

原理が、哺乳類で最も洗練されている生体システムである免疫系と神経系に共通に使われていることは大変興味深い。

謝辞

本稿に貴重なご意見をいただいた鈴木和男先生（国立感染症研究所）、久野みゆき先生（大阪市立大学）に深く感謝致します。また本内容で紹介した著者らの研究に参加した高木正浩氏（生理学研究所技術課）をはじめ、ラボのメンバーに感謝します。

文献

- 1) Suzuki, K., Yamada, M., Akashi, K., & Fujikura, T. (1986) *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**, 167-173.
- 2) 住本英樹 (2005) 蛋白質 核酸 酵素, **50**, 302-309.
- 3) 住本英樹 (印刷中) 活性酸素産生の活性化の分子機構, 「生体防御医学事典」.
- 4) Henderson, L.M., Chappell, J.B., & Jones, O.T.G. (1987) *Biochem. J.*, **246**, 325.
- 5) Okamura, Y. (in press) *Pflugers Archiv*.
- 6) Banfi, B., Schrenzel, J., Nusse, O., Lew, D.P., Ligeti, E., Krause, K-H., Demareux, N., et al. (1999) *J. Exp. Med.*, **190**, 183-194.
- 7) Decousey, T., Morgan, D., & Cherny, V.V. (2003) *Nature*, **422**, 531-534.
- 8) Touret, N. & Grinstein, S. (2002) *J. General. Physiol.*, **120**, 767-771.
- 9) Murata, Y., Iwasaki, H., Sasaki, M., Inaba, K., & Okamura, Y. (2005) *Nature*, **435**, 1239-1243.
- 10) Sasaki, M., Takagi, M., Okamura, Y. (2006) *Science*, **312**, 589-592.
- 11) Savina, A., et al. (2006). *Cell*, **126**, 205-218.

岡村 康司^{1,2,3)}, 佐々木 真理^{1,2)}

¹⁾自然科学研究機構 岡崎統合バイオサイエンス

センター神経分化研究部門, ²⁾生理学研究所,

³⁾総合研究大学院大学生命科学科生理科学専攻)

Phagocytosis and membrane potential

Yasushi Okamura and Mari Sasaki (Okazaki Institute for Integrative Bioscience, National Institute for Physiological Science, National Institutes of Natural Sciences, Higashiyama 5-1, Myodaiji-cho, Okazaki, Aichi 444-8787, Japan)

転写因子が DNA 複製開始点の位置を決める

1. はじめに

DNA 複製の研究分野は歴史が古く、ワトソンとクリックの DNA の二重らせん構造の発見に始まる。約半世紀にわたり、DNA がどのように複製するのか、そのメカニズムは突き詰められてきた。当初は原核生物である大腸菌の小さな染色体をモデルとして解析が進められてきた。この大腸菌の研究により、次のような DNA 複製に必要な基本因子が同定された。

1. DNA 複製の開始反応を規定する染色体上のシエメント：レプリケーター（多くの場合レプリケーターは複製が始まる複製開始点と一致する。）
2. DNA 複製の開始を制御するトランス活性化因子：イニシエーター
3. DNA 複製を実際に行う DNA 複製装置

次に研究者が目指したものはヒトなどの哺乳類をはじめとする高等真核生物の染色体 DNA 複製である。大腸菌で得られた複製の基本概念は高等真核細胞に適用できるものであった。しかし当然のことながら真核細胞は大腸菌に比べ、より複雑な複製システムをもち、その解明には多くの時間を要し、未だに不明な点も多い。本小文では真核細胞における染色体複製開始制御の理解の現状を簡単に紹介したい。

2. DNA 腫瘍ウイルスゲノムの複製¹⁾

SV40, ポリオーマウイルスなどは、5kb 前後の小さな二本鎖環状 DNA を染色体として有している。この DNA 腫瘍ウイルスを DNA 複製の研究対象にする利点は、ゲノムがコードする大型 T 抗原 (LT) 以外は宿主細胞由来の DNA 複製装置を利用することであった。また複製開始点についても、DNA 腫瘍ウイルスゲノムの場合、非常にコンパクトであり扱いやすい。

試験管内複製系の開発により、ウイルスの複製に必要な宿主側のコンポーネントが次々に同定され、複製フォークの詳細なモデルが提唱された。また、複製開始の機構についても詳細な解析がなされた。しかし、ウイルスの複製開始点、イニシエーターともにウイルス独自のもので細胞の

複製開始にそのまま当てはめることはできなかった。

3. 哺乳類染色体 DNA 複製を行うイニシエーターの発見

高等真核細胞の複製開始点の同定は、ゲノムサイズが大きいことや、単細胞生物に比べその配列特性が低いことから難航してきた。一方、イニシエータータンパク質の解析はここ10年のうちに大きな進歩を見せた。出芽酵母はコンパクトな複製開始点 (ARS: autonomously replicating sequence) を有している。コールド・スプリングハーバー研究所の Bruce Stillman 博士らのグループは全ての ARS に共通で複製に必須のエレメント (A エレメント) に結合する因子として ORC (origin recognition complex) を同定した²⁾。実際、ORC を破壊した出芽酵母は染色体複製ができず生育できない。ORC と相同な複合体は分裂酵母、マウス、ヒト、ショウジョウバエ、アフリカツメガエルなどから次々に単離されており、種を越えて保存されている。さらに多くの生物で ORC が複製開始に機能することが示されつつある³⁾。

しかし ORC は DNA 腫瘍ウイルスの LT のように、ORC 自体では DNA 複製を開始する反応を行わない。複製開始点に座り、複製に必要なタンパク質を複製開始点に呼び込む橋頭堡の役割を果たしていると考えられている^{1,3,4)}。

出芽酵母の ORC は結合配列に対する特異性が極めて高いが、他の ORC はその特異性は低いようである。分裂酵母の ORC は多数の AT-リッチ配列に結合する³⁾。アフリカツメガエルやショウジョウバエの発生初期の分裂時には染色体複製の複製開始点の配列特異性はない。ショウジョウバエのコリオン遺伝子増幅に必要な ACE3 や ori-β には出芽酵母の A エレメントのようなものはない。実際、ジョンズホプキンス大学 (現スローン・ケタリングがんセンター) の Thomas Kelly 博士らはヒトから単離し、昆虫細胞内で発現させた ORC がアフリカツメガエル卵母無細胞抽出液のなかで ATP 依存的に DNA に結合するが、AT-リッチな結合配列を好む以外の特異性はなくベクタープラスミドにさえも結合することを示した⁵⁾。このような高等真核細胞の ORC の低い配列特異性が、この項目の最初に述べた、高等真核細胞の複製開始点の低い配列特異性を規定しているのであろう。しかし、実際に高等真核細胞の初期発生においてはランダムに複製開始が起こるが、分裂が進み細胞分化が始まると、特定の場所から複製が始まることが示されている。では何が複製開始点の特異性を決めているのだろうか? (図 1A)

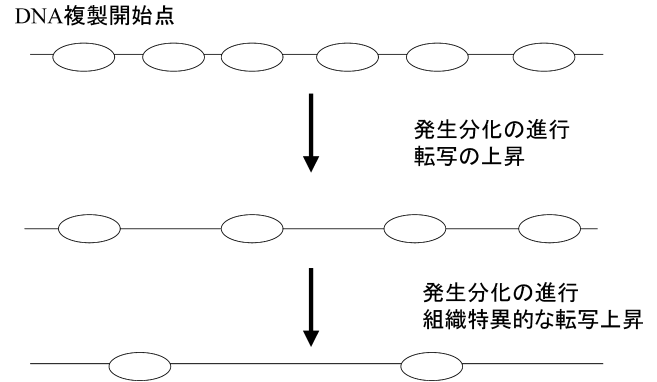


図 1A 発生初期にはどこからでも DNA 複製は開始されるように思われるが発生分化とともに特定の場所に収束する。

4. 複製開始点を決める因子は存在するのか?

真核細胞において転写因子は細胞内外のシグナル伝達の核内の標的であり、そのシグナルに応じて遺伝子発現を正負に制御し、増殖や分化を決定している。転写因子はクロマチン結合タンパク質の一つであり、転写のみならず DNA 複製や部位特異的組換えの制御、ヘテロクロマチンやキネトコアの形成維持にも関与している。このことは、転写因子がクロマチン上で各種の機能的複合体生成を制御していることを示していて、細胞特に染色体上のさまざまな制御機構の統合を行っていると思われる³⁾。

また、転写因子は多くの場合、原がん遺伝子産物である。ある種のがんウイルスの染色体 DNA は、これら原がん遺伝子によってその複製が調節されることが示されている^{1,3)}。この現象は発がんのメカニズムを考えるうえでも、非常に魅力的である。

我々を含む内外の研究グループが「転写因子による DNA 複製調節機構」について、さまざまなウイルスを用いてこれまで解析してきた。そこで、その分子機構の解明を中心に、モデル系としてその染色体複製に転写因子を必要とするポリオーマウイルスと、複製開始点の構造がよく分かっている出芽酵母の ARS1 を用いた我々の解析結果について以下に紹介する。また最近のショウジョウバエや培養細胞系から明らかになりつつある転写因子が複製開始点を決める因子ではないかと我々が考えるいくつかの証拠についても論ずる。

1) ポリオーマウイルスを用いた研究

我々のグループはポリオーマウイルスをモデル系として、AP1 (c-Jun, c-Fos), c-Rel, p53, Runx1/CBFaB/AML1/

PEBP2 α B 等の転写因子がポリオーマウイルス DNA の複製を強く促進することを報告してきた。さらに転写因子による複製活性化の機構について明らかにしてきた¹⁾。特に AP1 (c-Jun, c-Fos) については試験管内複製系の解析により c-Jun がポリオーマウイルス LT による LT/ori 複製開始複合体の形成を促進し、最終的に DNA 複製を促進するという一連の分子機構の存在を示した⁶⁾。つまり、転写因子は転写の際、転写開始複合体生成を促進するのと同様に複製開始複合体の形成を促進することが明らかとなった。

一方、Runx1 (CBFaB/AML1/PEBP2 α B) はもともとマウスに感染しがんを引き起こすポリオーマウイルスの enhancer に結合する因子として同定された転写因子である⁷⁾。真核生物において染色体複製は「複製ファクトリー」と呼ばれる、核構造上(核マトリックス)に形成される核内構造体で起こると考えられる。興味ぶかいことに、Runx1 は核マトリックス上に存在している。そして、我々は Runx1 の核マトリックスへの局在が DNA 複製活性化に必要であることを示した⁸⁾。さらに、最近の解析の結果、LT も新たに合成されたウイルスゲノム DNA も核マトリックスに局在することからウイルスの複製が核マトリックス上の複製ファクトリーで起こること、さらに Runx1 はウイルス由来のイニシエーター/ヘリカーゼである大型 T 抗原の origin への結合を *in vivo* で促進することを示した。これらのことから、Runx1 は核マトリックス上で形成される複製ファクトリーに複製開始点をリクルートすることによって、DNA 複製活性化を行うと考えられた⁹⁾。もともと複製ファクトリーは宿主の複製の場であり、ポリオーマウイルスはそれを「乗っ取って」いるわけである。そう考えると、ここでみられた Runx1 による複製起点の複製ファクトリーへのリクルートは細胞の染色体複製においても機能しているのではないだろうか。また核マトリックス結合活性をもつ転写因子は他にもみつかりつつあり、Runx1 以外の転写因子も染色体複製調節に関わる可能性があるだろう。従ってウイルスの場合だけではなく染色体上でも、Runx1 は核マトリックス上で形成される複製ファクトリーに複製開始点をリクルートするのではないだろうか (図 1B)。

また、Runx1 はヒトの急性骨髄性白血病の M2 期に多く見られる染色体転座のブレイクポイントにコードされていた AML1 のマウスホモログである。この転座により生じる AML1-ETO (MTG8) はミエロイド前駆体細胞である 32 Dcl3 細胞の顆粒球への分化を阻害した。このことはこのキメラ因子の白血病原性の一側面を反映していると思われ

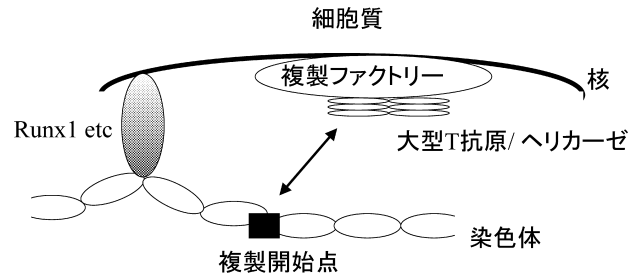


図 1B 転写因子が複製開始点を核マトリックス上に形成される複製ファクトリーにリクルートする。

た¹⁰⁾。このキメラ因子の白血病原性と Runx1 のもつポリオーマウイルス DNA 複製促進活性の関連は不明であるが、c-Jun, c-Fos などの原がん遺伝子産物も PyDNA 複製を促進することを考えると、DNA 複製制御の乱れと細胞がん化の間には密接な関係があるのかもしれない。

2) 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いた研究

出芽酵母の ARS1 は A, B1, B2, B3 の各エレメントからなり、A エレメントは ORC の結合部位、B2 は DUE (DNA unwinding element), B3 は転写因子 ABF1 の結合部位である。これまで我々はこの B3 エレメントに着目して解析を進めている。我々も含めたいくつかの解析の結果、B3 に結合する転写因子が出芽酵母の DNA 複製開始を正にも負にも調節しうることがわかっている^{4,11,12)}。現在、我々はさらに解析を進め、この転写因子による複製の調節は ORC を含む複製開始複合体の形成を促進することによって考えている。その詳細な分子機構はまだ不明であるが、ウイルスだけでなく細胞の複製開始点においても転写因子が複製開始複合体形成に関わると考えられる。

3) ショウジョウバエを用いた研究

近年、ショウジョウバエの DNA 複製のメカニズムが明らかになりつつある³⁾。主に卵壁 (eggshell) の形成に必須なコリオン遺伝子の増幅系が解析されている。この系では他の生物同様ショウジョウバエの ORC (DmORC) が必須であるだけでなく、転写因子 E2F (dE2F)¹³⁾ やそのヘテロ二量体形成のパートナー DP (dDP)¹³⁾、がん抑制遺伝子 Rb ホモログ (Rbf)¹³⁾、原がん遺伝子で転写因子の myb を含む複合体 (myb 複合体)¹⁴⁾ が必須であることが示されている。これら因子はコリオン遺伝子増幅系の複製開始点において DmORC と共局在することが示されていることから、E2F をはじめとする転写因子などのクロマチン結合性タンパク質が DmORC を複製開始点にリクルートするのではない

かと考えられ始めている。転写因子のDNAへの結合はその周辺に様々な構造変化を引き起こすと考えられている¹⁵⁾。実際DmORCにはDNAに対する特異性はほとんどないが、DNAのトポロジーがDmORCの複製開始点への親和性を上昇させることが示された¹⁶⁾。転写因子のある種のものDNAのbendingなど構造変化を引き起こす。そのようなDNA構造変化がORCのリクルートに寄与することもあるかもしれない¹⁷⁾。

4) 哺乳類細胞を用いた研究

哺乳類細胞において複製開始点を同定する試みが数多くなされてきたが、ゲノムの複雑さなどが壁となりなかなか確定できなかった。しかし、最近のPCRをはじめとする技術の進歩により、かなり精度良く複製開始点が同定されつつある。いまのところ出芽酵母のような保存された配列はみつかっていないが、約20近くの複製開始点が同定されており¹⁸⁾、特に周辺領域の転写活性との関連が指摘されている。今までに述べたウイルスや出芽酵母の結果から類推すると、哺乳類細胞においても数多くある潜在的複製開始点のうち、どこから実際に複製を開始するかを決めているのは転写因子かもしれない。実際、ORC1, ORC2, CDC6を強制的にプラスミドDNA上に結合させると、そこからDNA複製が開始することが示されている¹⁹⁾。この点は示唆に富んでいて、我々が主張している「ORCのリクルートが複製開始点を決める。」という仮説を実証してくれたように思える³⁾ (図1C)。

一方、哺乳類においても複製のタイミングにRbが関与していることが明らかになってきている²⁰⁾。DNA合成期(S期)にDNA損傷が生じると、DNA合成を遅延させて損傷部位の修復を待ついわゆるintra S phaseチェックポイント制御が起こる。この複製遅延は本来S期後期に複製を開始する複製起点からの複製が抑制されることで生じることが酵母で示されている。哺乳類細胞でも同様の制御機構はたつき、その過程にRbタンパク質が関与することが示された。Rbは哺乳類細胞でも転写因子E2Fと結合し染色体上に局在するので、ここでも転写因子を介した複製開始制御が行われている可能性があるだろう。

5. おわりに

以上のように、転写因子のようなクロマチン結合性タンパク質が複製開始に必須な因子の複製開始点への結合を調節しているのではないかという証拠が種を超えて蓄積しつつある。転写因子の結合によってその周辺のクロマチン構

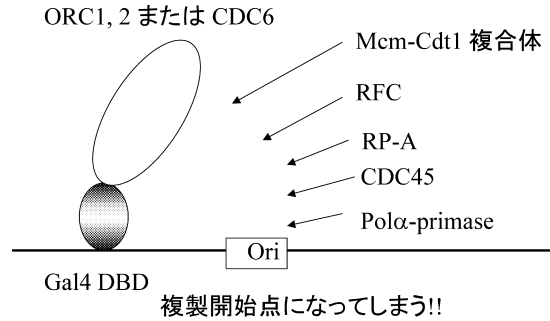


図1C ATリッチなどの条件が整いORCが結合すればどこからでも複製は開始する。

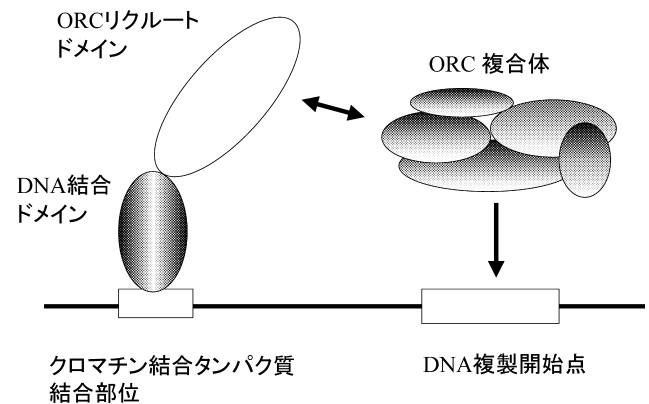


図1D 転写因子などのクロマチン結合タンパク質がORC複合体を複製開始点にリクルートする。

造がより「開いた」構造になるという知見¹⁵⁾と考えあわせると、ゲノムの維持に転写因子のこのような複製開始制御が深く関わる可能性も強く、今後、この分野の研究の進展から興味深い事実が浮かび上がることが期待されよう (図1D)。

- 1) Murakami, Y. & Ito, Y. (1999) *Front. Biosci.*, 4, d824-833.
- 2) Bell, S.P., Kobayashi, R., & Stillman, B. (1993) *Science*, 262, 1844-1849.
- 3) Kohzaki, H. & Murakami, Y. (2005) *Bioessays*, 27, 1107-1116.
- 4) Kohzaki, H. & Murakami, Y. (2007) *Proteomics*, 7, 10-14.
- 5) Vashee, S., Cvetic, C., Lu, W., Simancek, P., Kelly, T.J., & Walter, J.C. (2003) *Genes Dev.*, 17, 1894-1908.
- 6) Ito, K., Asano, M., Huges, P., Kohzaki, H., Masutani, C., Hanaoka, F., Kerppola, T., Curran, T., Murakami, Y., & Ito, Y. (1996) *EMBO J.*, 15, 5636-5646.
- 7) Ito, Y. (1999) *Genes Cells*, 4, 685-767.
- 8) Chen, L.F., Ito, K., Murakami, Y., & Ito, Y. (1998) *Mol. Cell. Biol.*, 18, 4165-4176.
- 9) Murakami, Y., Chen, L.F., Sanechika, N., Kohzaki, H., & Ito, Y. (2007) *J. Cell. Biochem.*, 100, 1313-1323.
- 10) Kohzaki, H., Ito, K., Huang, G., Wee, H.G., Murakami, Y., &

- Ito, Y. (1999) *Oncogene*, 18, 4055-4062.
- 11) Marahrens, Y. & Stillman, B. (1992) *Science*, 255, 817-823.
 - 12) Kohzaki, H., Ito, Y., & Murakami, Y. (1999) *Mol. Cell. Biol.*, 19, 7428-7435.
 - 13) Claycomb, J.M. & Orr-Weaver, T.L. (2005) *Trends Genet.*, 21, 149-162.
 - 14) Beall, E.L., Manak, J.R., Zhou, S., Bell, M., Lipsick, J.S., & Botchan, M.R. (2002) *Nature*, 420, 833-837.
 - 15) Workman, J.L. (2006) *Genes Dev.*, 20, 2009-2017.
 - 16) Remus, D., Beall, E.L., & Botchan, M.R. (2004) *EMBO J.*, 23, 897-907.
 - 17) Alvarez, M., Rhodes, S.J., & Bidwell, J.P. (2003) *Gene*, 313, 43-57.
 - 18) Cvetcic, C. & Walter, J.C. (2005) *Semin. Cell Dev. Biol.*, 16, 343-353.
 - 19) Takeda, D.Y., Shibata, Y., Parvin, J.D., & Dutta, A. (2005) *Genes Dev.*, 19, 2827-2836.
 - 20) Narita, M., Nunez, S., Heard, E., Narita, M., Lin, A.W., Haern, S.A., Spector, D.L., Hannon, G.J. & Lowe, S.W. (2003) *Cell*, 113, 703-716.

神崎 秀嗣^{1,2)}, 村上 洋太^{1,2)}

(京都大学ウイルス研究所がんウイルス研究部門

¹⁾細胞制御, ²⁾細胞生物学部門(分子伝達分野))

Regulation of chromosomal DNA replication by transcription factors

Hidetsugu Kohzaki^{1,2)} and Yota Murakami^{1,2)} (¹⁾Department of Viral Oncology, ²⁾Department of Cell Biology, Institute for Virus Research, Kyoto University, Shogoin-kawaharamachi, Sakyo-ku, Kyoto 606-8507, Japan)

投稿受付: 2006年10月16日

進化分子工学による機能性ペプチドの創出と低分子化へのアプローチ

はじめに

生細胞のDNA上にある生体機能分子(タンパク質やペプチド)の設計図は、どのようにして書かれたのだろうか? その設計図はダーウィン進化の過程でDNA上に間接的に書き込まれたと考えられている。すなわち、生細胞は、長い年月をかけて突然変異を蓄積して分子多様性を発生させ、選別を繰り返し、酵素のような高度な機能を持つタンパク質を獲得する。最近、このような自然界における進化の過程「多様性の発生と選別」を人為的にコントロールして、機能性タンパク質の創出を目指す進化分子工学(自然進化と区別するためにコンビナトリアルバイオエン

ジニアリングとも呼ばれる)が注目されている。多様な化合物を一挙に合成する「コンビナトリアルケミストリー」が知られているが、進化分子工学では、化学合成だけでなく、生物学的手法を組み合わせ、人工的な生体触媒や生理活性分子を創出することを狙っている。すなわち、ファージ表層提示法により、多様な分子ライブラリー(ペプチドやタンパク質ライブラリー)を効率的にスクリーニングし、目的とした機能を持つ生体分子を獲得する手法である。ここでは、立体構造を保持したペプチド(α -ヘリックス構造など)の分子ライブラリーを利用する分子標的化合物の設計法について紹介する。

1. 分子標的化合物の新手法

この数年来、分子標的化合物のリード化合物探索のために、標的タンパク質の立体構造をもとにした医薬品設計(SBDD)やコンビナトリアルケミストリー(コンビケム)に膨大な研究資金が投入されている。わたしたちは、これまで抗体工学で培ったファージ表層ディスプレイ技術^{1,2)}とペプチド構造構築理論を組み合わせることにより、時間のかかる標的タンパク質の立体構造解析(SBDD)や高価な低分子ライブラリー(コンビケム)を必要としない新しいリード化合物検索法を提案している(図1)。すなわち、図2に示すように、強固な立体構造(α -ヘリックスなど)を持つペプチドの分子ライブラリーを構築し、これをファージ表層に提示することにより、標的タンパク質に作用するペプチドを効率よくスクリーニングする(①)。このライブラリーから得られるペプチドは、強固な立体構造を持っているのでファーマコフォアとその空間配置を容易に決定することができる(②)。この立体構造情報をもとに低分子リード化合物を設計する(③)。

2. 立体構造規制ペプチドライブラリーの分子設計

近年、ペプチドライブラリーを用いるリード化合物探索法が、医薬品開発に利用されるようになってきた。しかし、従来のペプチドライブラリーでは、個々のペプチドがフレキシブルな構造を持つため、エントロピーの損失が大きく、高い結合活性や生物活性を期待するのが難しい。また、フレキシブルなペプチドからはファーマコフォアの三次元情報が得られず、低分子化合物の分子設計に繋がらない。そこで、このような問題点を解決するために、立体構造を持つペプチドライブラリーを作製するための方法論を開発した。これにより、高い生理活性ペプチドを見いだすと同時に、低分子化するための三次元構造情報を得ること