

氏名(本籍)	新 ^{にい} 美 ^み 敦 ^{あつ} 子 ^こ
学位の種類	博士 (農学)
学位記番号	農博第 660 号
学位授与年月日	平成 13 年 3 月 26 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)
学位論文題目	ニワトリ DNA トポイソメラーゼ II α , β の発現および核内分布の比較：アイソフォーム α の DNA 複製部位への局在機構の解析
論文審査委員	(主査) 教授 西 森 克 彦 教授 神 尾 好 是 教授 五 味 勝 也

論文内容要旨

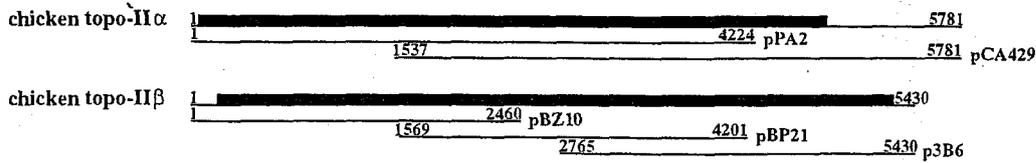
第1章 序論

真核細胞内では細胞周期の制御下に遺伝子の転写、DNAの複製などの、生命維持に欠かすことのできない様々な反応が行なわれている。この時、DNA鎖間の高次構造の変換を行なう必要がある。このようなDNAのトポロジカルな状態間の変換をする酵素がDNAトポイソメラーゼである。真核生物のトポイソメラーゼには、反応様式の異なる型のものが何種類か存在しているが、その中でもII型であるDNAトポイソメラーゼII（トポII）は、反応にATPを必要とし、DNA2本鎖を一旦2本とも切断して他のDNA鎖を通した後、再結合することによりねじれを解消する。他のトポイソメラーゼとは違うその反応様式のため、トポIIは単にDNAのねじれの解消をするだけでなく、2つのDNA鎖間で生じた絡まり(catenation)や、DNA鎖間に生じた結び目(knot)を解消することもできる。トポIIは、細胞分裂期や減数分裂期の染色体の凝縮や分離、DNA複製などに必要であり、DNAの組換え反応にも働いているとの報告がある。また、核マトリックスの構成タンパク質であり、染色体の骨格タンパク質としても働いているという報告もある。

哺乳類のトポIIには、配列は非常に似ているが、遺伝子的には別である α と β という2種のアイソフォームの存在が知られている。アイソフォーム間では、発現している組織や薬剤に対する感受性が異なることなどが知られているが、機能の差異について明確な知見はまだ得られていない。近年、トポII α 、 β それぞれのノックアウトマウスが作成されたが、 α では卵割の4-8細胞期で死滅してしまい、 β では胎児の段階で死に、特に神経系統の細胞の分化が不十分であることが示された。しかし、分子生物学的に細胞内でそれぞれのアイソフォームがどのように認識され、どのような反応がおこっているのか等については、未だ解明されていない。

本研究では、ニワトリトポII α 、 β アイソフォーム間での細胞周期におけるタンパクレベル、RNAレベルでの発現について比較し、核内の局在についても比較した。また、その際、 α がS期でDNA複製部位を示すプロモデオキシウリジン(BrdU)取り込みのシグナルと重なったことに注目し、そのような挙動を示す原因となる配列について α/β のキメラ体を作成し、雌ニワトリ胚由来の繊維芽細胞(CEF)にトランスフェクションして解析を行ない、アミノ酸配列にして α の1280-1294の領域が重要であることを示した。また、1280-1294の領域でproliferating cell nuclear antigen(PCNA)と相互作用することを*in vitro*の結合実験で示した。以上の結果から、S期にDNA複製部位にトポII α が集積する機構が解明され、その生物学的意義について考察を行なった。

A



B

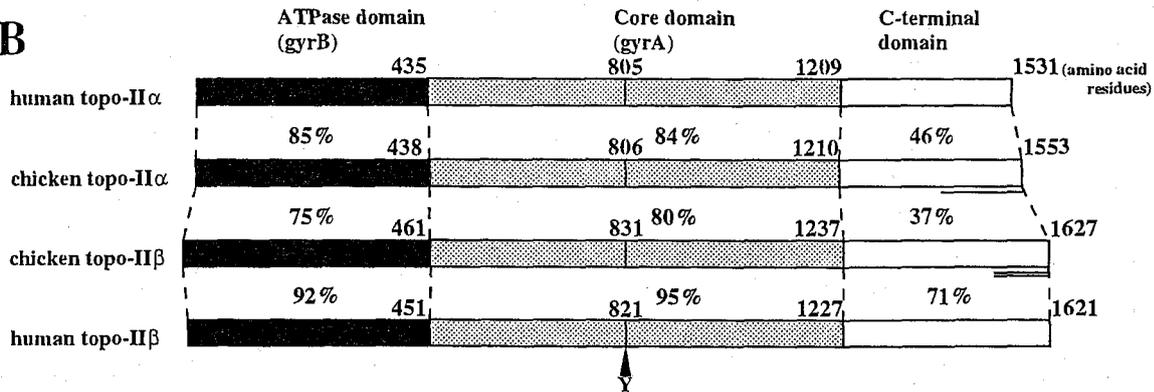


Fig. 1. cDNA clones for chicken homologues of topo-II α and β and comparison of their deduced sequences with those of human topo-II α and β . (A) cDNA clones to cover entire open reading frames (thick bars) of chicken topo-II α and β . Nucleotide numbers are indicated. (B) per cent identity of deduced sequences between different domains of topo-II α and β of human and chicken. The last residue number of each domain, the active site tyrosine residue (Y) and C-terminal polypeptide regions used for raising polyclonal antibodies; α -150 (underlined) and β -100 (double underlined), are indicated.

第2章 ニワトリDNAトポイソメラーゼII α 、 β の一次構造、発現および局在性の比較

α 、 β アイソフォームを特異的に認識する抗体、3H9及び3B6を用いてMSB-1細胞のcDNA発現ライブラリーをスクリーニングし、ニワトリトポII α 、 β の全塩基配列を決定した。塩基配列から推定されたアミノ酸配列を基にヒトトポIIとドメインごとに比較した (Fig. 1)。N末のATPaseドメイン、中央のコアドメイン (cleavage/religationドメイン) では、 α と β 間、ヒトとニワトリ間で高い相同性を示したが、C末ドメインでは全体に相同性は低く、特に α 、 β アイソフォーム間で低いことが示された。相同性の低いC末部位の一部を大腸菌で発現させ、これらを抗原にしてアイソフォームを特異的に認識する抗体を作成し、以降の実験に使用した。

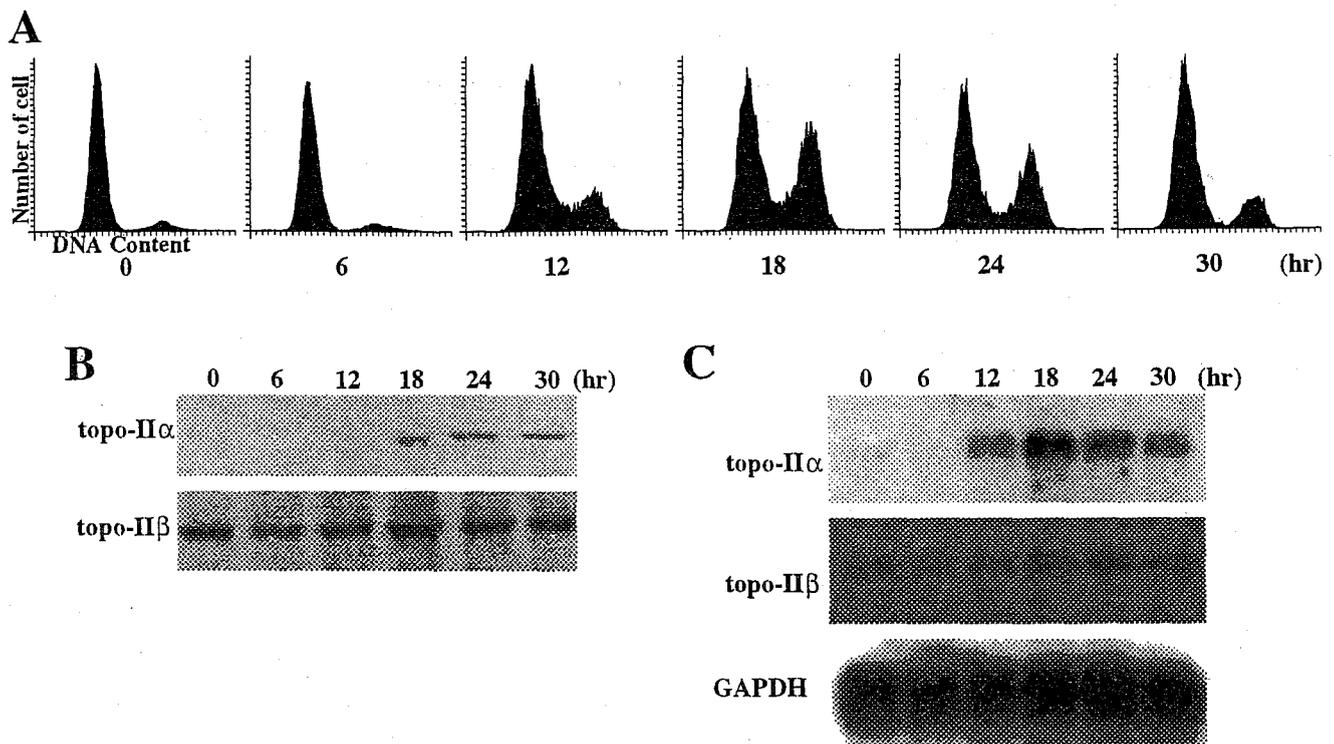


Fig. 2. Different behavior of chicken topo-II α and β during the cell cycle of female chicken embryonic fibroblasts (CEFs) at the level of protein or mRNA. (A) FACS analysis of relative numbers of cells containing different amounts of PI-stained DNA at different time points after release from the serum-starved G₀ phase. (B) Western blotting of total proteins from CEFs at the time points indicated in (A) with the specific antiserum against chicken topo-II α (anti- α -150) or β (anti- β -100). (C) Northern blotting of poly(A)⁺ RNAs prepared from CEFs at the time points indicated in (A) with ³²P-labeled cDNA probe for chicken topo-II α , β or GAPDH.

まず、アイソフォーム間での細胞周期におけるタンパクレベル、RNAレベルでの発現の違いを観察した。ニワトリ胚由来の繊維芽細胞(Chicken embryonic fibroblast : CEF)は無血清培地で培養することで細胞周期のG₀期に停止することが知られている。これを利用して同調培養を行なった。無血清培地から血清を含む通常培地にリリース後、6時間ごとの細胞を採取し、FACS分析により細胞周期を調べ、さらにそれぞれの細胞集団からタンパク質とポリ(A)+RNAを調製してウエスタンブロットとノーザンブロットを行なった(Fig. 2)。トポII α では、タンパク質レベル、RNAレベル共に細胞周期で大きな変化をみせ、G₁-S期初期では発現が見られないが、S期後期-G₂期、M期では強く発現していることが示された。一方トポII β では、 α のような変化は見られず、タンパク質、RNA共に細胞周期を通じてほぼ一定量の発現が検出された。また、細胞周期における核内の局在様式

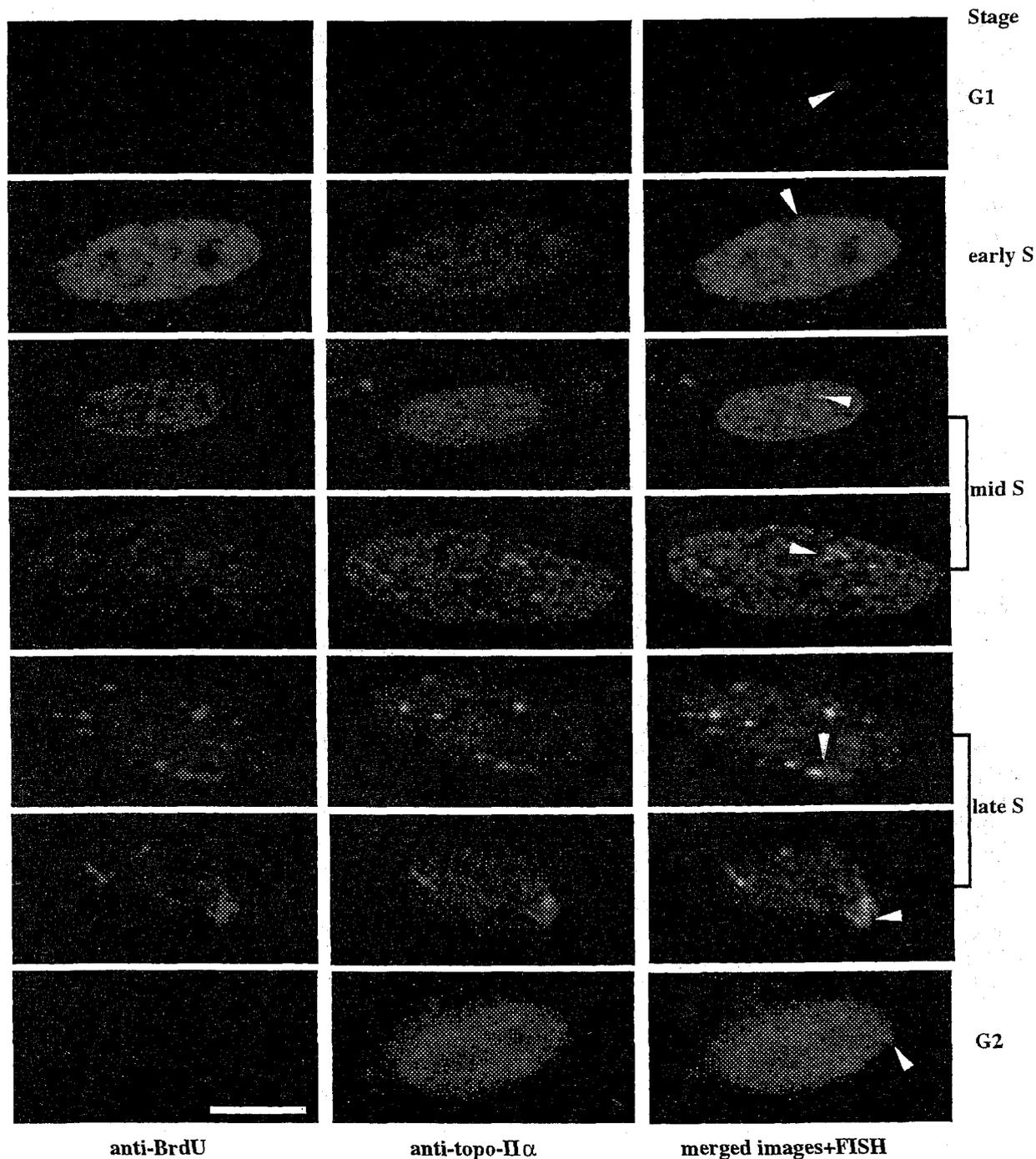


Fig. 3. Nuclear localization patterns of chicken topo-II α during the cell cycle of CEFs. CEFs were pulse-labeled with BrdU for 30 min to detect sites of DNA replication in nuclei during the cell cycle (shown by rhodamine fluorescence in red). Distribution of topo-II α was detected by the reaction with anti- α -150 antibody (shown by FITC immunofluorescence in green). The W-heterochromatin was visualized by FISH with the mixture of Cy-5-labeled *Xho*I-family and *Eco*RI-family probes (arrowhead, blue signal). Scale bar = 10 μ m.

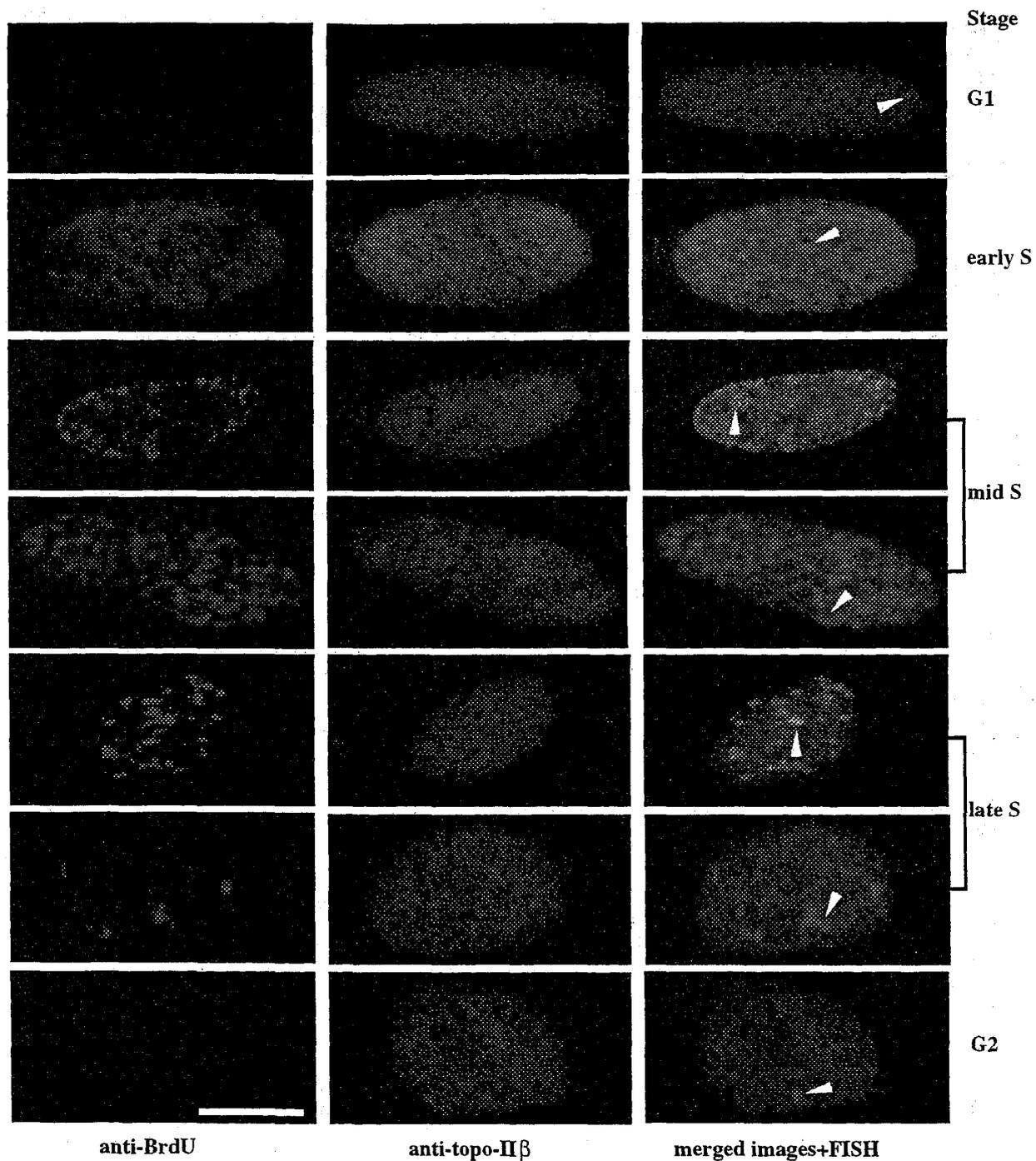


Fig. 4. Nuclear localization patterns of chicken topo-II β during the cell cycle of CEFs. CEFs were pulse-labeled with BrdU (red signal). Distribution of topo-II β was detected by the reaction with anti- β -100 antibody (green signal). The W-heterochromatin was visualized by FISH (arrowhead, blue signal). Methods of detection were as in Fig. 3. Scale bar = 10 μ m.

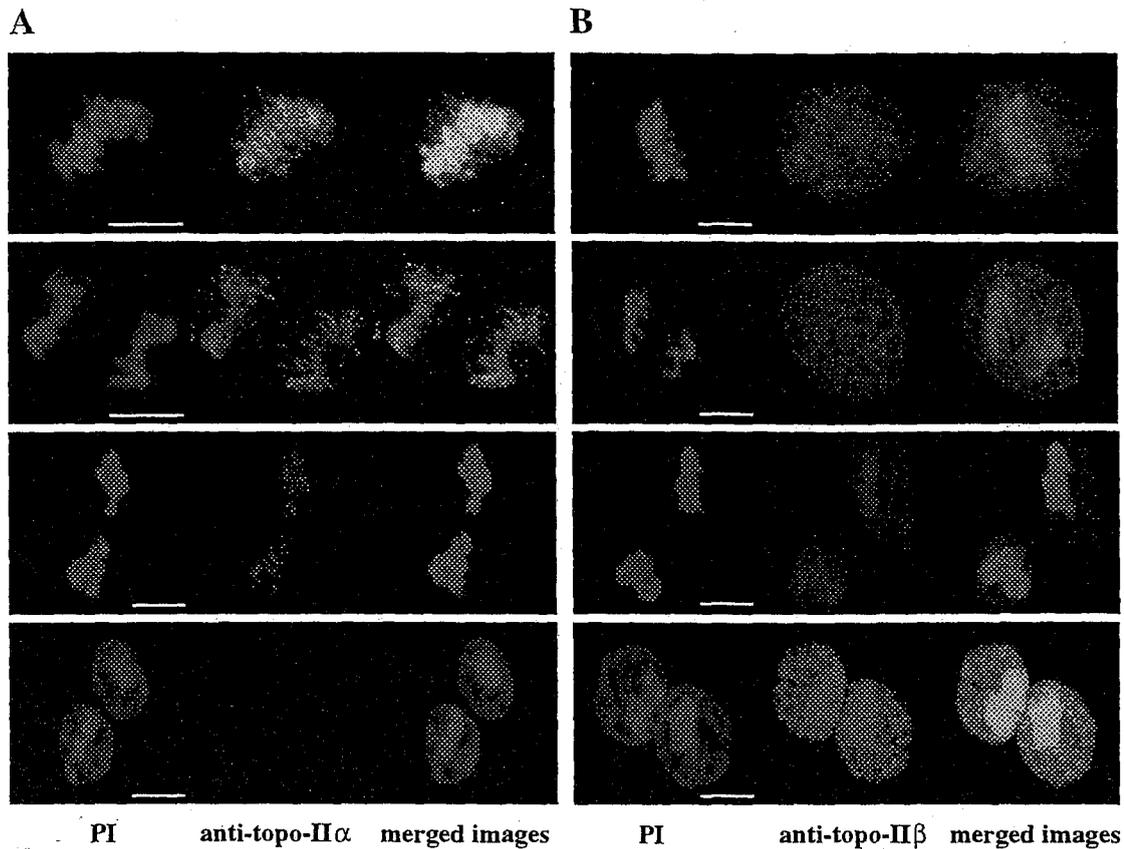


Fig. 5. Different behavior of topo-II α (A) and β (B) during the course of mitosis of CEFs. DNA and RNA stained with propidium iodide (PI, red), FITC immunofluorescence (green as in Fig. 3) of topo-II α or β , and their merged images are shown for typical examples of metaphase, anaphase, telophase and nuclei of daughter cells. Scale bar = 10 μ m.

の変化を間接蛍光抗体法を用いて観察した。その結果、トポII α では、G₁期で検出されず、G₂期で核内全体に存在が認められたが、S期では、斑点状のシグナルが多数観察され、そのうちの一つがWヘテロクロマチンの位置を示すFISHのシグナルと一致することが示された。また、斑点状のシグナルは、複製部位を示すプロモデオキシウリジン(BrdU)の取込みのシグナルと一致したことから、トポII α はS期では、複製部位へ局在していることが示唆された(Fig. 3)。一方トポII β では、 α のような局在の変化は見られず、常に核内にほぼ一様に存在することが示された(Fig. 4)。さらに細胞分裂期(M期)のサンプルに対しても同様に蛍光抗体法を行なったところ、染色体の骨格タンパク質であるとの報告もあるトポII α では染色体全域を染め、やがてG₁初期に移行すると共に検出されなくなったが、 β ではM期中は細胞内に分散して存在し、M期の終わりとともに再び核内に検出され

るようになることが示された(Fig. 5)。

第3章 欠失変異体を用いたニワトリDNAトポイソメラーゼII α のDNA複製部位局在に 関与する領域の解析

細胞周期のS期でトポII α はDNA複製部位に局在するが、 β ではそのような現象が見られないことの原因について解析を行なうこととした。推定アミノ酸配列の比較より、これらの違いが相同性が著しく低いC末領域に由来しているのではないかと考え、トポII α 、 β のC末領域をそれぞれPCRで増幅し、発現ベクターpcDNA3.1/Hyg+に組み込み、CEFにトランスフェクションして観察した。その結果、トポII α では核内に斑点状のシグナルが観察され、 β ではそのようなシグナルが見られなかったことから内在性トポIIの観察結果をある程度反映していると考えられたが、同時に行なったPIによる核のカウンターステインより、核の形態が異常なものが多く観察され、さらに詳しい解析を行なって行く上で、実験系が不適當であると考えた。そこで、コアドメインの一部とC末を含むCCIIコンストラクトを作成した(Fig. 6A)。トポII α のコアの一部とC末から成るCCIIAA、 β のコアの一部とC末から成るCCIIIBBの他に、CCIIAAのC末を β に代えたCCIIAB、CCIIIBBのC末を α に代えたCCIIIBAを作成し、それぞれCEFにトランスフェクションして観察した。その結果、 α のC末に依存して核内に斑点状のシグナルが観察され、そのシグナルはBrdUの取込みシグナルと一致した(Fig. 6B)。このことから、複製部位への α の集積は、そのC末領域に依っていることが示された。次に、 α C末領域中のどこが本質的に複製部位への集積に必要なのかをさらに調べるため、C末領域を4つに分割し(アミノ酸残基1158-1294、1295-1396、1397-1486、1487-1553)、Fig. 7Aのような様々な欠失変異体を作成して同様の実験を行なった。その結果、CCIIAA-1553、CCIIAA Δ (1295-1396)、CCIIAA Δ (1397-1486)で核内に斑点状のシグナルが観察され、CCIIAA-1486、CCIIAA Δ (1295-1486)で一部の細胞に斑点状のシグナルが観察された。その他のコンストラクトでは斑点状のシグナルは全く観察されなかった(Fig. 7B)。これらの結果より、2種の仮説を考えた。すなわち複製箇所への集積はC末中の1158-1294の領域がまず必要だが、さらにC末の後半の領域がなんらかの補助的な役割を果たす必要があるという仮説と、1158-1294の領域が必要で、その領域が働くためにその後ろにある程度の長さのペプチドがついている必要があるという仮説である。このことを検証するために、欠失変異体ではなく、 β のC末とのキメラ体を作成して実験を行なうこととした。

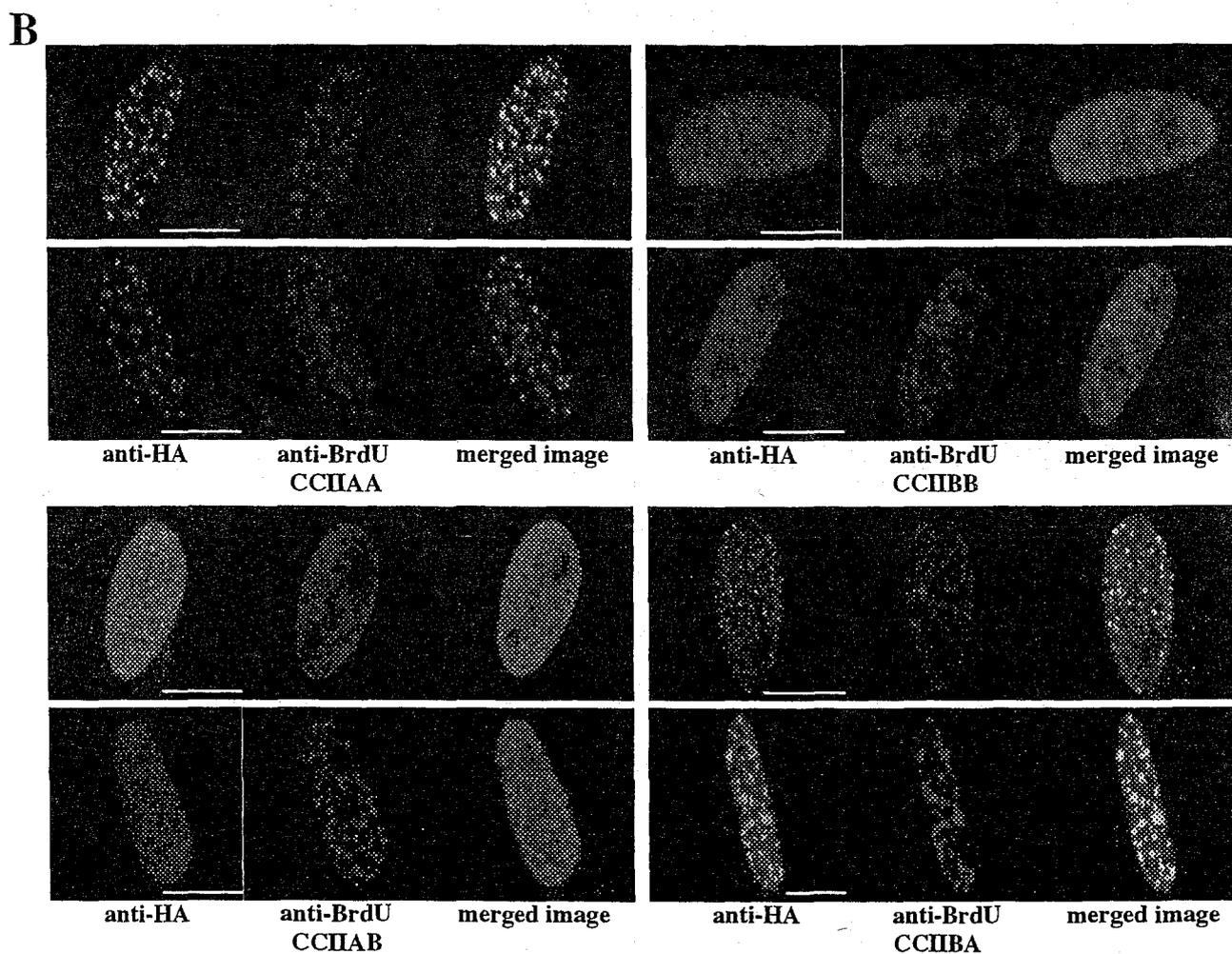
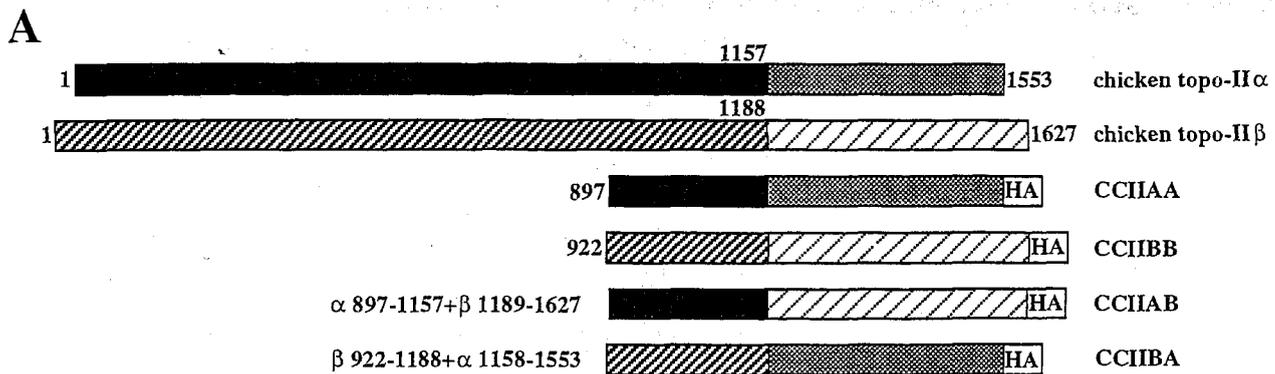
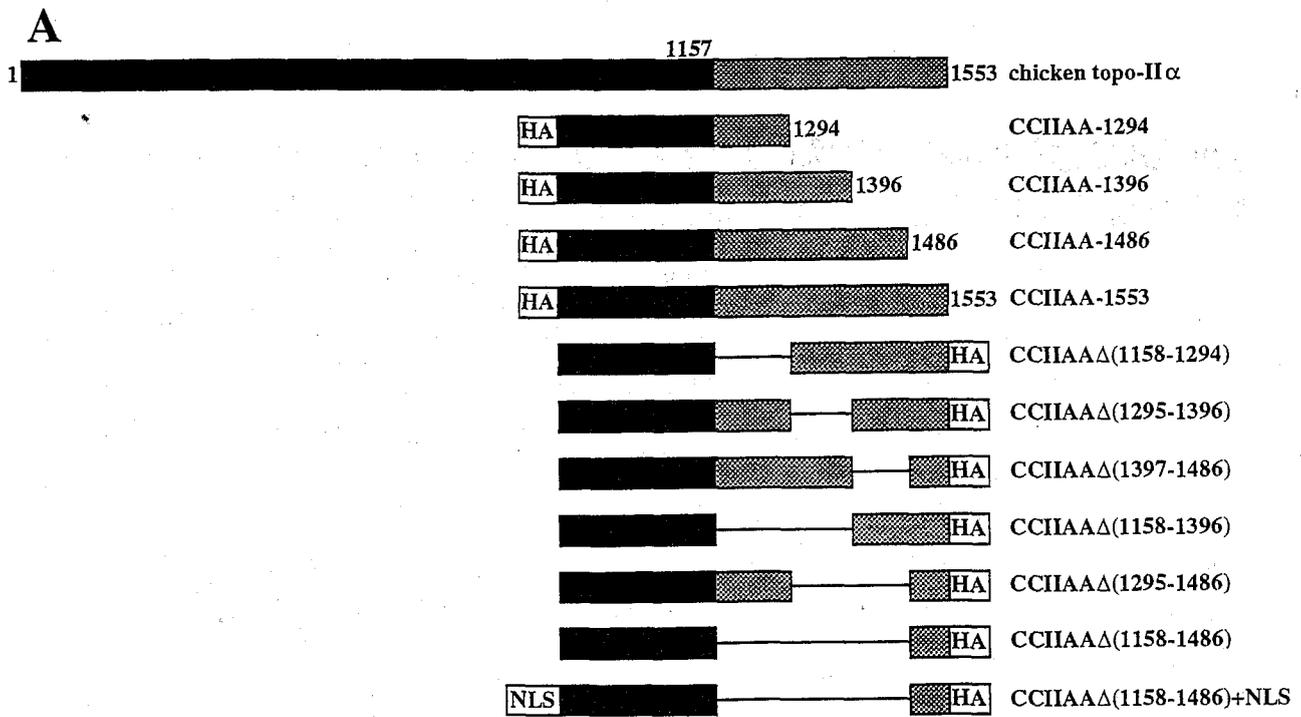


Fig. 6. Localization patterns of truncated and/or chimeric forms of topoisomerase II α and β , and sites of DNA replication as shown by the incorporation of BrdU in the nuclei of CEFs. (A) HA-tagged cDNA constructs of truncated forms of topoisomerase II α , β and their chimeric forms. Each construct was subcloned into pcDNA3.1/Hyg⁺ expression vector and transfected CEFs. (B) Expressed topoisomerase II constructs were detected with anti-HA antibody (green) and the incorporation of BrdU into DNA was detected with anti-BrdU antibody (red), and their images were merged. Scale bar = 10 μ m.



B

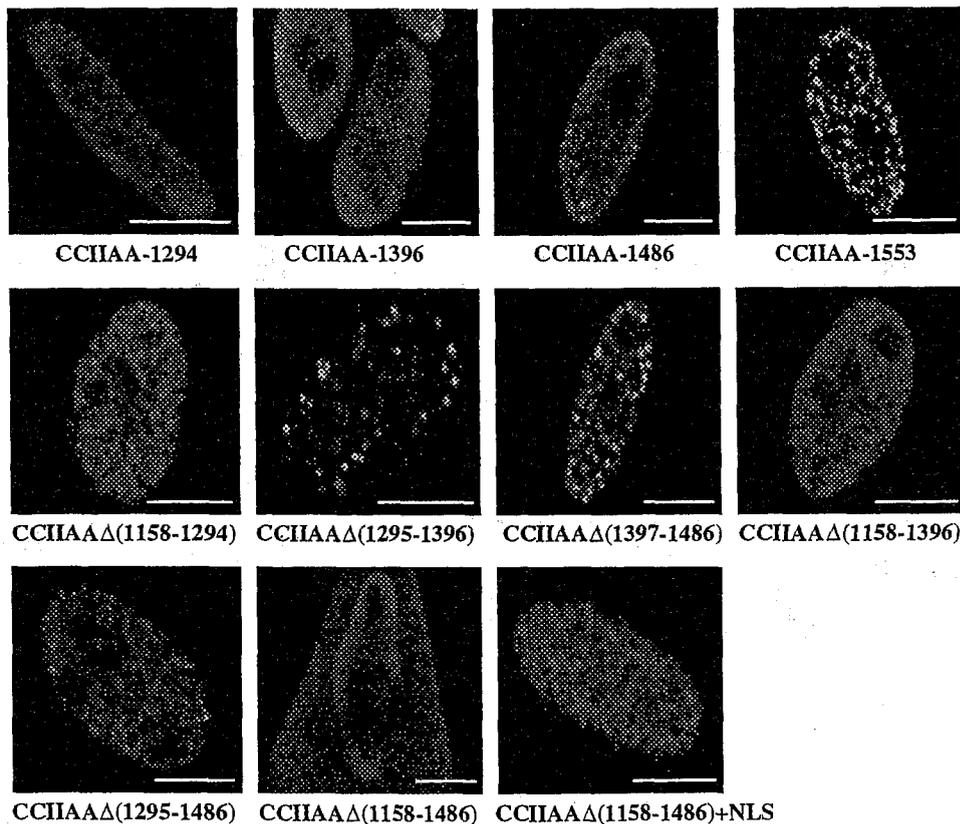


Fig. 7. Localization patterns of truncated and deleted forms of topo-II α in the nuclei of CEFs. (A) HA-tagged cDNA constructs of truncated and deleted forms of topo-II α . Each construct was subcloned into pcDNA3.1/Hyg+ expression vector and transfected CEFs. (B) Expressed topo-II constructs were detected with anti-HA antibody (green). Scale bar = 10 μ m.

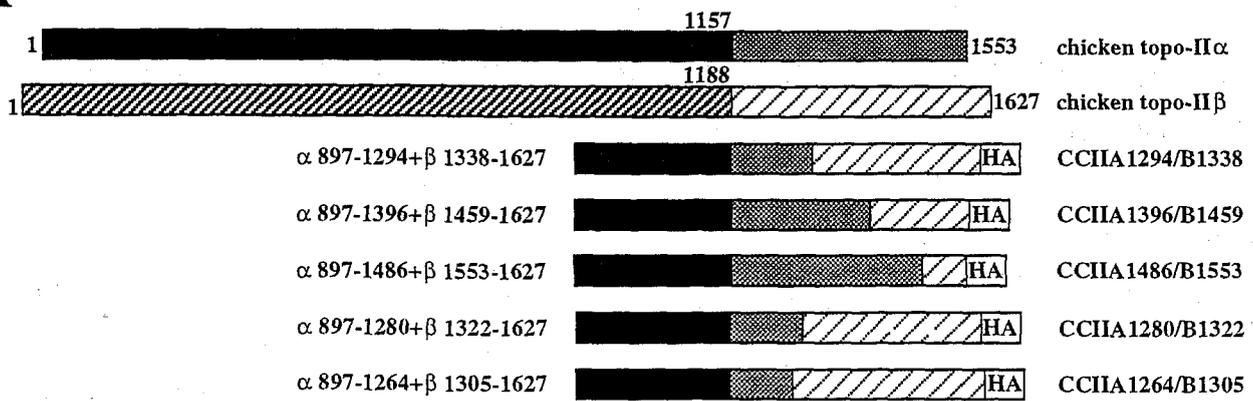
第4章 ニワトリDNAトポイソメラーゼII α / β キメラ体を用いた α アイソフォームのDNA複製部位局在に關与するモチーフの解析

前章の考察をさらに詳しく検証するために、Fig. 8A中に示すようなコンストラクト(CCIIA1294/B1338、CCIIA1396/B1459、CCIIA1486/B1553)を作成し、CEFにトランスフェクションして核の観察を行なった。その結果、3種類全てのコンストラクトにおいて、BrdUのシグナルと一致する斑点状のシグナルが観察され、 α の複製部位への局在には1158-1294の領域が必要であることが示された(Fig. 8B)。この領域をさらに細かく分けたキメラを作成し(Fig. 8A)、同様の実験を行なったところ、CCIIA1280/B1322、CCIIA1264/B1305両コンストラクトとも斑点状のシグナルがあまり見られなくなり、いくつも見られるものについてもBrdUのシグナルと一致しなくなった(Fig. 8B)。また、今までのなかで、代表的なコンストラクトについて、発現が観察された核をカウントし、内在性の β 様の見え方をするもの(homogeneous)、 α 様の斑点状のもの(spots)、分類しかねる中間の見え方のもの(intermediate)に分けた結果からも α の複製部位への局在には1280-1294の領域が本質的に必要であることが示唆された(Table1)。この領域の配列がDNA複製関連タンパク質となにかかわりがないか検索したところ、PCNAとの相互作用に必要なモチーフに相同性があることが示された(Fig. 9)。

第5章 ニワトリDNAトポイソメラーゼIIとPCNAとの*in vitro* 相互作用の解析

トポII α のC末領域とPCNAとの相互作用の有無について解析を行なった。ニワトリPCNAのクローニングの報告がなかったため、HeLa細胞のRNAより、ヒトPCNA配列の一部をプライマーとしてRT-PCRを行ない、得られたcDNA断片をプローブとしてニワトリcDNAライブラリーをスクリーニングし、ニワトリPCNA全長のクローンを得、全塩基配列を決定した(Fig. 10)。推定アミノ酸配列を他種生物と比較したところ、ニワトリにおいても非常に保存性が高いことが示された(Fig. 11)。得られたcDNA配列を基にGST融合PCNAのコンストラクトを作成して発現、精製を行なった。トポII α 、 β のC末領域はN末端に(His)₆タグをつけて発現、精製したものを使用した。精製したペプチドを用いて、グルタチオン-Sepharoseに結合させたGST-PCNAとの結合性を調べる方法である*in vitro*のpull-downアッセイを行なったところ、PCNAと α のC末領域とは相互作用するが、 β のC末領域とはしないことが示された(Fig. 12A)。次に前章で示した α C末領域中の

A



B

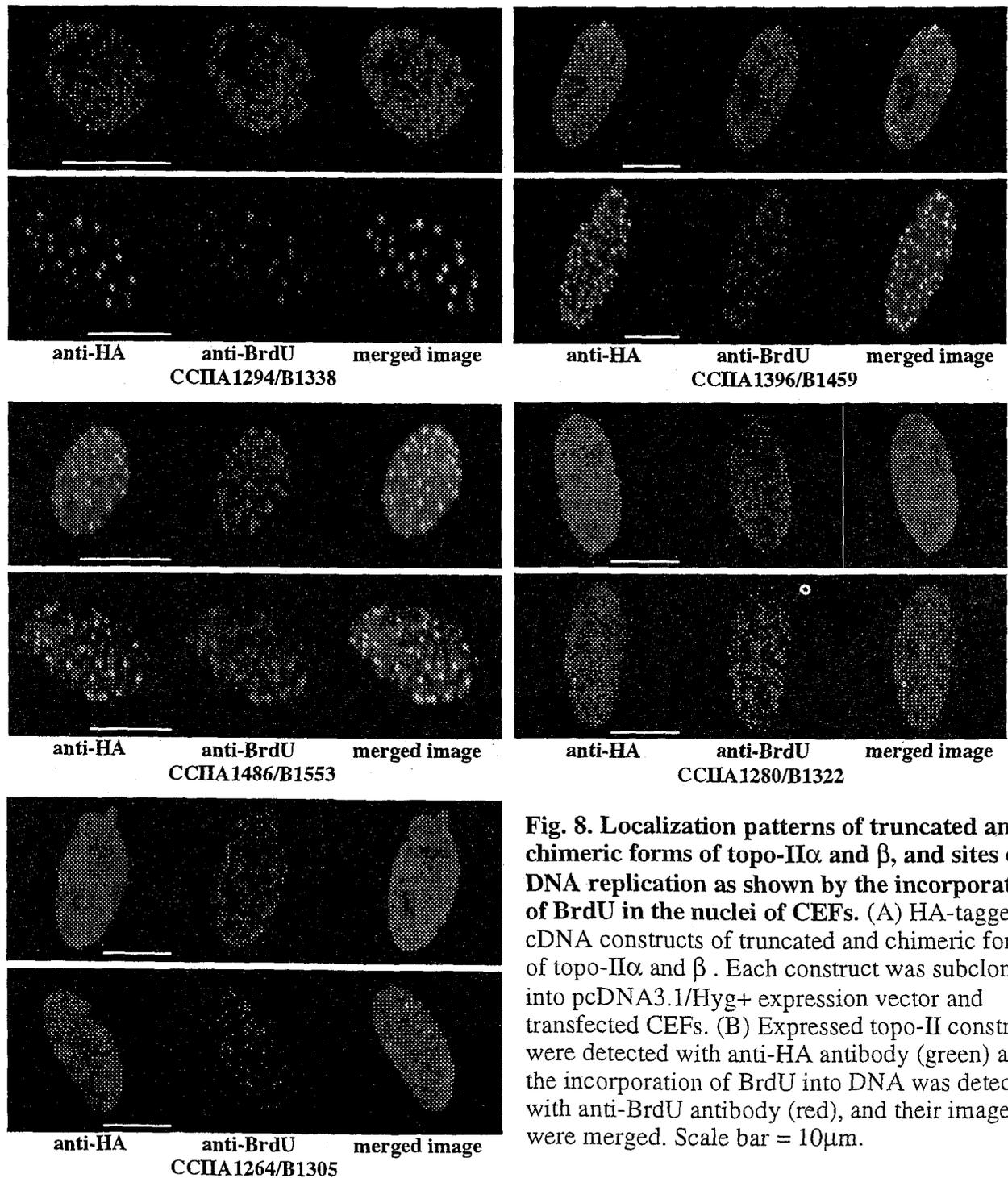


Fig. 8. Localization patterns of truncated and chimeric forms of topo-II α and β , and sites of DNA replication as shown by the incorporation of BrdU in the nuclei of CEFs. (A) HA-tagged cDNA constructs of truncated and chimeric forms of topo-II α and β . Each construct was subcloned into pcDNA3.1/Hyg+ expression vector and transfected CEFs. (B) Expressed topo-II constructs were detected with anti-HA antibody (green) and the incorporation of BrdU into DNA was detected with anti-BrdU antibody (red), and their images were merged. Scale bar = 10 μ m.

TABLE I Profiles of truncated and chimeric forms of topo-II α and β in the nuclei of transfected CEFs.

Construct	Number of nuclei observed	Types of intranuclear distributions		
		Homogeneous	Intermediate ^{a)}	Spots
CCIAA	135	4 (3.0) ^{b)}	35 (25.9)	96 (71.1)
CCIIAB	151	106 (70.2)	28 (18.5)	17 (11.3)
CCIIIBB	124	123 (99.2)	0 (0.0)	1 (0.8)
CCIIBA	454	115 (25.3)	118 (26.0)	221 (48.7)
CCIA1294/B1338	324	71 (21.9)	60 (18.5)	193 (59.6)
CCIA1280/B1322	432	192 (44.4)	155 (35.9)	85 (19.7)
CCIA1264/B1305	286	190 (66.4)	48 (16.8)	48 (16.8)

a) Several weak spots were observed on the homogeneous distribution.

b) The number in the parentheses represents % of nuclei observed.

XPG (988-1011)	<u>QTQLRIDSEFRL</u> <u>AQOEKEDAKRIK</u>
FEN1 (335-358)	<u>STQGRLDDEFFKV</u> <u>TGSLSSAKRKEP</u>
p21 (142-164)	<u>RRQTSMTDFYHS</u> <u>KRRLIFSKRKP</u>
MCMT (162-181)	<u>TRQTTTSHFAK</u> <u>GPAKRKPO</u>
RFC (1-25)	<u>MDIRKFFGV</u> <u>IPSGKKLVSETVKKNE</u>
LigI (1-21)	<u>MORSIMSEFHP</u> <u>KKEGKAKKPE</u>
chicken topo-II α (1279-1296)	<u>KRQTTLPFKP</u> <u>IKKMKRNP</u>
human topo-II α (1275-1293)	<u>KKQTTLAFKP</u> <u>IKKGGKRNP</u>
mouse topo-II α (1271-1289)	<u>KKQTTLPFKP</u> <u>VKKGKKNP</u>
chicken topo-II β (1321-1339)	<u>RRAPSSTKSSAK</u> <u>KVKKRN</u>
human topo-II β (1310-1329)	<u>RKTPSTSSGKPSA</u> <u>KKVKKRN</u>
mouse topo-II β (1303-1322)	<u>RKTPSTSGKPSA</u> <u>KKVKKRN</u>

Fig. 9. Alignment of amino acid sequences suggested to be responsible for the association with PCNA. Sequence motifs which are likely effective in association with PCNA or targeting the protein to a replication factory consist of a boxed sequence immediately followed by a KR-rich sequence (underlined).

1280-1294の領域がPCNAとの相互作用に関与しているかどうかを調べるため、1158-1280、1158-1294両ペプチドがGST融合PCNAと相互作用するかどうかを同様の実験を行なって調べた。その結果、1158-1294ペプチドでは、GST融合PCNAに結合能があるが、1158-1280ペプチドにはないことが示された(Fig. 12B)。これらの結果より、トポII α がS期で複製部位へ局在するのは、1280-1294の領域でPCNAと相互作用するためである、という可能性が示された。

第6章 総合考察

本研究では、ニワトリにDNAトポイソメラーゼII α 、 β アイソフォームが存在することを明らかにし、その基本的な性質として、細胞周期における発現の比較を行なった。また、トポII α がS期に、核内のDNA複製部位へ局在することに注目し、局在の原因となる配列を明らかにしたほか、その局在がPCNAとの相互作用による可能性を示した。

有糸分裂期(M期)の染色体の凝縮と分離にトポIIが必要であることは、酵母で明確に示されている。一方DNA複製におけるトポIIの必要性は、トポIIを欠く酵母やアフリカツメガエル卵でも1回のDNA複製自体は進行することから、否定的であるが、動物細胞からの*in vitro*でのDNA複製の再構成系にトポIIが必要なことから、DNA複製にトポIIがなんらかの関与をしている可能性は否定されていない。トポIIIは、DNAの高次構造の変換を行なうというその酵素的性質により、核内のDNAに関わる主だった反応にはなんらかの関与をすることが多い。例えば転写制御に関わるクロマチンリモデリングのコンプレックスなどにも含まれている。そのため、DNA複製における働きについても、あまり注目されず、実際の作用機作についてこれまで詳しく調べられたことはなかった。DNA複製は様々な複雑な反応から成り立っており、その場を工場に見立てた replication factoryとする概念があるが、その中でトポIIIはPCNA、RFC、LigI、DNA polymerase α 、 δ などの replication complexの中核をなす部分からやや離れて、複製反応により生じたDNA構造の過負荷をとりのぞいているのではないかというモデルが主流であったが、本研究でトポII α がモチーフによりPCNAと相互作用していることが示唆されたことから、これまで考えられていたよりも、もっと積極的にトポIIが複製に関与している可能性が考えられる。

本研究では、トポII α の1280-1294の領域がPCNAとの相互作用に必要なことを、C末キメラ体cDNAのCEFへのトランスフェクションによる観察と*in vitro*の結合実験で示した。 α の1280-1294を持たないキメラでは、やや斑点状のシグナルを形成する細胞はい

```

GGGATGTTGAGGCGGGCTTGTGCAGGGCTCGGTGCTCAAGCGGGTCTGGAGGCCCTG 60
M F E A R L V Q G S V L K R V L E A L 19
AAGGACCTCATCACTGAGGCGTGC TGGGACCTGGGTTCGGGCGGCATCAGCCTGCAGAGC 120
K D L I T E A C W D L G S G G I S L Q S 39
ATGGACTCCTCGCAGCTCCTCCCTGGTGCAGCTCAGCTGGGCTCTGAGGGCTTCGACACC 180
M D S S H V S L V Q L T L R S E G F D T 59
TACCGCTGCGGACCGCAACATCGCCATGGGCGTCAACCTAACAGCATGTCTAAAATACTG 240
Y R C D R N I A M G V N L N S M S K I L 79
AAGTGTCTGGAAATGAAGACATCATAACACTCAGAGCAGAAGACAATGCGGATACGTTG 300
K C A G N E D I I T L R A E D N A D T L 99
GCTCTAGTGTGTTGAGCACCAATCAGGAAAAGGTTTCTGATTATGAGATGAAGCTTATG 360
A L V F E A P N Q E K V S D Y E M K L M 119
GACCTCGATGTGGAGCAGCTTGGAAATCCAGAACAAGAATACAGTTGTGTAGTGAATAATG 420
D L D V E Q L G I P E Q E Y S C V V K M 139
CCTTCTGCTGAATTCGACGCATTTGTAGAGACCTCAGCCACATGGTGATGCTGTGTGTC 480
P S A E F A R I C R D L S E I G D A V V 159
ATCCTCCTGTCAAAGACGGTGTGAAATTTTCAGCTAATGGAGAGTTAGGAAATGGAAAC 540
I S C A K D G V K F S A N G E L G N G N 179
ATCAAAGCTGTCACAGACCAGTAATGTGGACAAAGAGGAAGAAGCTGTACAAATGAAATG 600
I K L S Q T S N V D K E E E A V T I E M 199
AATGAGCCAGTCCAGCTGACTTTTGTCTGTAGGATTTGAACTTTTACCAAAGCCACC 660
N E P V Q L T F A L R Y L N F F T K A T 219
CCCTTGTCACCTACAGTAACACTCAGCATGCTGCAGATGTTCTCTCGTTGTTGGAGTAC 720
P L S P T V T L S M S A D V P L V V E Y 239
AAGATTCCTGATATGGGACACTTAAAATACTACCTGGCTCCAAAGATGAAGACCAGCAG 780
K I A D M G H L K Y Y L A P K I E D Q Q 259
GAAGGCTCTTAAGTGCACCTGGGACTGAGG 809
E G S * 263

```

Fig. 10. Nucleotide and deduced amino acid sequences of chicken proliferating cell nuclear antigen(PCNA). Translation termination codon(asterisk) is indicated.

chicken PCNA	MFEARLVQGS	VLKRVLEALK	DLITPEACWDL	GSGGISLQSM	DSSHSVSLVOL
human PCNA	MFEARLVQGS	ILKKVLEALK	DLINEACWDL	SSSGVNLQSM	DSSHSVSLVOL
rat PCNA	MFEARLVQGS	ILKKVLEALK	DLINEACWDL	SSSGVNLQSM	DSSHSVSLVOL
<i>Drosophila</i> PCNA	MFEARLVQAT	ILKKILDAIK	DLINEAIFDC	SDSGIQLQAM	DNSHSVSLVSL

ILRSEGFDTY	RCDRNIAMGV	NLNSMSKILK	CAGNEDITTL	RAEDNADTLA
ILRSEGFDTY	RCDRNLAMGV	NLTSMSKILK	CAGNEDITTL	RAEDNADTLA
ILRSEGFDTY	RCDRNLAMGV	NLTSMSKILK	CAGNEDITTL	RAEDNADTLA
ILRSDGFDFK	RCDRNLSMGM	NLGSMAKILK	CANNEDNVIM	KAQDNADIVT

LVFEAPNQEK	VSDYEMKLMD	LDVEQLGIPE	QEYSCVVKMP	SAEFARICRD
LVFEAPNQEK	VSDYEMKLMD	LDVEQLGIPE	QEYSCVVKMP	SGEFARICRD
LVFEAPNQEK	VSDYEMKLMD	LDVEQLGIPE	QEYSCVVKMP	SGEFARICRD
IMFESANQEK	VSDYEMKLMN	LDDEHLGIPE	TDFSCVVRMP	AMEFARICRD

LSHIGDAVVI	SCAKDGVKFS	ANGELGNGNI	KLSTQTSNVDK	EEEAVTIEMN
LSHIGDAVVI	SCAKDGVKFS	ASGELGNGNI	KLSTQTSNVDK	EEEAVTIEMN
LSHIGDAVVI	SCAKDGVKFS	ASGELGNGNI	KLSTQTSNVDK	EEEAVSIEMN
LAQFSSESIVI	CCTKEGVKFS	ASGDVGTANI	KLQOTGSVVK	EEEAVLIEMQ

EPVQLTFALR	YLNFFTKATP	LSPTVTLSMS	ADVPLVVEYK	TADMGHLLKYY
EPVQLTFALR	YLNFFTKATP	LSSTVTLSMS	ADVPLVVEYK	TADMGHLLKYY
EPVQLTFALR	YLNFFTKATP	LSPTVTLSMS	ADVPLVVEYK	TADMGHLLKYY
EPVQLTFACR	YLNFFTKATP	LSQVQLSMC	ADVPLVVEYA	TKDLGHIRVY

LAPKIEDQOE	GS
LAPKIED-EE	GS
LAPKIED-EE	GS
LAPKIEDN-E	-T

Fig. 11. Comparison of deduced amino acid sequences of chicken, human, rat and *Drosophila* PCNA. Common amino acid residues are indicated with white letters on black background

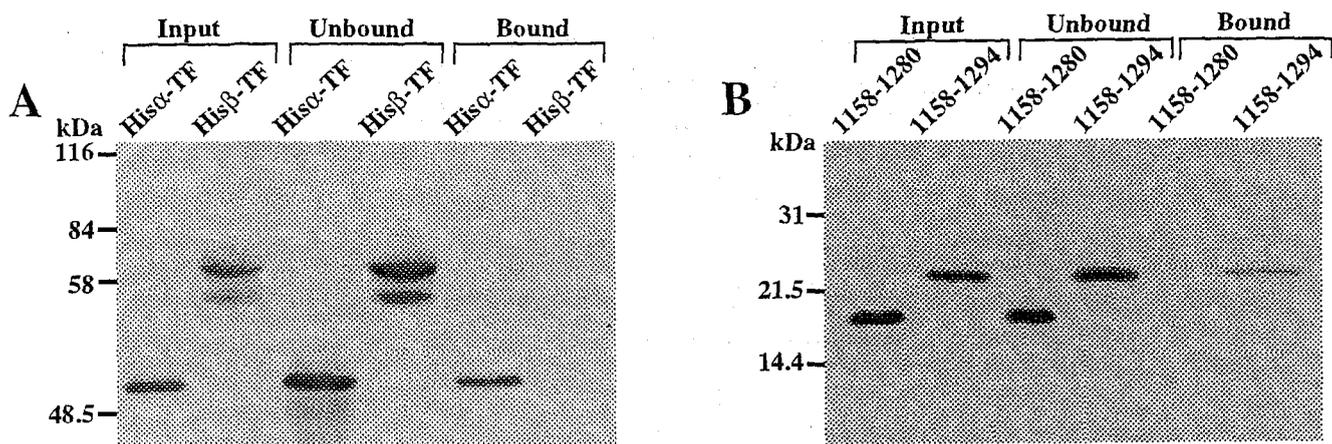


Fig. 12. *In vitro* pull-down assay of (His)₆-tagged truncated forms of topo-II α or β with GST-PCNA. (A) His α -TF(residues 1158-1553) or His β -TF(residues 1189-1627) was incubated with GST fusion form of chicken PCNA bound to GSH-Sepharose 4B. Bound and unbound fractions were subjected to SDS-PAGE and Western blotting with anti-His-tag antibody. (B) A smaller (His)₆-tagged fragment of topo-II α ; residues 1158-1280 or residues 1158-1294, was incubated with the beads-bound GST-PCNA as above.

くらかあったものの、BrdUの取込みシグナルとは重ならなくなったことから、複製部位への局在はこの領域で必要十分だと考えられる。この領域は、ヒト、マウスのトポII α にも保存されていたが、逆にトポII β には保存されていなかったことから、高等真核生物のDNA複製部位へのトポII α の集積にはこの部位を介してのPCNAとの結合に関わるものと考えられる。アイソフォームの報告のない酵母のトポIIのC末領域には、ニワトリトポII α の1280-1294に相当する領域が欠けており、特定のモチーフで直接複製部位に集積するのではなく、他のタンパク質を介すなどの間接的な方法を取っている可能性も考えられる。

S期内をステージに分けて観察したところ、S期初期では核内全体にわたって複製反応が起っているにもかかわらずトポII α の発現は少なく、中期から後期にかけて発現量が増えていた。このことから、高度に凝縮したヘテロクロマチンの高次構造を換え、DNA複製を行なう上で、特にトポII α が必要なのではないかと考えられる。分裂期以外の全ての時期においてトポII β は核内にほぼ均一に存在していることが示されており、S期初期では複製によって生じた負荷を β が解消している可能性がある。また、トポII β と同様に、間期核内にほぼ均一に存在しており、DNA構造のねじれを解消することのできるDNAトポイソメラーゼI(トポI)もS期初期の負荷を解消する働きを担っている可能性が考えら

れる。

トポIIに変異のある温度感受性変異株で1回はDNA複製が行なわれることが可能であるがその後の染色体の凝縮と分離がなされないことから、トポIIはDNA複製に重要ではあるが必須ではなく、むしろ主として分裂期の準備としてcohesin等と相互作用し、染色体の凝縮と分配に関わっているのではないかという可能性が考えられる。最近報告されたトポII α のノックアウトマウスでは、卵割の4-8細胞期にS期で止まってしまう可能性が示されており、トポII α のS期での重要性が注目されている。その観点からも、本研究でトポII α の1280-1294でPCNAと相互作用する可能性を示したことは意義深いと思われる。

要約

- 1) 同調培養した雌ニワトリ胚由来繊維芽細胞 (CEF) におけるニワトリDNAトポイソメラーゼII α 、 β (トポII α 、 β) の細胞周期を通じての発現をタンパク質、mRNAレベルで解析した結果、 α はS期からG₂期、M期にかけて発現するが、 β は細胞周期を通じてほぼ一定量の発現をすることが示された。
- 2) 細胞周期でトポII α 、 β の核内局在性がどのように変化するかを間接蛍光抗体法を用いて調べた。 α はG₁期で検出されず、G₂期で核内全体に存在したほか、S期でDNA複製部位を示すBrdU取り込みのシグナルと、Wヘテロクロマチン部位も含めて一致した。 β は細胞周期を通じて分裂間期には核内にほぼ均一に存在した。
- 3) 細胞分裂期 (M期) では、トポII α は染色体上のほぼ全域に存在するが分裂終期には存在量が減少し、G₁初期の娘細胞の核内には検出されなくなった。一方トポII β はM期で細胞内全体に分散して存在していたが、分裂終期には核内に徐々に局在し始め、G₁初期には核内にほぼ均一に存在した。
- 4) トポII α 、 β のC末領域を交換したキメラcDNAコンストラクト (HAタグ付加) をCEFにトランスフェクションして発現させ、抗HA抗体を用いて観察した結果、 α のDNA複製部位への局在はそのC末領域に依っていることが示された。
- 5) トポII α のC末領域をさらに細かく分けて作成したさまざまな欠失変異体やトポII β とのキメラコンストラクトの発現結果より、 α の複製部位への局在には1280-1294アミ

6) ニワトリPCNAのcDNAをクローニングし、全塩基配列を決定した。グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) 融合ニワトリPCNAと、N末端に(His)₆タグを付加したトポII α のC末領域またはその一部、トポII β のC末領域をそれぞれ大腸菌内で発現させ、精製した。*In vitro* のpull-downアッセイとしてグルタチオン-Sepharoseに結合させたGST-PCNAとそれぞれのトポII発現ポリペプチドとの結合性をしらべたところ、トポII α の1280-1294領域にPCNAとの結合能があることが示され、トポII α のS期でのDNA複製部位への局在は1280-1294領域で複製ファクター中のPCNAと相互作用するためであることが示唆された。

原著論文

Atsuko Niimi, Noriyuki Suka, Masahiko Harata, Akihiko Kikuchi, and Shigeki Mizuno.
Co-localization of chicken DNA topoisomerase II α , but not β , with site of DNA replication and its dependence on the C-terminal sequence motif required for binding to PCNA. (Submitted to Chromosoma)

論文審査結果要旨

DNAトポイソメラーゼⅡ(トポⅡ)はATPの結合,加水分解を伴って2本鎖DNAの切断・再結合を行うことにより,2本鎖DNAへの超らせんの導入・解消,2本鎖DNA間の絡まり,結び目の導入・解消を生じる酵素で,核内の存在量も多い。近年,哺乳類で α , β の2種のトポⅡ分子種(アイソフォーム)の存在が明らかにされ,それぞれの機能分担とその機構に興味もたれている。本研究は雌ニワトリの核内でW染色体(雌特有の性染色体)の形成するヘテロクロマチンに反応するモノクローナル抗体3H9を取得し,その抗原タンパク質のcDNAクローンの解析から,この抗原がトポⅡ α であることが判明したことに端を発し,鳥類のトポⅡにも α , β アイソフォームが存在することを示し,それぞれの細胞周期における発現と核内局在性の違い,トポⅡ α のDNA複製部位への集積機構について解析を進めたものである。

まず,上記の3H9抗体及び名古屋大学医学部・菊池韶彦教授より供与された哺乳類のトポⅡ β に対するモノクローナル抗体3B6を用いてニワトリMSB-1細胞のcDNAライブラリーをスクリーニングして,トポⅡ α , β の全長をカバーするcDNAクローンを取得し全塩基配列を決定した。推定アミノ酸配列をヒトのトポⅡ α , β と比較するとN末側のATPase domainと中央部のcleavage/religation domainでは80-95%の相同性が認められたが,C末領域は α 間で46%, β 間で71%と低かった。ニワトリのトポⅡ α , β 間でもC末領域の相同性は37%であった。相同性の低いC末の一部(α -150, β -100)を大腸菌で発現させ,マウスで α , β アイソフォームを特異的に認識するポリクローナル抗体を作製した。これらの抗体と α , β のC末領域cDNAクローンをプローブとして,同調培養した雌ニワトリ胚由来の繊維芽細胞(CEF)における発現を調べた結果,mRNA,タンパク質の両レベルでトポⅡ α はS期中期からM期にかけて細胞周期依存的に発現するのに対しトポⅡ β は細胞周期を通じてほぼ一定の発現を示すことがわかった。次に,トポⅡ α , β に対する特異抗体を用いて同調培養したCEFの核内局在性とプロモデオキシウリジン(BrdU)の取り込みでみたDNA複製部位との関係を調べた。トポⅡ α はS期中期から後期に核内にスポット状に分布し,これらの部位はDNA複製部位と一致した。M期の前期から後期には染色体上に分布し,終期にはシグナルが弱くなり,娘細胞の核では検出されなくなった。一方,トポⅡ β は間期核内にはほぼ均一に分布し,M期には細胞内に分散,娘細胞核に再び集積した。トポⅡ α の中央領域の一部とC末領域にHAタグを付加したcDNAコンストラクトをCEFに導入,タンパク質として発現させると,その分布は内在性トポⅡ α の分布と同様であった。このC末の様々な部位を β の配列と置き換えたキメラ体をCEFで発現させた結果, α のDNA複製部位への集積には1280-1294残基間の配列が必要であることがわかった。この配列はいくつかのDNA複製関連タンパク質中のPCNA(proliferating cell nuclear antigen)結合配列と類似しており, β にはこの配列は存在しなかった。ニワトリPCNAのcDNAクローンを取得し,GST融合タンパク質として大腸菌で発現,精製したものに対する*in vitro*での結合を調べた結果,トポⅡ α の1280-1294残基の配列を含むポリペプチドがPCNAと結合することが示された。

以上のように,本研究により,鳥類にもトポⅡ α , β アイソフォームの存在が示され, α がS期中・後期にDNA複製部位に集積し,それが複製複合体中のPCNAとの結合によることが示唆されたことは,新規の発見であり,高等動物のトポⅡ α の機能解明に大きく貢献したことから,審査員一同著者は博士(農学)の学位を授与されるに充分の資格を有すると判定した。