、CMG 複合体が活性型複製ヘリカーゼであると考えられる⁹⁾。さらにこの下流で MCM ヘリカーゼファミリーではない別の複製因子 Mcm10 が複製フォーク形成に重要な役割を果たすと考えられている^{7,8)}。この過程では Mcm2-7 のリングを通過する二本鎖 DNA が一本鎖 DNA に変換される過程があると予想されており、Mcm10 は CMG のリモデリングに役割を持つかもしれない。最終的に CMG 複合体はリーディング鎖上に結合し、ヘリカーゼとして一本鎖 DNA を露出させることで RPA と Pol α を呼び込み複製フォークが形成される。

pre-RC 中の Mcm2-7 は、S 期に CMG に変換されてヘリカーゼとして活性化される一方で、S 期には新規 pre-RC の形成は抑制される。このメカニズムは出芽酵母では Mcm2-7 の核外輸送、Cdc6 の分解、ORC のリン酸化により複合的に阻害されている。高等真核生物においては、Cdt1 の分解と geminin による Cdt1 阻害により新規 pre-RC 形成が抑制される⁹⁾。いずれの真核生物においても、Mcm2-7 のローディングと活性化の時期を分割し、そこに専用のメカニズムを作り出すことにより 1 細胞周期に 1 回だけ DNA 複製が起こることを可能にしている。このことは、Mcm2-7 ヘリカーゼが DNA 複製反応における中心的制御標的であることを示している。

4. Mcm8-9 の制御と機能

Mcm8-9 は酵母に存在しないため、近年までその機能解析がほとんど進んでいなかった。マウスおよびニワトリ DT40 細胞において、MCM8 および MCM9 遺伝子は生存に必須ではないため、DNA 複製反応そのものには必須ではないと考えられる。しかし、これら遺伝子を欠損したマ

ウスは生殖能がほとんどなく、精原細胞増殖もしくは減数分裂に問題が生じる^{3,10)}。また、卵巣などにおいて高発がん性を伴うため、染色体安定性維持に問題がある。Mcm8 と Mcm9 は複合体を形成しているため互いに協調的に機能すると考えられるが、それぞれのノックアウトマウスの表現型は若干異なっている。このことは Mcm8 と Mcm9 が複合体以外の形で機能していることを示唆しているのかもしれない。

MCM8 および MCM9 遺伝子を欠損した DT40 細胞は紫外線や放射線にはそれほど強い感受性を示さないが、DNA 二本鎖間架橋 (ICL: inter-strand crosslink) を生じるシスプラチンやマイトマイシン C に強い感受性を示す。動物細胞では ICL 修復は主に DNA 複製と共役的に起こることが知られている¹¹⁾。ICL は複製フォークの停止を引き起こし、ユビキチンリガーゼ FANCD2 複合体の活性化とそれによる FANCD2 複合体のモノユビキチン化によるファンconi 経路活性化の後に DNA 二本鎖切断が誘導される。最終的に切断部位は相同組換えによって修復が行われることが知られている。複製フォーク停止からファンconi 経路活性化は近年の研究により次第にそのメカニズムが明らかになってきたが、その下流で起こる相同組換えはほとんどわかっていない。筆者らのグループは ICL 修復過程で必要とされる相同組換えに Mcm8-9 が関与していることを明らかにした (図 2B)⁴⁾。

興味深いことに放射線照射により引き起こされる DNA 二本鎖切断修復にも相同組換えは関与しており、組換え因子 Rad51 は相同組換え開始に常に必要である。しかしながら、MCM8 および MCM9 欠損細胞は放射線にはほとんど感受性を示さない。このことは、ICL 修復には Mcm8-9 が関与する特別なタイプの相同組換えが必要である可能性を示唆している。

5. DNA 合成という見地からみた DNA 複製と組換え修復

ここまで Mcm2-7 が DNA 複製の中心因子として機能し、Mcm8-9 が組換え修復に関与していることを示した。しかし、同じ祖先分子から進化した MCM 複合体が、なぜ異なった DNA 処置反応に関与しているのだろうか？これは、両反応とも DNA 合成の一形態であるという視点から考えてみると統一的に理解できるのかもしれない。DNA は相補的な塩基対形成により安定に保たれているために、DNA 合成をするには開裂を必要とする。そのため、長距離にわたる DNA 合成には DNA ヘリカーゼが必須となる。DNA 複製も相同組換えも DNA 合成を行う点では一致しており、その違いはどのようにヘリカーゼを DNA にローディングし、開裂を引き起こすかという点にある。DNA

複製は細胞周期と協調して作動するために、複製開始点において数多くの複製因子を Mcm2-7 ヘリカーゼの制御にあてて、S 期に DNA 合成を行う。一方、組換え修復は DNA 二本鎖切断箇所に Rad51 を呼び込み、相同鎖にもぐり込みを起こし DNA 合成を行う。組換え修復時に鎖合成を促進するヘリカーゼの実体はまだよくわかっておらず、Mcm8-9 がこの過程に役割を持つのかもわからない。

大腸菌においては単一の複製開始点 *oriC* から DnaA 依存的に複製を行う。しかし RNase HIなどを欠損した細胞では、*oriC* や DnaA を欠損することができる¹²⁾。この細胞においては、組換え因子 RecA (Rad51 機能ホモログ) 依存的な DNA 複製 (stable DNA replication と呼ばれる) が起きており、組換え部位において DnaB ヘリカーゼをローディングするメカニズムが存在する。類似の組換え依存的 DNA 合成は真核生物でも BIR (break-induced replication) として知られている¹³⁾。MCM 因子の進化は細胞周期依存的 DNA 合成 (DNA 複製) と組換え依存的 DNA 合成 (組換え修復) に合わせて進化を遂げたのかもわからない。

DNA 複製に関しては、すでに出芽酵母の複製因子を材料に pre-RC 構築反応が *in vitro* 再構成されており、抽出液を用いた系で *in vitro* 複製開始反応も達成されている。今後は、より詳細な複製開始反応メカニズムの解析と全過程の再構成が期待される。特に pre-RC 中の Mcm2-7 が、活性型 CMG ヘリカーゼに変換されたあと、二本鎖から一本鎖 DNA に乗り換える過程が想定されているが、その反応メカニズムの解明が待たれる。Mcm8-9 に関しては、今後より詳細な組換え修復反応における機能解析が期待される。同時に Mcm8-9 複合体の構成、*in vitro* におけるヘリカーゼ活性の検証、DNA へのローディングメカニズムの解析が期待される。古細菌においては通常単一の MCM がホモ六量体を構成し、DNA 複製に寄与していると考えられるが、*Thermococcus kodakaraensis* などは三つの MCM パラログを保持しており、そのうち二つはホモ六量体を形

成しヘリカーゼ活性を持つようである^{14,15)}。一つの MCM を除いて残りは生存に必須ではないため、これら非必須 MCM が真核生物の Mcm8-9 と同様に組換え修復に関与するのかどうか興味深い。将来の研究により、MCM ヘリカーゼファミリーの進化と DNA トランスアクションに対する機能分化の理由が理解されることが期待される。

- 1) Liu, Y., Richards, T.A., & Aves, S.J. (2009) *BMC Evol. Biol.*, 9, 60.
- 2) Bochman, M.L. & Schwacha, A. (2009) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 73, 652-683.
- 3) Lutzmann, M., Grey, C., Traver, S., Ganier, O., Maya-Mendoza, A., Ranisavljevic, N., Bernex, F., Nishiyama, A., Montel, N., Gavois, E., Forichon, L., de Massy, B., & Méchali, M. (2012) *Mol. Cell*, 47, 523-534.
- 4) Nishimura, K., Ishiai, M., Horikawa, K., Fukagawa, T., Takata, M., Takisawa, H., & Kanemaki, M.T. (2012) *Mol. Cell*, 47, 511-522.
- 5) Kohl, K.P., Jones, C.D., & Sekelsky, J. (2012) *Science*, 338, 1363-1365.
- 6) Ilves, I., Petojevic, T., Pesavento, J.J., & Botchan, M.R. (2010) *Mol. Cell*, 37, 247-258.
- 7) Watase, G., Takisawa, H., & Kanemaki, M.T. (2012) *Curr. Biol.*, 22, 343-349.
- 8) Kanke, M., Kodama, Y., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., & Masukata, H. (2012) *EMBO J.*, 31, 2182-2194.
- 9) Diffley, J.F. (2004) *Curr. Biol.*, 14, R778-R786.
- 10) Hartford, S.A., Luo, Y., Southard, T.L., Min, I.M., Lis, J.T., & Schimenti, J.C. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 17702-17707.
- 11) Deans, A.J. & West, S.C. (2011) *Nat. Rev. Cancer*, 11, 467-480.
- 12) Kogoma, T. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 61, 212-238.
- 13) Paques, F. & Haber, J.E. (1999) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 63, 349-404.
- 14) Ishino, S., Fujino, S., Tomita, H., Ogino, H., Takao, K., Daiyasu, H., Kanai, T., Atomi, H., & Ishino, Y. (2011) *Genes Cells*, 16, 1176-1189.
- 15) Pan, M., Santangelo, T.J., Li, Z., Reeve, J.N., & Kelman, Z. (2011) *Nucl. Acids Res.*, 39, 9671-9680.

著者寸描**●鐘巻将人** (かねまき まさと)

国立遺伝学研究所新分野創造センター准教授. 理学博士.

■**略歴** 1996年千葉大学理学部卒業. 2001年千葉大学自然科学研究科博士課程修了. 01~06年 Cancer Research UK ポスドク. 03~06年日本学術振興会海外特別研究員. 06~10年大阪大学理学研究科生物科学専攻助教. 10年より現職.

■**研究テーマと抱負** DNA複製と組換え修復の関連性を中心に染色体安定性維持に関与するメカニズムの解明を目指しています. 同時に新たな遺伝学的技術を開発し研究テーマに応用することにも奮闘中.

■**ホームページ** http://www.nig.ac.jp/labs/MolFunc/Molecular_Function_HP/Home.html

■**趣味** 自転車.