

細胞周期におけるゲノム維持機構の解明

Cell Cycle control on genome maintenance

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の解析として染色体の複製を“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 期における新規機能、そして、クロマチン複製時に機能する DNA ポリメラーゼや CRL4-Cdt2 などの諸因子の足場となる PCNA の機能を、正に負に制御する RFC 複合体について研究を展開している。

1) CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼのリン酸化による制御機構の解析

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 (Set8, p21, TDG など) を認識する。また、紫外線などによる DNA 損傷によっても分解が誘導される。ヒト細胞において Cdt2 のリン酸化状態が細胞周期において大きく変化する。G1 期は低リン酸化状態であるが、S 期からリン酸化され M 期に最もリン酸化される。このリン酸化に細胞周期進行を制御する CDK が関与すると考え、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し解析を進めた。変異型 Cdt2-18A では、S 期以降から M 期に見られるリン酸化が抑制された。そして、この変異 Cdt2-18A は、PCNA と強く結合し、ユビキチン化活性が向上することが分かった。その結果、S 期後期から G2 期に本来蓄積し始める Set8 や TDG タンパク質の蓄積が抑制された。また、精製タンパク質を用いて、Cdt2 がサイクリン A-Cdk2、サイクリン B-Cdk2 でリン酸化されることを確認した。よって、CRL4-Cdt2 は、CDK によるリン酸化により PCNA との結合が低下することにより負に制御されていると結論した。

2) Cdt1 の M 期機能の解析

Cdt1 は、G1 期において DNA 複製のためのライセンス化 (DNA ヘリカーゼである MCM2-7 のクロマチンへのローディングに対応) に必須な因子として同定したが、近年、新たに M 期において染色体整列と分配にも機能することが報告された。そこで、Cdt1 をノックダウンした細胞をタイムラプ

スで観察したところ、M 期初期から中期までの過程が遅延することを見出した。これらの細胞では、紡錘体の広がりや未整列の染色体の増加が認められた。M 期進行過程での Cdt1 の局在を免疫染色法によって詳細に調べたところ、中心体近傍の紡錘体やキネトコアを染色する抗体が確認されたが、今後は別の手法で詳細な解析が必要である。Cdt1 をノックダウンした細胞では M 期中期以降は影響なく進行したことから、Cdt1 は、M 期初期から中期にかけて、紡錘体形成や染色体整列に重要な役割を担っていると考えている。

3) PCNA 制御因子、RFC 複合体ファミリーの解析

ゲノム維持の過程では、複製をはじめとして修復や組換えの反応に DNA 結合した PCNA が要求される。PCNA の DNA 結合と除去を行うのが RFC 複合体ファミリーである。これまでの解析で、RFC1-RFC と Ctf18-RFC が PCNA の DNA 結合を担っており、PCNA に結合する因子の DNA 集合とその反応促進を制御している事が明らかにされている。もう一つの RFC 複合体、Elg1-RFC についてはこれまでにその生化学的機能は不明であったが、PCNA の DNA からの除去を特異的に行っていることが私たちの解析から明らかになった。ヒト細胞内 Elg1 をノックダウン(KD)すると、細胞周期 S 期における過剰なクロマチン結合 PCNA と周期進行の遅延が見られ、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、PCNA の DNA 結合だけでなく、積極的な PCNA 除去もゲノム維持に重要な役割を果たしていることを示した。

しかし、その解析過程では、Elg1-KD 細胞でも G2 から M 期にかけては PCNA が DNA から除去されることが明らかとなった。また、CRISPR/Cas9 法で Elg1 ノックアウト(KO)細胞を作成しても、細胞周期の進行が遅延するのを除けば正常に生育した。これらは、Elg1-RFC が唯一の PCNA 除去因子ではないことを示唆している。そこで現在は、未知の PCNA 除去機構を探索し、これに関わる PCNA 除去因子のゲノム維持や細胞恒常性への寄与を明らかにしていきたいと考えている。

発表論文 List of Publications

1 Nakamura T (神戸大), Murakami K (神戸大), Tada H (神戸大), Uehara Y (東北大), Nogami J (九州大), Maehara K (九州大), Ohkawa Y (九州大), Saitoh H (熊本大), Nishitani H, Ono T (東北大), Nishi R (神戸大), Yokoi M (神戸大), Sakai W (神戸大), Sugawara K (神戸大) : Thymine DNA glycosylase modulates DNA damage response and gene expression by base excision repair-dependent and independent mechanisms. *Genes Cells*. 2017 Apr;22(4):392-405. doi: 10.1111/gtc.12481.

2 Niida H (浜松医科大), Matsunuma R (浜松医科大), Horiguchi R (浜松医科大), Uchida C (浜松医科大), Nakazawa Y (長崎大), Motegi A (京都大), Nishimoto K (浜松医科大), Sakai S (浜松医科大), Ohhata T (浜松医科大), Kitagawa K (浜松医科大), Moriwaki S (大阪医科大), Nishitani H, Ui A (聖マリアンナ医科大), Ogi T (名古屋大), Kitagawa M (浜松医科大) : Phosphorylated HBO1 at UV irradiated sites is essential for nucleotide excision repair *Nat Commun*. 2017 Jul 18;8:16102. doi: 10.1038/ncomms16102.

3 Nukina K, Hayashi A, Shiomi Y, Sugawara K (神戸大), Ohtsubo M (別府大), Nishitani H. : Mutations

at multiple CDK-phosphorylation consensus sites on Cdt2 increase the affinity of CRL4^{Cdt2} for PCNA and its ubiquitination activity in S phase. *Genes Cells*. 2018 Mar;23(3):200-213. doi: 10.1111/gtc.12563.

- 4 塩見 泰史、夏目 豊彰(遺伝研)、鐘巻 将人(遺伝研)、西谷 秀男：Elg1-RFCによるPCNAアンロードと連係した細胞内機能の解析 第24回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2017年11月27日-29日 長良川国際会議場 (岐阜県)
- 5 羽多野達也、前田武志、村上裕輔、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：DNA複製ライセンス化因子Cdt1のM期における機能の解析 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 6 根岸泰明 (関西学院大学)、荒木啓吾 (関西学院大学)、西谷秀男、大谷清 (関西学院大学)：転写因子E2F1のN末端領域に対する新規相互作用因子WDR1の機能解析 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 7 高原教代、田中美如、貫名康平、林晃世、酒井恒、菅澤薫 (神戸大)、塩見泰史、西谷秀男：紫外線照射によるG1期CRL4Cdt2の活性化におけるミスマッチ修復系の関与 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 8 荻野寛行、植田麻紗子、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：Cdt2-PCNA融合体は CRL4Cdt2の抑制制御を損なう 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 9 貫名康平、塩見泰史、西谷秀男：ゲノム維持に関わる E3ユビキチンリガーゼCRL4-Cdt2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 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 10 林晃世、石井健士、末永尚弘、高原教代、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はPCNAと直接結合して機能する 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 11 塩見泰史、織田里美、佐藤護、夏目豊彰(遺伝研)、鐘巻将人(遺伝研)、西谷秀男：RFC複合体によるDNAへのPCNA着脱と連係した細胞内機能の解析 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日-9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)
- 12 林晃世、石井健士、末永尚弘、高原教代、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はPCNAと直接結合して働く 第35回染色体ワークショップ第16回核ダイナミクス研究会 2017年12月20日-22日 (愛知県)
- 13 羽田野達也、前田武志、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：DNA複製ライセンス化因子Cdt1のM期における機能の解析 第35回染色体ワークショップ第16回核ダイナミクス研究会 2017年12月20日-22日 (愛知県)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

羽田野達也：ライセンス化因子 Cdt1 の M 期における機能

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

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 29 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 29 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