

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、このような遺伝に関わる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) 再複製の過程と細胞応答、そして、3) ゲノムの維持と制御に必須な PCNA の機能を正に負に制御する、RFC 複合体ファミリー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に Cdt1 は速やかに分解される。この時に働くのが CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼで、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。我々は、Cdt2 の C 末領域がクロマチンにロードされた PCNA による Cdt1 分解を制御することを明らかにしてきた。今回、クロマチン上の PCNA に Cdt1 および Cdt2 (CRL4 との複合体として)がリクルートされる様子をライブイメージングにて解析を始めた。PCNA-GFP を発現する安定細胞に局所的に紫外線を照射して、照射部位に PCNA が蓄積することを確認した。Cdt1-GFP も蓄積するが徐々に核内の Cdt1-GFP シグナルが低下し、30 分程度で全ての Cdt1 が分解されることを捉えることができた。今後、Cdt2(野生型)-mCherry あるいは Cdt2(C 末側変異体)-mCherry 発現細胞を作成して観察を進める。

2) 再複製の過程の解析

細胞を Cullin ファミリーユビキチンリガーゼの Nedd8 化阻害剤である MLN4924 で処理すると、通常分解されるはずのライセンス化因子 Cdt1 が蓄積し、DNA の過剰な複製が起こる。このときの DNA 合成がどのように行われるのか調べるために、EGFP を融合させた PCNA を安定的に発現する細胞で PCNA を観察した。再複製によるパターンを観察すると通常時より PCNA foci が小さく、数が多く、また、核内全体にわたり偏りなく存在していた。この foci のパターンが再複製誘導後のいつ頃現れるのか調べると、再複製誘導後 24 時間後からこのパターンが観察された。同様の様子を、Cdt2 をノックダウンして再複製を誘導した細胞でも観察した。以上の結果より、再複製誘導時の DNA 複

製は、通常時のS期複製プログラムから外れ、DNA合成が行われていると考えられた。

3) PCNAを制御するRFC複合体ファミリー、および、新規機能因子の解析

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への集合と、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。

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 Panagopoulos A (Patras 大), Taraviras S (Patras 大), Nishitani H, Lygerou Z (Patras 大):
CRL4^{Cdt2}: Coupling Genome Stability to Ubiquitination. Trends Cell Biol. 2020
Apr;30(4):290-302. doi: 10.1016/j.tcb.2020.01.005.
- 2 塩見 泰史、西谷 秀男 ヒト細胞におけるDNAからのPCNA除去機構の解析 第42回DNA複製・組換え・修復ワークショップ、奈良春日野国際フォーラム、奈良市
- 3 渡邊雄一郎、林 晃世、塩見 泰史、西谷 秀男 DNA再複製誘導によるPCNA fociの核内分布の変化の解析 第42回DNA複製・組換え・修復ワークショップ、奈良春日野国際フォーラム、奈良市
- 4 塩見 泰史、林 晃世、西谷 秀男 PCNAのクロマチン結合/除去と、それに連係するゲノム維持の解析 第25回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場ほか、福岡市
- 5 渡邊雄一郎、林 晃世、高原教代、塩見 泰史、西谷 秀男 DNA再複製誘導によるPCNA fociの核内パターンの変化の解析 第25回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場ほか、福岡市
- 6 林 晃世、Mazian M、貫名 康平、海老原 溪、末永 尚弘、石井 健士、高原教代、塩見 泰史、西谷 秀男 ゲノム維持に働くCRL4-Cdt2ユビキチンリガーゼのDNA上での作動制御機構の解析 第42回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場ほか、福岡市

大学院生命理学研究科

博士前期課程

渡邊雄一郎：DNA再複製時の核内応答の解析

科学研究費補助金等

- 1 令和元年度公立大学法人兵庫県立大学特別研究助成金
研究課題 PCNA の機能制御のトリガーとなるユビキチン修飾コードの解析
研究代表者：塩見泰史
- 2 令和元年度 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：林晃世