

研究報告書
令和4年度：A課題

2024年4月23日

公益財団法人 がん研究振興財団

理事長 堀田知光 殿

研究施設 理化学研究所生命機能科学研究センター

住所 神戸市中央区港島南町2丁目2-3

研究者氏名 林 陽子

(研究課題)

DNA複製の再複製阻止を担うメカニズムの解明

令和5年3月1日付助成金交付のあった標記A課題について研究が終了致しましたのでご報告いたします。

[目的]

真核細胞のDNA複製は細胞周期において一度だけ起きるように厳密に調節されている。ただし分化の最終過程においては、分裂期を経ずにDNAが再び複製され（再複製）染色体数が倍加する現象がある。染色体数の倍加は、植物はもちろんヒトの場合でも健康な肝臓や心臓などの一部の組織において見出される一方で、染色体数の増加は悪性腫瘍の共通の特徴でもある。したがって、ヒト細胞において染色体の倍加に繋がる再複製へ進行メカニズムを理解することは極めて重要である。これまでのヒト細胞の再複製についての研究は、主に癌細胞を用いて進められており、正常細胞では再複製という現象はほとんど検出されていなかった。

複製開始複合体はDNA複製の開始に必須なタンパク質複合体であり、ORC、Cdc6、Cdt1、MCMの4種類のタンパク質から構成される。ORCタンパク質は複製開始点に結合するタンパク質として見出され、Orc1からOrc6の6つのサブユニットから成り立つ。これまでにOrc2-5は細胞周期を通じてクロマチンに結合することが分かっていたが、Orc6については発現量が一部の癌細胞などでは高いことが報告されていたものの、その役割は未知の部分が多かった。本研究では、複製開始複合体Orc6の細胞周期における挙動が、DNA再複製を抑制する働きを持つことを示した。

[方法と結果]

本研究ではほとんどの実験において、正常2倍体の染色体数を持つ細胞株(hTERT-RPE1細胞)を用いた。また、細胞周期の挙動を解析するために、申請者が開発した免疫染色を基にした画像解析法(Single cell plot解析)によって駆使して研究を進めた。

まずOrc6の細胞周期における変化を調べた。Orc6タンパク質の総量は細胞周期を通じてほとんど変わらなかったものの、Orc6がクロマチンに結合する量は細胞周期を通じて大きく変動した。すなわち、Orc6のクロマチン結合量は、G1期から複製期直前に上昇するが、複製期に進行すると素早く減少しそのままG2期および分裂期を迎えることが分かった。一方でHeLa細胞やU2OS細胞などの癌細胞由来の細胞株ではOrc6のクロマチン結合量が複製期に進行してもあまり低下しないことを確認した。さらに、このようなOrc6のクロマチン結合量はプロテアソーム活性に依存していることが分かった。

老化細胞ではプロテアソーム活性が低下するという報告がある(Tonoki et al., Mol Cell Biol 2009; Chondrogianni et al., JBC 2003)。そこで、継代を重ねた繊維芽細胞(老化した正常細胞)を調べたところ、複製期が終了してG2期にあるにも関わらず、Orc6はクロマチンに結合し、さらに複製開始複合体のMcmもクロマチンに結合した状態で細胞周期が停止した細胞が検出された。そこで増殖過程にある正常細胞をプロテアソーム活性阻害剤で長時間(〜1日程度)処理したところ、複製後にOrc6やMcmのクロマチン結合量が高い細胞が出現した。プロテアソーム活性阻害剤を細胞上清から洗い流して通常の培養条件で培養を始めると、これらの細胞の細胞周期は再び進行し始め、分裂期を経ないで複製期に進行することが分かった。

さらにsiRNAによってOrc6タンパク質量を低下させた細胞においては、Orc6のクロマチン結合量が低下することにより、Mcmがクロマチンに結合する量が有意に減少することが分かった。つまり正常細胞においては、複製期終了後にOrc6がクロマチンから離れることで再複製を阻止に働くと考えられた。

[考察]

本研究によって、複製期が終了後にOrc6がクロマチンに結合してしまうとMcmのクロマチンへのリクルートを促し、この結果、分裂期を回避して再複製へと導くことが示唆された。複製開始複合体Cdt1のタンパク質量が増加すると再複製が起きることが報告されているが、この現象は一部の癌細胞では容易に起こるが、正常細胞では希である。実際に複数の癌細胞において、Orc6の発現量が高いことが報告されており、再複製を誘導されやすい状態であったと考えられる。今後は、老化誘導因子として報告されているDNA損傷を誘発する刺激や紫外線刺激などでも調べ、ヒト細胞における再複製がどのようにして生じるのかそのメカニズムを明らかにする。

[発表論文]

Orc6 dissociation from chromatin prevents premature loading of MCM at G2 and tetraploid production
Y Hayashi-Takanaka, I Hiratani, T Haraguchi, Y Hiraoka
bioRxiv, 2024.01. 30.577900

[謝辞]

本研究課題にご支援くださいました公益財団法人がん研究振興財団に熱く御礼を申し上げます。また、本研究にご協力いただいた研究者の方々にこの場をお借りして感謝申し上げます。