

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。現在、1) 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、2) Cdt1 の M 期染色体分配における新規機能、そして、3) 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制御機構の解析

DNA 複製のライセンス化因子 Cdt1 は、DNA ヘリカーゼである MCM2-7 のクロマチンローディングを担う因子である。一方、S 期が開始すると、染色体の再複製を抑制するため Cdt1 はポリユビキチン化を受け速やかに分解される。クロマチンにロードされた PCNA に Cdt1 が PIP ボックスを介して結合すると、E3 ユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 が認識してポリユビキチン化する。また、紫外線などによる DNA 損傷によっても同様の機構で Cdt1 の分解が誘導される。しかし、S 期 DNA 複製あるいは DNA 損傷修復が行われる場合のみに、かつ迅速に分解される機構はよく分かっていない。我々は、Cdt2 の C 末側の解析により、この領域が DNA 結合活性を持ち、さらに C 末端に PIP ボックスが存在し、これらが迅速な Cdt1 分解に必要であることを発表した。Cdt2C 末端の PIP ボックスに変異を導入すると、PCNA 局在部位への CRL4-Cdt2 の集積が遅れ Cdt1 の分解の遅延が見られた。また、CRL4-Cdt2 は PIP ボックスを介して直接 DNA にロードされた PCNA に結合することを示した。一方、C 末端の 460-580 アミノ酸領域が DNA 結合能を持ち、この領域を欠失した Cdt2 を発現した細部では、Cdt1 の分解が低下することを見出した。これらの結果より、CRL4-Cdt2 は、DNA 上で直接 PCNA と結合して待機し、リクルートされた Cdt1 を捉えて迅速にユビキチン化すると考えられる。この時、Cdt2 の DNA 結合領域が安定な PCNA-基質(Cdt1)-E3(CRL4-Cdt2)複合体の形成、あるいはユビキチン化活性を亢進することにより、DNA 上に PCNA がロードされた時のみ機能するように制御されていると考えられる。その分子機構の詳細は、今後の解析が必要である。

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。そこで、酵母2ハイブリッドスクリーニングで Cdt1 との結合性が予測された TACC3 との関連を調べた。TACC3 は、M期の前-中期において微小管の束化を促進し紡錘体の形成に関わる。高発現した場合、TACC3 と Cdt1 の共沈が見られた。続いて、PLA(proximity ligation assay) により TACC3 と Cdt1 の結合を調べると、両者の結合を示すドット上のシグナルが見られた。その数はM期前/中期において増加し、紡錘体上に局在するものが多く観察された。Cdt1 が TACC3 を通してM期進行に寄与する可能性が示唆された。

3) PCNA を制御する、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、RFC1-RFC と Ctf18-RFC が PCNA の DNA 結合を担っており、DNA 上で反応する因子の PCNA への集束と、その機能を制御する事が明らかになっている。一方、もう一つの RFC 複合体である Elg1-RFC については、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示された。ヒト細胞内の Elg1 をノックダウン(KD)すると、複製期の DNA に過剰に結合した PCNA や細胞周期進行の遅延、核内クロマチン構造や染色体構造の異常が見られた。以上のことから、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が明らかになった。

そこで、さらに詳細な Elg1-RFC による PCNA 除去を明らかにするため、Elg1-RFC に特異的な結合因子の探索を質量分析で行い解析を進めている。また、これまでに、Elg1-KD 細胞でも複製が終了した G2 から M 期にかけては PCNA が DNA から除去されることが分かった。これは、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、未知の PCNA 除去機構を探索し、新規 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 Wright GSA (Liverpool 大), Saeki A, Hikima T (理研), Nishizono Y, Hisano T (理研), Kamaya M, Nukina K, Nishitani H, Nakamura H (理研), Yamamoto M (理研), Antonyuk SV (Liverpool 大), Hasnain SS, Shiro Y, Sawai H. : Architecture of the complete oxygen-sensing FixL-FixJ two-component signal transduction system. *Sci Signal*. 2018 Apr 10;11(525). pii: eaaq0825. doi: 10.1126/scisignal.aaq0825.
- 2 Hayashi A, Giakoumakis NN (Patras 大), Heidebrecht T(Netherlands Cancer Institute), Ishii T, Panagopoulos A(Patras 大), Caillat C(Netherlands Cancer Institute), Takahara M, Hibbert RG(Netherlands Cancer Institute), Suenaga N, Stadnik-Spiewak M(Netherlands Cancer Institute), Takahashi T (九州大), Shiomi Y, Taraviras S (Patras 大), von Castelmur E, Lygerou Z(Patras 大), Perrakis A(Netherlands Cancer Institute), Nishitani H.: Direct binding of Cdt2 to PCNA is important for targeting the CRL4^{Cdt2} E3 ligase activity to Cdt1. *Life Sci Alliance*. 2018 Dec 31;1(6):e201800238. doi: 10.26508/lsa.201800238.
- 3 Mazian M, Suenaga N, Ishii T, Hayashi A, Shiomi Y, Nishitani H.: A DNA-binding domain in the C-terminal region of Cdt2 enhances the DNA synthesis-coupled CRL4^{Cdt2} ubiquitin ligase activity for Cdt1. *J Biochem*. 2019 Jan 12. doi: 10.1093/jb/mvz001.

- 4 松井作仁（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 GTF2H2の機能解析 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日-30日 パシフィコ横浜
- 5 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：クロマチンからの PCNA除去と、それに連係した細胞内機能の解析 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日-30日 パシフィコ横浜
- 6 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41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日-30日 パシフィコ横浜
- 7 林晃世、遠藤浩太郎、塩見泰史、西谷秀男：DNA再複製に伴う細胞応答の解析（DNA再複製と中心体複製の連係について）第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日-30日 パシフィコ横浜
- 8 Mazian MA, Takahara M, Hayashi A, Shiomi Y, Nishitani H : Control of Cdt1 proteolysis by ubiquitinligase CRL4Cdt2; role of C-terminus of Cdt2 第41回日本分子生物学会年会 2018年11月28日-30日 パシフィコ横浜
- 9 Mazian M, Nukina K, Suenaga N, Ishii T, Hayashi A, Shiomi Y, Nishitani H: The C-terminal region of Cdt2 regulates the PCNA-dependent CRL4-Cdt2 ubiquitin ligase activity. The 11th 3R & 3C Symposium November 12-16, 2018, Kanazawa city, Japan
- 10 西谷秀男、林晃世、遠藤浩太郎、渡邊雄一郎、塩見泰史：DNA の再複製に伴うサイズの増加と細胞応答 サイズ生物学 ワークショップ 2019平成31年3月19日—20日 海峡メッセ（山口県）

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

5年一貫制博士課程

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30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
- 2 平成30年度 熊本大学発生医学研究所共同研究
研究課題 PCNA ユビキチン化酵素Rad6-Rad18 とCRL4-Cdt2 のクロストークによるゲノム維持機構
研究代表者：西谷秀男、研究分担者：林晃世
- 3 平成30年度 神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究 共同研究（若手）
研究課題 ゲノム維持に関わる CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの作動メカニズムの解明
研究代表者：林晃

- 4 平成30年度 兵庫県立大学特別研究助成金 若手研究者支援
研究課題 DNA 再複製に伴う細胞内応答の解析
研究代表者：林晃世