

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て倍加したのち、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) 再複製の誘導過程の解析、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反応機構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 末領域に存在する PIP ボックス、DNA 結合領域が Cdt1 の分解を制御することを明らかにしてきた。昨年度からライブイメージング法にて解析を始め、PCNA-GFP あるいは Cdt1-GFP を発現する細胞に局所的に紫外線を照射すると、照射部位に PCNA が蓄積すること、Cdt1-GFP も蓄積するが分解されることを観察できた。そこで、Cdt2(野生型)-mCherry あるいは Cdt2(PIP ボックス変異体)-mCherry 発現細胞を作成して観察を進めた。Cdt2(野生型)は、紫外線照射部位に PCNA とほぼ同じタイミングで蓄積した。一方、Cdt2(PIP ボックス変異体)は、蓄積の低下が観測された。Cdt2(野生型)は、基質 Cdt1 が存在する G1 期および存在しない S 期においても損傷部位に同程度で集積したことから、基質の有無にかかわらず PIP ボックスにより PCNA に結合することで損傷部位に集積すると考えられた。

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ている。Cdt1 は、MLN4924 投与 3 時間後ごろから蓄積するのが観察された。DNA 量は、2C から 4C までは通常時と同じ速度で増加した。コントロール細胞では、9 時間-12 時間に M 期を経て G1 期に移行するのに対して、投与群では一度、4C 量で留まっ

た後、細胞周期再開後 9 時間で 4N 以上の細胞が現れた。この過程での、クロマチン上に結合した PCNA や MCM4 の量を調べた。コントロールでは S 期の進行・終了に伴い、クロマチン上の MCM4 は減少したのに対して、MLN4924 処理細胞では、時間とともに MCM4 量の増加が見られた。MLN4924 は MCM2-7 の unloading を阻害することを考えると、MCM2-7 が S 期において新規にクロマチンにロードされたと考えられた。一方、クロマチン上の PCNA は、通常は G2 期までに減少するのに対して、MLN4924 投与した細胞では、クロマチンからの減少は見られなかったため、再ライセンス化された複製起点から再複製が起こっていると予想された。

3) PCNA の機能を制御する反応機構の解析

ゲノム維持の過程では、複製をはじめとした修復や組換えの反応に DNA 結合した PCNA が必須であり、ゲノム維持機構で反応する因子の DNA への集合と、その反応制御に機能する。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 結合を担っている。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。

一方、Elg1-KD 細胞でも複製が終了した G2 から M 期にかけて PCNA が DNA から除去されることが示され、M 期への進行過程で機能する新規 PCNA 除去機構の存在が示唆された。これについて解析を進めると、ユビキチンリガーゼの TRAIP が PCNA 除去に寄与することがわかってきた。TRAIP 発現抑制細胞の DNA 画分では、対照細胞と比較して複製期中の PCNA 量に差はないが、M 期では PCNA が DNA から除去されなかったことから、TRAIP は M 期進行時に Elg1-RFC とは独立したタイミングで機能する因子であることがわかった。そこで現在は、TRAIP による PCNA 除去の反応機構と、それに連係したゲノム維持について解析を進めている。

発表論文 List of Publications

- 1 渡邊 雄一郎、林 晃世、高原 教代、塩見 泰史、西谷 秀男 DNA 再複製誘導による過剰な複製の開始タイミングの解析第 43 回日本分子生物学会年会 2020 年 12 月 2 日～4 日 オンライン開催
- 2 海老原 溪、日下部 将之（神戸大学）、林 晃世、塩見 泰史、菅澤 薫（神戸大学）、西谷 秀男 DNA 損傷修復において機能する CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの損傷部位集積機構の解析第 38 回染色体ワークショップ・第 19 回核ダイナミクス研究会、2021 年 1 月 16 日～21 日、オンライン開催
- 3 西谷 秀男、吉田 秀郎 特別基礎講座 生命理学に学ぶがんゲノム、第 35 回日本がん看護学会 学術集会 ポストゲノム時代のケアを先導する 2021 年 2 月 27 日～28 日

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

海老原 溪：CRL4Cdt2 ユビキチンリガーゼ活性を制御する Cdt2 のモチーフの解析

宮崎 健心：PCNA を阻害する PIP デグロンペプチドの探索

科学研究費補助金等

- 1 令和 2 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
- 2 令和 2 年度 女性研究者研究活動助成金
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活性制御機構の解析
研究代表者：林晃世
- 3 令和 2 年度 学術研究助成基金助成金 基盤研究（C）
研究課題 DNA 複製により起動する選択的タンパク質分解によるゲノム維持機構
研究代表者：西谷秀男