

細胞周期進行の制御機構の解明

Cell Cycle control mechanism

西谷秀男・塩見泰史・林晃世
Nishitani, H., Shiomi, Y., Hayashi, A.

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）について解析を進めてきた。ライセンス化制御の中心的な因子である Cdt1 の分解に関わる CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの作用機構、Cdt1 の M 期安定化機構、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) ライセンス化因子 Cdt1 の分解に関わる CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの解析

染色体の再複製を抑制するため、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 によりポリユビキチン化を受け速やかに分解される。CRL4-Cdt2 の機能はクロマチンに結合した PCNA に依存しており、PCNA に結合した Cdt1 を始めとする基質を認識する。また、紫外線などによる DNA 損傷によっても誘導される。我々は、前年度、精製タンパク質を用いて、CRL4-Cdt2 は基質が無くても PCNA に結合することを報告した。Cdt2 の PCNA 結合部位を探索し、Cdt2 の C 末端に PCNA 結合モチーフ（PIP ボックス）が存在することを見出した。PIP ボックスに変異を導入した Cdt2 は、PCNA に結合できないことを細胞内での発現及び精製タンパク質を用いて明らかにした。また、Cdt2 の C 末に存在する 18 箇所の CDK リン酸化予想部位に変異を導入すると、S 期以降から M 期に見られるリン酸化を抑制することができた。これらの知見は、Cdt2 の C 末側は CRL4-Cdt2 の制御に深く関わっていると示唆しており、その機能解析を続けている。一方、紫外線照射後の Cdt1 分解の過程において、これまでヌクレオチド除去修復に関わることを報告した。さらに、ミスマッチ修復系も寄与することを見出した。この修復系は、通常、S 期における DNA 複製の際に生じるミスマッチの修復に関わるが、Cdt1 の分解は G1 期に起こる事象なので、ミスマッチ修復タンパク質の別の作用機構を示唆している。

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、新たに M 期において染色体整列と分配

においても機能することが報告されている。CRL4-Cdt2によるCdt1の分解系は、S期終了後にPCNAがクロマチンから外れるので作動しなくなるが、サイクリンA-CDKによるリン酸化に依存したCRL1-Skp2はM期でも作動している。M期開始以降、Cdt1は安定に存在し、M期のCdt1は、S期と異なりサイクリンAとの結合が低下していることを見いだしていた。この結合の低下がM期Cdt1に特異的に起こることを、さらにM期及びS期から免疫沈降して精製したCdt1と精製サイクリンA-CDKを混ぜて結合実験を行うことにより確認した。

3) PCNA制御因子RFC複合体ファミリーの解析

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のクロマチン結合だけでなく、CRL4-Cdt2の機能を正に制御していることを示してきた。この解析過程においては、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特異的に行っていることが示された。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。このことから、Elg1-RFCはPCNAのクロマチンからの除去を積極的に行うことで、ゲノムの恒常性維持に大きく寄与することが示唆された。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る。今後は、細胞周期進行に伴ってCRL4-Cdt2の機能を正負に制御するRFC複合体ファミリーの使い分けや、機能の連係について明らかにしていきたいと考えている。

発表論文 List of Publications

- 1 Shiomi Y, Nishitani H. Control of Genome Integrity by RFC Complexes; Conductors of PCNA Loading onto and Unloading from Chromatin during DNA Replication. *Genes (Basel)*. 2017 Jan 26;8(2). pii: E52. doi: 10.3390/genes8020052. Review.
- 2 Tanaka M, Takahara M, Nukina K, Hayashi A, Sakai W (神戸大・バイオシグナル), Sugasawa K (神戸大・バイオシグナル), Shiomi Y, Nishitani H. Mismatch repair proteins recruited to ultraviolet light-damaged sites lead to degradation of licensing factor Cdt1 in the G1 phase. *Cell Cycle*. 2017 Apr 3;16(7):673-684. doi: 10.1080/15384101.2017.1295179. Epub 2017 Feb 22.
- 3 Akiyo Hayashi, Naohiro Suenaga, Michiyo Takahara, Takashi Ishii, Yasushi Shiomi, Hideo Nishitani. Direct binding between PCNA and E3 ligase CRL4Cdt2 supports substrate targeting, and subsequent proteolysis during DNA replication. *Grad. Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo*. 10th 3R International Symposium, Matsue, Japan. Nov.13-17, 2016
- 4 林晃世、高原 教代、末永尚弘、石井健士、高橋達郎(九州大学、理)、塩見 泰史、西谷 秀男 ゲノム複製を制御するユビキチンリガーゼCRL4-Cdt2のPIPボックスの役割__試験管内解析 第39回日本分子生物学会年会 2016年11月30日-12月2日 パシフィコ横浜(神奈川県)

- 5 高原教代、末永尚弘、石井健士、林晃世、塩見泰史、西谷秀男 ゲノム複製を制御するユビキチンリガーゼCRL4-Cdt2のPIPボックスの役割__細胞での解析 第39回 日本分子生物学会年会 2016年11月30日-12月2日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
- 6 貫名康平、塩見泰史、西谷秀男 E3ユビキチンリガーゼCRL4Cdt2の基質認識サブユニットCdt2のリン酸化による制御の解析 第39回 日本分子生物学会年会 2016年11月30日-12月2日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
- 7 北詰麻衣、熊田ちひろ、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はM期にリン酸化され、分解から保護される 第39回 日本分子生物学会年会 2016年11月30日-12月2日 パシフィコ横浜 (神奈川県)
- 8 丹伊田浩行、松沼亮一、堀口涼、内田千晴、酒井聡、大畑樹也、北川恭子、森脇真一 (大阪医科大学)、西谷秀男、宇井彩子 (聖マリアンナ医科大学)、荻朋男 (名古屋大学)、北川雅俊 (浜松医科大学) DDB2依存的なHB01のリクルートはヌクレオチド除去修復に必須である、第39回 日本分子生物学会年会 2016年11月30日-12月2日 パシフィコ横浜 (神奈川県)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 荻野寛行 : ユビキチンリガーゼCRL4-Cdt2の基質認識サブユニットCdt2の機能解析
- 北詰麻衣 : ライセンス化因子Cdt1のM期における安定化と機能

5年一貫制博士課程

- 貫名康平 : Function 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

科学研究費補助金等

- 1 文部科学省研究費補助金 (平成 28 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 28 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 28 年度) 基盤研究(C) 課題番号 : 16K07257
研究課題 DNA からの PCNA クリアランス機構の多様性の解析
研究代表者 塩見泰史
- 4 大学共同利用機関法人情報・システム研究機構国立遺伝学研究所共同研究 (平成 28 年度)
研究課題 AID 法によるコンディショナル変異ヒト細胞を用いた Elg1-RFC の機能解析
研究代表者 塩見泰史