

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.

遺伝情報を維持するため、染色体 DNA は細胞周期において一度だけ正確に複製され倍加したのち、均等に分配される。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) 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要な 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

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 DNA 複製のライセンス化因子で、S 期が開始すると、再複製を抑制するために速やかに分解される。この時に働く CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼは、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 損傷の修復時においても同様の機構で Cdt1 の分解が誘導される。我々はこれまでに、Cdt2 の C 末領域に存在する PIP ボックス及び DNA 結合領域が Cdt1 の分解を制御することを明らかにした。Cdt2 のこれらのモチーフやドメインや基質の有無がどのように CRL4-Cdt2 の機能に関わるのかを明らかにするため、細胞に局所的に紫外線を照射し DNA 損傷部位への集積をライブイメージングにて解析している。PCNA-GFP 発現細胞に、C 末端に mCherry を融合した Cdt2 の野生型(WT)、PIP ボックス変異体(PIPm)、DNA 結合部位欠失変異体(Δ DBD)あるいは N 末のみ(N-only)を導入し解析を進めた。WT 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が、PIPm は集積速度も量も低下した。 Δ DBD では大きな変化は見られなかった。一方、N-only では集積がほとんど見られなかった。基質認識に関わる Cdt2 の N 末による損傷部位への集積効果は低く、PIP ボックスが主要な働きを行い、また DBD の効果は PIP ボックスに依存していることが示唆された。

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、通常分解されるライセンス化因子 Cdt1 が蓄積し、DNA の過剰な複製が起こる。Cdt1 は、MLN4924 投与 3 時間後ごろから蓄積する。DNA 複製部位を反映する PCNA の foci のパターン、MCM2-7 のクロマチン結合の解析から、再複製は主に、通常の S 期 DNA 合成が終了し G2 期様の過

程を経たのちに開始される傾向が認められた。再複製が起こると DNA 損傷が発生することが知られている。その一つとして H2AX のリン酸化 (γ H2AX と呼ばれている) をマーカーとして調べると、過剰複製が誘導されるのに呼応して γ H2AX が生じる様子が認められた。

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、ゲノム維持機構で機能する因子の DNA 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 発現を抑制すると、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 発現抑制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。さらに解析を進めたところ、TRAIP は S 期から M 期にかけて発現量が増加すると共に、CDK1 によるリン酸化で PIP box を介した PCNA との相互作用が安定化し、PCNA の除去に機能することが分かってきた。そこで現在は、TRAIP による PCNA 除去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 Mazian MA, Yamanishi K, Rahman MZA, Ganasen M, Nishitani H.: CRL4^{Cdt2} Ubiquitin Ligase, A Genome Caretaker Controlled by Cdt2 Binding to PCNA and DNA. *Genes (Basel)*. 2022 Jan 29;13(2):266. doi: 10.3390/genes13020266.
- 2 Nishitani H.: CRL4-Cdt2 ubiquitin ligase, a critical factor to block re-replication of chromosomal DNA and its implication as a target for anti-cancer drug development 第94回日本生化学会大会 2021年11月3-5日
- 3 塩見泰史、田所あすか、西谷秀男：細胞周期進行におけるクロマチンからのPCNA除去 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2021年10月22日(金)、23日(土)
- 4 田所あすか、西谷秀男、塩見泰史：M期進行時のPCNA除去におけるTRAIPの機能解析 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2021年10月22日(金)、23日(土)
- 5 海老原溪、日下部将之、林晃世、塩見泰史、菅澤薫、西谷秀男：ゲノム安定性維持に関わるCRL4Cdt2 ユビキチンリガーゼの損傷部位集積機構の解析 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2021年10月22日(金)、23日(土)
- 6 渡邊雄一郎、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：NEDD8 化阻害により誘導されるDNA再複製の機構 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2021年10月22日(金)、23日(土)

- 7 海老原 溪、日下部将之、林晃世、塩見泰史、菅澤薫、西谷秀男：DNA損傷修復において機能するCRL4Cdt2ユビキチンリガーゼの損傷部位集積機構のライブイメージ解析 第44回日本分子生物学会年会 2021年12月1日(水)～3日(金) パシフィコ横浜
- 8 田所 あすか、西谷 秀男、塩見 泰史：クロマチンからの複製因子除去に機能する、TRAIPの機能解析 第44回日本分子生物学会年会 2021年12月1日(水)～3日(金) パシフィコ横浜
- 9 塩見泰史、田所あすか、西谷秀男：クロマチンからのPCNA除去と、それに連係したゲノム維持の解析 第44回日本分子生物学会年会 2021年12月1日(水)～3日(金) パシフィコ横浜
- 10 塩見泰史：クロマチンからのPCNA除去機構の解析 国立遺伝学研究所研究会「染色体安定維持研究会」 2021年8月30日(月)～31日(火)

大学院生命理学研究科

博士前期課程

- 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
- 飯田康介 : 再複製に伴う細胞内 Ca²⁺ シグナルの解析
- 田所あすか : PCNA 新規除去機構における TRAIP の機能解析
- 野原 颯 : リン酸化による Cdt2 の PCNA 結合制御の解析

科学研究費補助金等

- 1 令和3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