

## 細胞周期進行の制御機構の解明

## Cell Cycle control mechanism

塩見泰史・西谷秀男  
Shiomi, Y., Nishitani, H.

細胞周期において、染色体 DNA が正確に一度だけ複製されたのち均等に分配されることにより遺伝情報が維持される。また、細胞増殖の過程においてエピジェネティックな情報を維持するため DNA 複製に伴うクロマチン形成も正確に遂行されなければならない。我々は、このような遺伝情報の維持継承の基本となる制御機構を明らかにするため、染色体の複製を“一回のみ”に制御する機構（ライセンス化制御）について、ライセンス化因子 Cdt1 の制御機構の解析を中心に行なってきた。現在、引き続き Cdt1 の分解に関わる機構とその安定化機構、さらに、新規に見いだしたクロマチンの複製時に機能する諸因子の足場となる PCNA を制御する新規因子 Elg1 について研究を展開している。

## 1) Cdt1 の分解に関わる CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの解析

DNA 複製のライセンス化因子 Cdt1 は S 期開始後、2 種のユビキチンリガーゼ CRL1-Skp2 と CRL4-Cdt2 によりユビキチン化を受け速やかに分解される。これは、染色体の再複製の抑制に深く関わっている。CRL4-Cdt2 による Cdt1 の分解はクロマチンに結合した PCNA に依存しており、UV 損傷によっても誘導される。この過程を生化学的に解析するために、精製タンパク質を用いて、クロマチンに結合した PCNA 上での Cdt1 および CRL4-Cdt2 の集積を調べた。これまでの知見とは異なり、CRL4-Cdt2 は基質である Cdt1 が無くても PCNA に結合することを見いだした。また、CRL4-Cdt2 のみにより分解される Cdt1 を用いて、細胞周期での分解の様子を調べた。CRL4-Cdt2 による分解系は、S 期終了後の G2 期には作動せず、さらに UV 照射による DNA 損傷を誘導しても抑制される傾向が見られ、G2 期以降 CRL4-Cdt2 は作動しないように制御されていると考えられた。

## 2) Cdt1 の M 期安定化機構

Cdt1 は本来、DNA 複製のためのライセンス化（DNA ヘリカーゼである MCM2-7 のクロマチン経のローディングに対応）に必須な因子として同定されたが、M 期において染色体整列と分配のためにも機能することが報告されている。Cdt1 は、上記 2 種類のユビキチンリガーゼにより S 期開始後速やかに分解されるが、M 期開始以降、Cdt1 は安定に存在する。Cdt1 はサイクリン A によりリン酸化され、そこを CRL1-Skp2 が認識する。CRL1-Skp2 は M 期でも働いているが、Cdt1 は M 期に特異的なリン酸化を受けることにより、この分解から免れていると考えている。これを確かめるため、リン酸化ペプチド抗体を作成し、Cdt1 のサイクリン A 結合部位近傍に M 期特異的にリン酸化が起こることを明らかにした。また、S 期 Cdt1 に対して M 期 Cdt1 はサイクリン A との結合が低下していること

を確認した。

### 3) 新規の PCNA 制御因子 Elg1 の解析

CRL4-Cdt2 による Cdt1 分解にはクロマチン結合した PCNA が要求される。PCNA のクロマチン結合を制御するのが RFC 複合体ファミリーで、真核生物では3種存在する。これまでの解析で、複製時と UV 照射時の Cdt1 分解にはそれぞれ、Ctf18-RFC と RFC1-RFC が PCNA のクロマチン結合と CRL4-Cdt2 の機能の制御を行っていることを示してきた。この解析過程において、もう一つの RFC 複合体、Elg1-RFC が PCNA のクロマチンからの除去を行っていることが示唆された。RNAi によりヒト細胞内 Elg1 をノックダウンすると、クロマチン結合 PCNA が過剰になり、細胞周期 S 期の遅延、間期核内クロマチン構造や分裂期染色体構造の異常が見られた。したがって、Elg1-RFC は PCNA のクロマチンからの除去を行うことによって、ゲノムの恒常性維持に大きく寄与することが明らかとなった。以上より、Elg1-RFC は CRL4-Cdt2 の機能を負に制御することにも関与すると考えられ、今後、CRL4-Cdt2 の機能経路における Elg1-RFC の役割についても明らかにしていきたいと考えている。

## 発表論文 List of Publications

- 1 Akiyo Hayashi, Yasushi Shiomi, Tatsuro S. Takahashi, Hideo Nishitani  
In vitro analysis of DNA-bound PCNA dependent ubiquitin ligase CRL4-Cdt2  
Cold Spring Harbor Laboratory Meeting “Eukaryotic DNA replication and genome maintenance” 2015 年 9 月 1-5 日、Cold Spring Harbor Laboratory (New York, USA)
- 2 北詰麻衣・熊田岸ちひろ・村上裕輔・前田武志・塩見泰史・西谷秀男 DNA複製ライセンス化因子 Cdt1 のリン酸化による M 期安定化機構の解析 第 38 回 日本分子生物学会年会  
2015 年 12 月 1 日- 4 日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 3 見谷駿治・貫名康平・森野公之・塩見泰史・西谷秀男 DNA複製時に機能する PCNA 依存性 ユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 の細胞周期制御 第 38 回 日本分子生物学会年会  
2015 年 12 月 1 日- 4 日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 4 中村知史 (神戸大・バイオシグナル)・村上浩一 (神戸大・バイオシグナル)・松田俊 (京都大・院工)・松田知成 (京都大・院工)・上原芳彦 (東北大・院医)・小野哲也 (東北大・院医)・西谷秀男・菅澤薫 (神戸大・バイオシグナル)  
塩基除去修復因子チミン DNA グリコシラーゼの構造活性相関と機能制御 第 38 回 日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 1 日- 4 日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 5 塩見泰史・西谷秀男 PCNA アンローダー、Elg1-RFC の細胞内および生化的機能の解析 第 38 回 日本分子生物学会年会 2015 年 12 月 1 日- 4 日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

## 大学院生命理学研究科

博士後期課程

林 晃世 : CRL4-Cdt2 の in vitro ユビキチン化反応系の構築

博士課程 (5 年一貫)

貫名 康平 : Functional analysis of substrate recognition subunit Cdt2 of ubiquitin ligase CRL4-Cdt2

Muadz Bin Ahmad Mazian : Mechanism and cell cycle control of Cdt1 proteolysis by ubiquitin ligase CRL4-Cdt2

博士前期課程

北詰 麻衣 : Cdt1 の M 期安定化機構

## 科学研究費補助金等

- 1 文部科学省研究費補助金（平成 27 年度）基盤研究（B） 課題番号：26291025  
研究課題 PCNA サイクルと連動したタンパク質分解による複製制御  
研究代表者 西谷秀男 分担者 塩見泰史
- 2 文部科学省研究費補助金（平成 27 年度）挑戦的萌芽研究 課題番号：26650064  
研究課題 スピンドルチェックポイントと共役した複製開始制御  
研究代表者 西谷秀男
- 3 文部科学省研究費補助金（平成 27 年度） 基盤研究(C) 課題番号：25430171  
研究課題 新規な PCNA アンロード機構による細胞周期制御とゲノム維持  
研究代表者 塩見泰史