

領域融合レビュー, 5, e006 (2016)
DOI: 10.7875/leading.author.5.e006
2016年7月5日公開

真核生物における染色体DNAの複製開始の機構

Molecular mechanism of the initiation of chromosomal DNA replication in eukaryotes

荒木 弘之

Hiroyuki Araki

国立遺伝学研究所 微生物遺伝研究部門

要 約

真核生物における染色体DNAの複製は特定の領域から開始する。この複製開始点にはOrcが結合し、DNAヘリカーゼの触媒コアであるMcm2-7ヘテロ六量体が主としてG1期にロードされる。複製開始の過程が細胞周期により制御されることによりDNA複製と細胞分裂は共役するが、これには細胞周期の制御の鍵となるサイクリン依存性キナーゼおよびDbf4依存性キナーゼによる複製タンパク質のリン酸化が重要な役割を担う。すなわち、これらリン酸化によりCdc45とGINS複合体とが結合したCMG複合体が複製開始点に形成され、複製において活性をもつDNAヘリカーゼとしてはたらくようになることが複製開始の制御において要となる。そして、DNAポリメラーゼがリクルートされDNA複製が開始する。現時点において詳細は不明だが、Mcm2-7ヘテロ六量体およびCMG複合体の構造、そして、*in vitro*における再構築により、CMG複合体の形成の機構を類推できるようになってきており、複製開始の機構について全容の解明が近づいている。

はじめに

生命現象を分子レベルの機構として知りたいとき、どのように研究を進めるだろうか？クラシックには、1) 反応に関与するタンパク質をみつけ、2) そのタンパク質を除いたり変異をくわえたりすることによる変化から反応機構を推察しモデルを構築する。さらに、3) 単離したタンパク質を組み合わせることにより反応を*in vitro*において再構築することができれば、モデルの証明と同時にさらに詳細な機構を知ることができる。真核生物におけるDNA複製の機構の研究は、ウイルスを用いた*in vitro*

DNA複製系が構築され、3) の段階にまで到達した。しかし、ウイルスは宿主細胞の複製系そのものではなくウイルス独自の機構をもつため、細胞のなかで起こる複製反応を知るには不十分であった。また、アフリカツメガエルの卵抽出液を用いた複製系も構築され解析も進んだが、2) の段階でとまっている。一方、シンプルな単細胞の真核生物である酵母をモデルとした研究においては、遺伝学的な手法による1) や2) の段階の研究が進み、現在、3) の段階に進みつつある。

一方で、タンパク質の構造解析の技術の進展がめざましい。X線による結晶解析やNMRによる溶液における構造解析にくわえ、近年、電子顕微鏡を用いた単粒子解析の技術が急速に進み巨大なタンパク質の構造が原子レベルで決定されるようになってきた。これらの構造と、さきに述べた解析を組み合わせることにより、真核生物における分子レベルでの複製機構の理解は、今世紀にはいって急激に進んでいる。ここでは、最近の研究を中心に、真核生物における染色体DNAの複製開始の機構を解説する。

1. 複製開始点

染色体DNAの複製は染色体に散在する特定の部位である複製開始点あるいは複製開始領域から開始する。複製開始点の数は酵母で約1000、ヒトでは数万になる。その部位を規定するのは6つのサブユニットからなるOrcである。OrcはATPと結合し加水分解するATPaseであり、2本鎖DNAと結合する。酵母からヒトまでよく保存されており、酵母やショウジョウバエのOrcは電子顕微鏡による単粒子解析やX線結晶構造解析からその構造が明らかにされている¹⁻³⁾。このOrcの性質が複製開始点を決めるうえで重要な役割を担う。出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)においては特定の11bpの配列であるACS

と結合するが、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*)においては Orc4 が AT フックとよばれる構造をもつため AT を多く含む領域と結合する^{4,5)}。しかし、ヒトやショウジョウバエの Orc は特定の塩基配列を認識しない。したがって、酵母では DNA 配列により複製開始点が規定されるが、多細胞生物では DNA 配列よりむしろクロマチンの状態などにより Orc の結合部位が決まると考えられている⁶⁾。実際、Orc のもっとも大きなサブユニットである Orc1 はヒストンとの結合部位をもち、その部位を除くと染色体における Orc の結合様式が変化する⁷⁾。また、Orc と染色体 DNA との結合は、出芽酵母においては細胞周期をつうじて起こるが、分裂酵母においては細胞周期により結合の状態が変わるとの報告もある。さらに、哺乳類において Orc1 は G1 期から結合し M 期には分解される⁵⁾。

2. Mcm2-7 ヘテロ六量体の複製開始点へのロード

DNA 鎮を合成する DNA ポリメラーゼは 2 本鎮 DNA に対して DNA 鎮を合成することはできない。DNA 鎮の合成をはじめるには、鋳型となる 1 本鎮 DNA およびプライマーが必要である。そのため、複製開始点において 2 本鎮 DNA が 1 本鎮 DNA にほどかれないかぎり DNA の合成は開始されない。大腸菌においては複製開始点に複数の DnaA が結合するとその近傍の 2 本鎮 DNA がほどかれるが、真核生物においては Orc の結合により複製開始点において 2 本鎮 DNA がほどかれるという報告はない。

真核生物においてはサイクリン依存性キナーゼの活性の低い M 期の後期から G1 期にかけて、2 本鎮 DNA を 1 本鎮 DNA にほどく DNA ヘリカーゼの触媒コアとなる Mcm2-7 ヘテロ六量体が Orc の結合した複製開始点にロードされる(図 1a)。この染色体 DNA における Orc および Mcm2-7 ヘテロ六量体からなる構造を複製開始前複合体 (pre-replicative complex あるいは pre-replication complex: pre-RC) とよぶ。複製開始前複合体の形成には、Orc および Mcm2-7 ヘテロ六量体にくわえ Cdc6 および Cdt1 が必要である。出芽酵母において Cdt1 は Mcm2-7 ヘテロ六量体と複合体を形成しており、Cdc6 は Orc とともににはたらく。Orc, Mcm2-7 ヘテロ六量体、Cdc6 は ATPase 活性をもち、ATP 加水分解のエネルギーを用いて Mcm2-7 ヘテロ六量体を複製開始点にロードする。

Mcm2-7 ヘテロ六量体のそれぞれのサブユニットは共通する特徴をもつ。すなわち、N 末端側に OB フォールドおよびジンクフィンガードメイン、C 末端側に AAA⁺ ファミリーに属する ATPase ドメインが位置する。複製開始点には 2 分子の Mcm2-7 ヘテロ 6 量体の N 末端側がむかいか合うようにロードされるが、電子顕微鏡による単粒子解析などからおのののサブユニットの配置が報告されている²⁾(図 2)。そして、Mcm2 と Mcm5 とのあいだに隙間が生じ、この部分を用いて 2 本鎮 DNA にロードされると考えられている。また、Mcm2-Mcm6 の側部にも隙間が

観察される。さらに、相対する Mcm5 と Mcm7 の N 末端およびジンクフィンガードメインの相互作用により結合する⁸⁾。

Mcm2-7 ヘテロ六量体が複製開始点ヘロードされる機構は、出芽酵母において精製タンパク質を用いた再構成系により解析されている。残念ながら、一対の Mcm2-7 へテロ六量体がどのように複製開始点ヘロードされるかはまだ完全にはわかっていない。ロードされた Mcm2-7 へテロ六量体は必ず対になっているため、一対の Mcm2-7 へテロ六量体がいちどにロードされるのではないかとの説もあったが、1 分子観察などによると、まず 1 分子の Mcm2-7 へテロ六量体がロードされ、すぐにつぎの 1 分子の Mcm2-7 へテロ六量体がロードされており⁹⁾、Mcm2-7 へテロ六量体のロードが正常に起こっているかどうかの検知機構もあるようである^{10,11)}。いずれにせよ、厳密な機構、とくに、2 分子目の Mcm2-7 へテロ六量体のロードについては不明な点が多く、今後の研究を待たなければならぬ。

3. Mcm2-7 ヘテロ六量体のもつ DNA ヘリカーゼ活性の活性化

Mcm2-7 ヘテロ六量体は DNA ヘリカーゼ活性を担うが、Mcm2-7 ヘテロ六量体だけでは活性を示さない(生物種によっては、いくつかのサブユニットからなる複合体が弱い活性を示すものもある)。DNA ヘリカーゼの活性化には G1 期の後期から S 期において活性化されるサイクリン依存性キナーゼおよび Dbf4 依存性キナーゼによるリン酸化、および、それにともなう複数のタンパク質の複製開始点への集合が必要であることが出芽酵母を用いた解析からわかつってきた。ここでは、Mcm2-7 ヘテロ六量体のもつ DNA ヘリカーゼ活性の活性化について、出芽酵母を中心に説明する。

Dbf4 依存性キナーゼは Cdc7 を触媒サブユニットとし、制御サブユニットである Dbf4 と複合体を形成する。G1 期の後期に DBF4 遺伝子の転写が活性化され、Dbf4 のタンパク質量が増加することにより Dbf4 依存性キナーゼは活性化される。活性化された Dbf4 依存性キナーゼは Mcm2, Mcm4, Mcm6 の N 末端側の構造をとらない領域にある複数の Ser および Thr をリン酸化する。とくに、Mcm6 の Dbf4 依存性キナーゼによるリン酸化は Sld3-Sld7 複合体と Cdc45 との複合体の複製開始点との結合を促進する¹²⁾(図 1b)。

Sld3-Sld7 複合体は 2 分子の Sld3 がその N 末端領域において Sld7 二量体により結合された強固な構造をとる¹³⁾(図 2a)。Sld3 の中央には Cdc45 との結合領域があり、1 分子の Cdc45 が 1 分子の Sld3 と結合するため¹⁴⁾、Sld3-Sld7 複合体は 2 分子の Cdc45 と結合する。細胞において Sld3-Sld7 複合体と Cdc45 は互いに依存して複製開始点と結合するが^{15,16)}、in vitro において、Sld3-Sld7 複

合体は Cdc45 がなくても複製開始点と結合できるが、Cdc45 の複製開始点との結合には Sld3 が必要である¹²⁾。このように、Dbf4 依存性キナーゼによる Mcm6 のリン酸化により Sld3-Sld7 複合体と Cdc45 との複合体が Mcm2-7 へテロ六量体と結合する。筆者らは、Sld3-Sld7 複合体の構造からその配置を推測しており(図 2b)，この配置は、のちに述べる活性化型の DNA ヘリカーゼの形成にも都合がよいものとなっている。

サイクリン依存性キナーゼは出芽酵母においては Sld2

および Sld3 をリン酸化することにより複製開始を促進する¹⁷⁾。Sld2 にはサイクリン依存性キナーゼによりリン酸化されうる 11箇所の部位が存在する。このうち、Thr84 がサイクリン依存性キナーゼによりリン酸化されると Dpb11 と結合する。Dpb11 は C 末端側および N 末端側にタンデムにならんだ BRCT 領域をもち、このタンデムにならんだ BRCT 領域はリン酸化されたペプチドと結合することが知られている。リン酸化された Sld2 は Dpb11 の C 末端側にあるタンデムにならんだ BRCT 領域と結合す

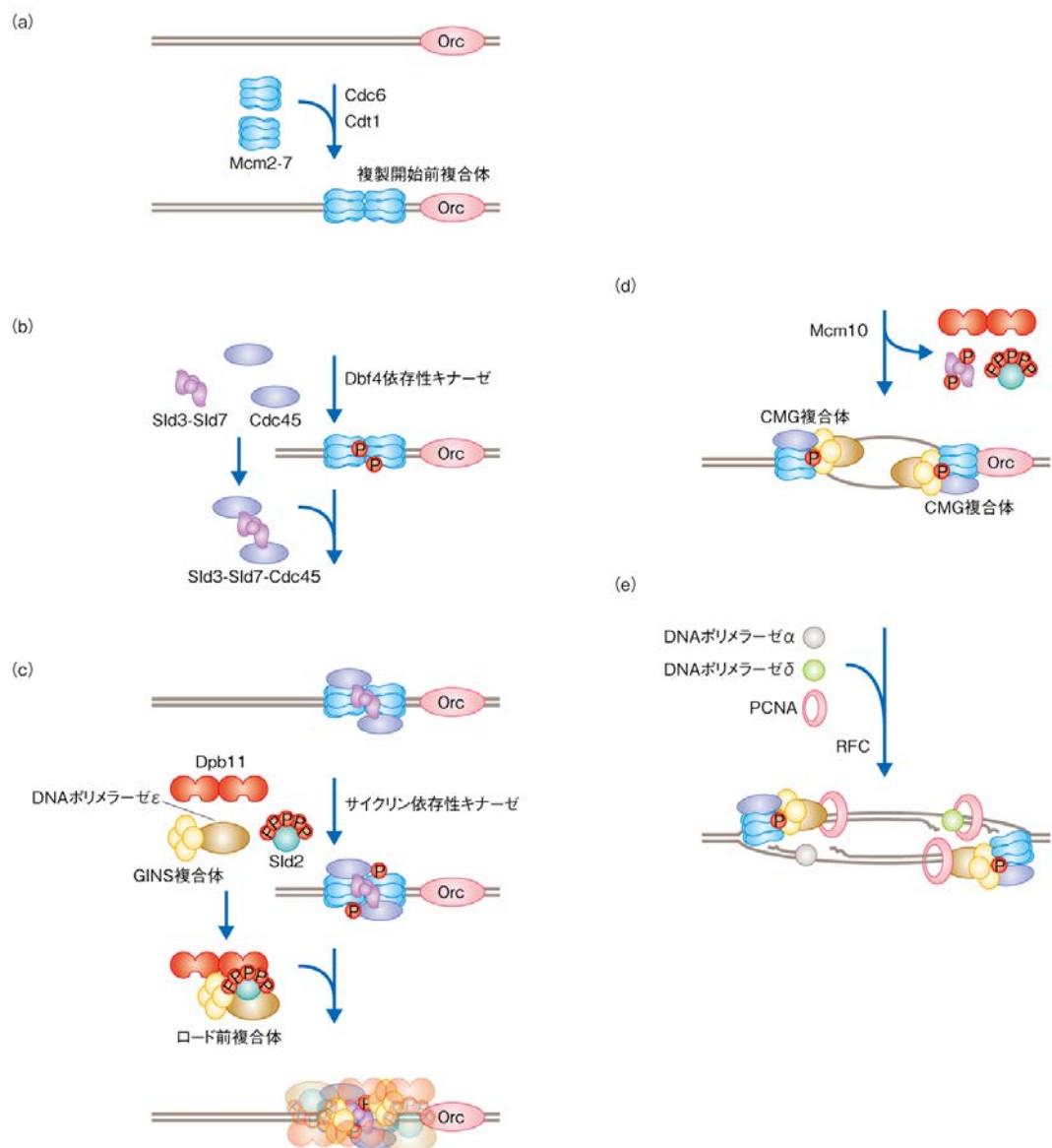


図 1 酵母の研究にもとづく真核生物における染色体 DNA の複製開始の機構

- (a) Orc の結合した複製開始点への Mcm2-7 へテロ六量体のロード.
 - (b) 複製開始点への Sld3-Sld7 複合体と Cdc45 との複合体の結合.
 - (c) 複製開始点におけるロード前複合体の形成.
 - (d) 複製開始点における CMG 複合体の形成.
 - (e) DNA ポリメラーゼ δ および DNA ポリメラーゼ ε による DNA 鎮の伸長. ここでは、DNA ポリメラーゼ ε がリーディング鎖を、DNA ポリメラーゼ δ がラギング鎖を伸長するとした.
- P : リン酸化.

る。一方、Dpb11 の N 末端側にあるタンデムにならんだ BRCT 領域はリン酸化された Sld3 と結合する。Sld3 もサイクリン依存性キナーゼによりリン酸化されうる 12箇所の部位をもつが、C 末端側にある Thr600 および Ser622 のリン酸化が Dpb11 との結合に関与する。どちらか一方がリン酸化されれば結合は可能であるが、両方ともリン酸化されると強く結合する。

サイクリン依存性キナーゼによりリン酸化された Sld2 および Sld3 が Dpb11 と結合することにより、どのように複製開始が促進されるのであろうか。その説明のまえに、活性型の DNA ヘリカーゼについて説明したほうが理解しやすいだろう。Mcm2-7 ヘテロ六量体は DNA ヘリカーゼとしての活性をもつが、さきに述べたように、Mcm2-7 ヘテロ六量体だけでは活性を示さない。細胞においては、Mcm2-7 ヘテロ六量体は Cdc45 および GINS 複合体と CMG 複合体とよばれる強固な複合体を形成し、この CMG 複合体が複製において活性をもつ DNA ヘリカーゼとしてはたらく¹⁸⁾。さきに述べたように、Cdc45 は Sld3-Sld7 複合体と結合し、Mcm2-7 ヘテロ六量体に相互依存的にリクルートされる。GINS 複合体は Sld5, Psf1, Psf2, Psf3 の 4 つのサブユニットからなる複合体で、筆者らにより、末尾の数字の日本語読みで go, ichi, nii, san と名づけられたものである。Sld3 は Cdc45 のリクルートおよび GINS

複合体の複製開始点へのリクルートに必要である。そして、筆者らにより、Sld2 のサイクリン依存性キナーゼによるリン酸化も GINS 複合体のリクルートに関与していることが明らかにされ、この機構についても解析した。その結果、リン酸化された Sld2 が Dpb11 と結合すると、DNA ポリメラーゼ ε および GINS 複合体がこの複合体にさらにくわわることが示された。この複合体をロード前複合体 (pre-loading complex : pre-LC) と名づけ、ロード前複合体に含まれる Dpb11 が複製開始点においてリン酸化された Sld3 と結合することにより、GINS 複合体は複製開始点にリクルートされるものと考えている¹⁹⁾ (図 1c)。DNA ポリメラーゼ ε は細胞周期をつうじ GINS 複合体と安定な複合体を形成しており、DNA ポリメラーゼ ε および GINS 複合体は Dpb11 と弱く相互作用する。これらの結合が Sld2 により安定化されているのであろう。

哺乳類においては Dpb11 と対応する BRCT 領域を 9 つもつ TopBP1 が知られていたが、TopBP1 の結合タンパク質として Sld3 に対応する Treslin/Ticrr がみつかった^{20,21)}。アフリカツメガエルの卵抽出液を用いた解析により、TopBP1 および Treslin は独立にクロマチンと結合するが、TopBP1 と Treslin との結合はサイクリン依存性キナーゼによる Treslin のリン酸化により起り、複製開始に必須であることがわかった。さらに、Treslin には MTBP が結

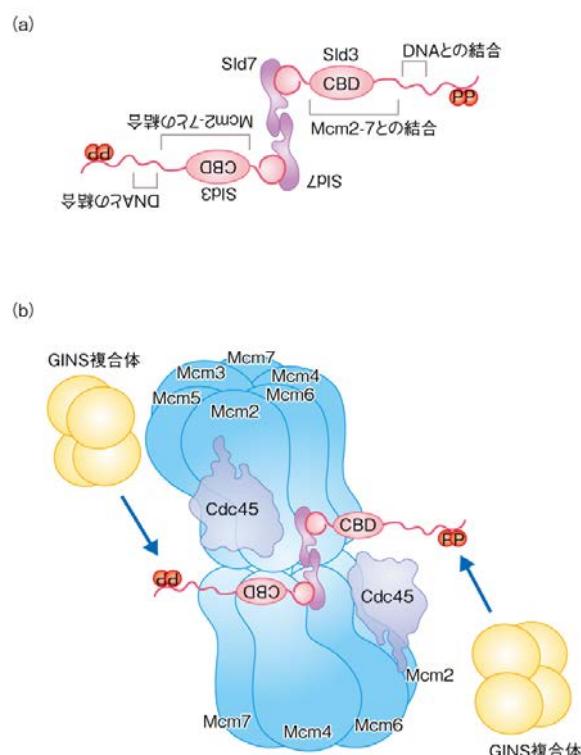


図 2 Sld3-Sld7 複合体の構造および Mcm2-7 ヘテロ六量体に対する配置

(a) Sld3-Sld7 複合体の類推される構造。

(b) Sld3-Sld7 複合体の 2 分子の Mcm2-7 ヘテロ六量体に対する配置のモデル。このモデルにおいては、Sld3 は結合した Mcm2-7 ヘテロ六量体ではなく、反対側の Mcm2-7 ヘテロ六量体に Cdc45 および GINS 複合体を結合させる。

CBD : Cdc45 結合ドメイン, P : リン酸化。

合し、このMTBPも複製開始に必須であることが示されている²²⁾。これがSld3と複合体を形成するSld7と同じはたらきをしているかどうかはわからない。一方、哺乳類においてSld2と弱い相同性を示すタンパク質としてRecQL4が知られている。RecQL4はC末端側にヘリカーゼドメインをもち、このドメインの欠損は早老症のひとつであるRothmund-Thomson症候群の発症の原因となる。ヘリカーゼドメインは細胞の増殖には必須ではないが、Sld2と相同性を示すN末端側の領域は必須である¹⁷⁾。アフリカツメガエルの卵抽出液を用いた解析から、RecQL4は複製開始の後半においてはたらいているよう、DNAポリメラーゼαのリクルートに必要との報告もあり、今後の解析が必要である。

複製開始点に結合したMcm2-7ヘテロ六量体、Cdc45、GINS複合体は強固なCMG複合体を形成する¹⁸⁾(図1c)。しかし、CMG複合体の形成はすぐには複製開始にはつながらない。それは、Mcm10を欠くとCMG複合体様の強固な複合体は形成されるが、複製開始は起こらないからである。Mcm10は一对のCMG複合体が両方向にむけ2本鎖DNAをほどくようにするはたらきがあると考えられているが(図1d)，分子機能はわかっていない²³⁾。Mcm10の機能は複製開始における残されたミステリーである。

強固なCMG複合体ができる過程はまだわからないが、Mcm2-7ヘテロ六量体およびCMG複合体の構造は電子顕微鏡による単粒子解析から明らかにされている^{8,24,25)}。GINS複合体およびCdc45はMcm2-7ヘテロ六量体のMcm2とMcm5とのあいだの隙間をうめるよう位置する(図3)。さらに、N末端側がむかい合うよう形成された一对のMcm2-7ヘテロ六量体の位置関係からは、Mcm2とMcm5とのあいだの隙間は反対の方向をむいている(図2b)。Mcm2-7ヘテロ六量体をDNAにロードさせ電子顕微鏡により観察すると、2本鎖DNAをとおすかたちに見える。一方で、CMG複合体におけるDNAヘリカーゼ活性の解析から、CMG複合体は1本鎖DNAのうえを3'側から5'側の方向に動いていることがわかった(図4)。すなわち、CMG複合体はリーディング鎖の鋳型DNAのう

えを複製の方向に動いていることになる。これらのことから、Mcm2-7ヘテロ六量体はまず2本鎖DNAをリングにとおし、活性化された時点あるいはCMG複合体が形成された時点で1本鎖DNAをリングにとおす。このとき、Mcm2とMcm5とのあいだの隙間の位置が同一の方向をむかなければ、複製開始点にロードされた一对のMcm2-7ヘテロ六量体あるいはCMG複合体が2本鎖DNAから1本鎖DNAへと乗り換えるのには都合がよいからかもしれない。

4. 複製フォークの形成

複製開始点において2本鎖DNAが1本鎖DNAにほどかれると、こんどはDNAポリメラーゼの出番である。真核生物における染色体DNAの複製にはDNAポリメラーゼα、DNAポリメラーゼδ、DNAポリメラーゼεが必要であり、これらのDNAポリメラーゼがどのように複製開始点にリクルートされるのか詳細は不明であるが、DNAヘリカーゼ活性をもつCMG複合体やそれに結合するCtf4とDNAポリメラーゼとの結合が重要なはたらきをすることが推測される²⁶⁾。

複製開始点においてまずはたらくのはDNAポリメラーゼαである。DNAポリメラーゼαはプライマーRNAを合成するプライマーゼと強固な複合体を形成しており、このプライマーゼの合成したRNAについて新たなDNA鎖を合成する。DNAポリメラーゼαはCtf4(哺乳類においては、And1)と結合する。Ctf4はDNAポリメラーゼαと結合する領域においてCMG複合体に含まれるGINS複合体とも結合する。さらに、Ctf4はホモ三量体を形成するため、2分子のDNAポリメラーゼαをCMG複合体を介して複製フォークにとどめ、DNAポリメラーゼαが効率よく使われるようになると考えられている²⁷⁾(図4)。

DNAポリメラーゼδおよびDNAポリメラーゼεはともにDNAポリメラーゼαの合成したDNAをプライマーとしてDNA鎖を伸長するが、DNAポリメラーゼεもGINS複合体のサブユニットであるPsf1と強く結合するため、GINS複合体を介してCMG複合体と結合する²⁸⁾。

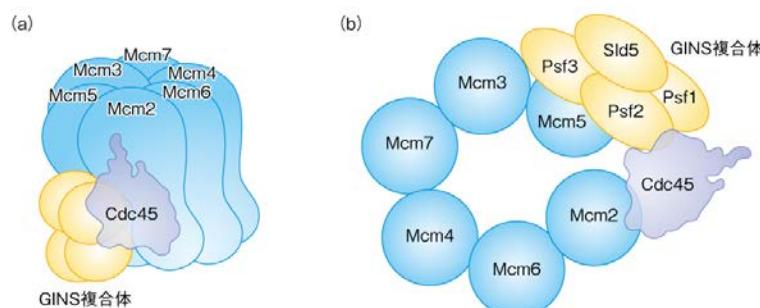


図3 CMG複合体の構造

- (a) 横から見たところ。
- (b) 輪切りにしたところ。

また、DNAポリメラーゼ ϵ はロード前複合体の構成タンパク質として複製開始にはたらき、同時に、複製開始点にリクルートされると考えられる。そして、DNAポリメラーゼ α およびDNAポリメラーゼ ϵ がDNAヘリカーゼ活性をもつCMG複合体と同時に結合し、リーディング鎖およびラギング鎖の合成に関与するものと思われる。

DNAポリメラーゼ δ およびDNAポリメラーゼ ϵ がDNA鎖を伸長する際には、5つのサブユニットからなるクランプローダーであるRFCがプライマーの3'末端に結合し、DNAポリメラーゼの鋲型DNAからの脱落を防止するリング状のスライディングクランプであるPCNAをロードする²⁹⁾(図1e)。これらDNAポリメラーゼがどのようにDNA合成を進めているかは長く議論のわかれるところであったが、DNAポリメラーゼ δ およびDNAポリメラーゼ ϵ においてrNTPを取り込みやすい変異体が分離され、それらを用いた解析から、DNAポリメラーゼ δ がラギング鎖、DNAポリメラーゼ ϵ がリーディング鎖を主として合成すると結論された。この結論は、まちがったヌクレオチドを取り込みやすいDNAポリメラーゼの変異体を用いたこれまでの解析と一致した。しかし、rNTPの取り込みの解析にてDNAポリメラーゼの役割論は一件落着かと思いきや、rNTPを取り込んだDNA鎖の修復においてリーディング鎖とラギング鎖とのあいだには差があり、実際には、リーディング鎖およびラギング鎖ともDNAポリメラーゼ δ がおもに合成しているとする報告がなされて、この問題はまた混沌としたなかに放り込まれている³⁰⁾。DNAポリメラーゼ ϵ がリーディング鎖を合成し、DNAヘリカーゼ活性をもつCMG複合体と効率よく共役しているとの報告もあるが、DNAポリメラーゼ δ とDNAポリメラーゼ ϵ の役割分担がはつきりしないため評価のわかれることである。現在のところ、DNAポリメラーゼ δ がどのように複製開始点にリクルートされるのかはわからない。

リーディング鎖は複製フォークの進行方向と同じ方向に進み連続したDNA合成が可能であるが、ラギング鎖は複製フォークの進行方向とは反対の方向に進むため不連続なDNA合成が起こる。真核生物においてはラギング鎖の長さがヌクレオソームにより規定されており、これはヌ

クレオソームほぼ1つ分に相当する165 bpとなる³¹⁾。DNAポリメラーゼ α はRNAプライマーを用いて30~50ヌクレオチドのDNA鎖を合成するが、ラギング鎖ではDNAポリメラーゼ α がDNA鎖の合成をはじめるので、ラギング鎖の長さを考慮するとラギング鎖の1/4~1/3を合成していることになる。一方、DNAポリメラーゼ δ およびDNAポリメラーゼ ϵ はあやまって取り込んだヌクレオチドを除く校正用のエキソヌクレアーゼ活性をもつが、DNAポリメラーゼ α はこの活性をもたない。したがって、DNAポリメラーゼ α の合成したDNA鎖の多くはDNAポリメラーゼ δ やDNAポリメラーゼ ϵ により除かれているのではないかという指摘もある。

ラギング鎖はプライマーRNAが除かれたのちDNAリガーゼにより連結される。RNAの除去には複数のステップが考えられている³²⁾。RNase HはRNA-DNAハイブリッド鎖のRNAを分解する酵素で、この酵素がプライマーRNAを除去すると考えられるが、RNase Hはリボヌクレオチドからデオキシヌクレオチドの結合部分のリボヌクレオチドを除去することができない。実際には、DNAポリメラーゼ δ がDNA合成の過程においてプライマーRNAにぶつかると、RNAを鋲型DNAからはがし、5'→3'のエキソヌクレアーゼ活性をもつフラップエンドヌクレアーゼであるFEN1がRNAの部分を含む1本鎖を除く。DNAポリメラーゼ δ によりはがされた1本鎖が長いとヘリカーゼ活性およびヌクレアーゼ活性をもつDna2が付け根の部分を切断する。これらの反応により隙間ができるならDNAポリメラーゼ δ がうめたのち、DNAリガーゼにより先行のDNA鎖と連結される。

おわりに

最近になり、真核生物における複製開始の機構の研究において大きな進展があった。それは、個々の複製タンパク質の分子機構とそれらの集合による複製の機構の解明である。今後、*in vitro* DNA複製系の構築により個々の複製タンパク質の分子機能は急速に解明されていくものと思われる。現在はまだ酵母を主体としたものであるが、基本的な機構はヒトを含む多細胞生物でも似ており、多細胞

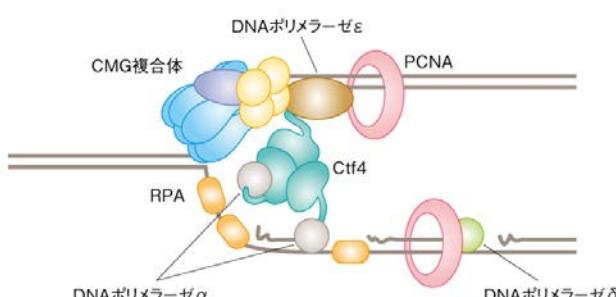


図4 複製フォークにおけるDNAポリメラーゼの反応

生物における分子機構の解明も近いことを期待している。一方で、染色体DNAの複製にともない起こる反応、たとえば、複製の際のクロマチン構造の維持、染色体分配に必要なコヒーレンスのロードなどと複製との関係は今後の課題である。

文 献

- 1) Li, H. & Stillman, B.: The origin recognition complex: a biochemical and structural view. *Subcell. Biochem.*, 62, 37-58 (2012)
- 2) Sun, J., Yuan, Z., Stillman, B. et al.: Structure and function studies of replication factors. *in* The Initiation of DNA Replication in Eukaryotes (Kaplan, D. L. ed.), pp.427-441, Springer, Cham (2016)
- 3) Bleichert, F., Botchan, M. R. & Berger, J. M.: Crystal structure of the eukaryotic origin recognition complex. *Nature*, 519, 321-326 (2015)
- 4) Raghuraman, M. K. & Liachko, I.: Sequence determinants of yeast replication origins. *in* The Initiation of DNA Replication in Eukaryotes (Kaplan, D. L. ed.), pp.123-141, Springer, Cham (2016)
- 5) Hoggard, T. & Fox, C. A.: The origin recognition complex in the initiation of DNA replication. *in* The Initiation of DNA Replication in Eukaryotes (Kaplan, D. L. ed.), pp.159-188, Springer, Cham (2016)
- 6) Leonard, A. C. & Mechali, M.: DNA replication origins. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5, a010116 (2013)
- 7) Muller, P., Park, S., Shor, E. et al.: The conserved bromo-adjacent homology domain of yeast Orc1 functions in the selection of DNA replication origins within chromatin. *Genes Dev.*, 24, 1418-1433 (2010)
- 8) Li, N., Zhai, Y., Zhang, Y. et al.: Structure of the eukaryotic MCM complex at 3.8 Å. *Nature*, 524, 186-191 (2015)
- 9) Ticau, S., Friedman, L. J., Ivica, N. A. et al.: Single-molecule studies of origin licensing reveal mechanisms ensuring bidirectional helicase loading. *Cell*, 161, 513-525 (2015)
- 10) Frigola, J., Remus, D., Mehanna, A. et al.: ATPase-dependent quality control of DNA replication origin licensing. *Nature*, 495, 339-343 (2013)
- 11) Fernandez-Cid, A., Riera, A., Tognetti, S. et al.: An ORC/Cdc6/MCM2-7 complex is formed in a multistep reaction to serve as a platform for MCM double-hexamer assembly. *Mol. Cell*, 50, 577-588 (2013)
- 12) Deegan, T. D., Yeeles, J. T. & Diffley, J. F.: Phosphopeptide binding by Sld3 links Dbf4-dependent kinase to MCM replicative helicase activation. *EMBO J.*, 35, 961-973 (2016)
- 13) Itou, H., Shirakihara, Y. & Araki, H.: The quaternary structure of the eukaryotic DNA replication proteins Sld7 and Sld3. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, 71, 1649-1656 (2015)
- 14) Itou, H., Muramatsu, S., Shirakihara, Y. et al.: Crystal structure of the homology domain of the eukaryotic DNA replication proteins Sld3/Treslin. *Structure*, 22, 1341-1347 (2014)
- 15) Kamimura, Y., Tak, Y. S., Sugino, A. et al.: Sld3, which interacts with Cdc45 (Sld4), functions for chromosomal DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 20, 2097-2107 (2001)
- 16) Tanaka, T., Umemori, T., Endo, S. et al.: Sld7, an Sld3-associated protein required for efficient chromosomal DNA replication in budding yeast. *EMBO J.*, 30, 2019-2030 (2011)
- 17) Tanaka, S. & Araki, H.: Role of CDK in replication initiation. *in* The Initiation of DNA Replication in Eukaryotes (Kaplan, D. L. ed.), pp.263-278, Springer, Cham (2016)
- 18) Moyer, S. E., Lewis, P. W. & Botchan, M. R.: Isolation of the Cdc45/Mcm2-7/GINS (CMG) complex, a candidate for the eukaryotic DNA replication fork helicase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 10236-10241 (2006)
- 19) Muramatsu, S., Hirai, K., Tak, Y. S. et al.: CDK-dependent complex formation between replication proteins Dpb11, Sld2, Pol ε, and GINS in budding yeast. *Genes Dev.*, 24, 602-612 (2010)
- 20) Sansam, C. L., Cruz, N. M., Danielian, P. S. et al.: A vertebrate gene, *ticrr*, is an essential checkpoint and replication regulator. *Genes Dev.*, 24, 183-194 (2010)
- 21) Kumagai, A., Shevchenko, A., Shevchenko, A. et al.: Treslin collaborates with TopBP1 in triggering the initiation of DNA replication. *Cell*, 140, 349-359 (2010)
- 22) Boos, D., Yekezare, M. & Diffley, J. F.: Identification of a heteromeric complex that promotes DNA replication origin firing in human cells. *Science*, 340, 981-984 (2013)
- 23) Yeeles, J. T., Deegan, T. D., Janska, A. et al.: Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature*, 519, 431-435 (2015)
- 24) Abid Ali, F., Renault, L., Gannon, J. et al.: Cryo-EM structures of the eukaryotic replicative helicase bound to a translocation substrate. *Nat. Commun.*, 7, 10708 (2016)
- 25) Yuan, Z., Bai, L., Sun, J. et al.: Structure of the

eukaryotic replicative CMG helicase suggests a pumpjack motion for translocation. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 23, 217-224 (2016)

26) Araki, H.: Molecular mechanism of DNA replication. in *DNA Replication, Recombination, and Repair: Molecular Mechanisms and Pathology* (Hanaoka, F. & Sugasawa, K. eds.), pp.3-22, Springer, Tokyo (2016)

27) Simon, A. C., Zhou, J. C., Perera, R. L. et al.: A Ctf4 trimer couples the CMG helicase to DNA polymerase α in the eukaryotic replisome. *Nature*, 1-18 (2014)

28) Sengupta, S., van Deursen, F., de Piccoli, G. et al.: Dpb2 integrates the leading-strand DNA polymerase into the eukaryotic replisome. *Curr. Biol.*, 23, 543-552 (2013)

29) Hedglin, M., Kumar, R. & Benkovic, S. J.: Replication clamps and clamp loaders. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5, a010165 (2013)

30) Burgers, P. M., Gordenin, D. & Kunkel, T. A.: Who is leading the replication fork, Pol ϵ or Pol δ ? *Mol. Cell*, 61, 492-493 (2016)

31) Smith, D. J. & Whitehouse, I.: Intrinsic coupling of

lagging-strand synthesis to chromatin assembly. *Nature*, 483, 434-438 (2012)

32) Balakrishnan, L. & Bambara, R. A.: Okazaki fragment metabolism. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 5, a010173 (2013)

著者プロフィール

荒木 弘之 (Hiroyuki Araki)

略歴: 1982 年 大阪大学大学院理学研究科 修了, 同年 大阪大学工学部 助手, 1988 年～1990 年 米国 NIH National Institute of Environmental Health Sciences にて Visiting Associate, 1992 年 大阪大学微生物病研究所助教授を経て, 1998 年より国立遺伝学研究所 教授.

研究テーマ: 染色体 DNA の複製の機構に興味をもち, 酵母を用いて研究を進めてきた. 現在は, 複製のみならず, 複製とともに染色体において起こる反応にも興味を広げ, 複製との関係を基礎に解析を進めている.

研究室 URL : <https://www.nig.ac.jp/labs/MicGen/>

© 2016 荒木 弘之 Licensed under a Creative Commons 表示 2.1 日本 License