

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) 再複製の誘導過程と細胞応答の解析、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

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 が結合するとポリユビキチン化する。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 の分解を正に制御することを明らかにした。一方、Cdt2 は S 期以降にリン酸化され M 期にピークとなる。C 末に存在する 18 ヶ所の CDK リン酸化コンセンサス配列に変異を導入すると(Cdt2(18A))、ほぼリン酸化が抑制される。このリン酸化は Cdt2 と PCNA との結合に抑制的に働く。PCNA との結合は PIP ボックスに依存したことから、リン酸化により PIP ボックスと PCNA の結合が抑制されると考えられた。そこでまず、C 末領域のみで PCNA との結合がリン酸化により制御されることを、C 末(390-730)領域の 18A 変異体にて免疫沈降し PCNA との結合が増強することで確かめた。続いて、18 ヶ所から重要な部位を同定するため、リン酸化が報告された 6 ヶ所の変異 Cdt2(6A)および PIP ボックス近傍変異 Cdt2(5A)を作成し、細胞にて発現させ、PCNA のモノユビキチン化レベルで調べると、Cdt2(18A)に比較して Cdt2(6A)および Cdt2(5A)ともモノユビキチン化レベルが半減しており、抑制的リン酸化の一部に関わると考えられた。Cdt2(6A)の安定発現細胞を確立し PCNA との結合を調べると、一部の S 期細胞にて PCNA に Cdt2(6A)が強く結合することがわかった。これらの細胞は PCNA のパターンより S 期初期のものと考えられ、Cdt2 のリン酸化は S 期を通して増加するので、S 期後期になると 6A 以外の部位のリン酸化が関与することが考えられた。

2) 再複製の過程の解析

細胞が再複製を開始する過程において、どの様に再複製が開始し、また、細胞はどのような応答を示すのかも重要な課題である。細胞を Nedd8 化阻害剤である MLN4924 で処理すると、CRL4 を含む Cullin ファミリーユビキチンリガーゼが抑制され、通常分解されるライセンス化因子 Cdt1 が S 期以降においても蓄積し、DNA の過剰な複製が起こる。この系を用いて再複製の過程を解析した。MLN 投与後、3 時間程度で Cdt1 は安定に蓄積が見られ、12 時間後に再複製によると推測される DNA 損傷である γ H2AX がほぼ全ての細胞で検出された。一方、再複製と捉えられる 4C 以上の DNA を有する細胞は 24 時間後に見られた。EGFP-PCNA 発現 U2OS 細胞でライブ観察すると、通常の S 期様の foci が観察されたのち G2 期に移行し、かなりの時間を経たのち (M 期には進行せず)、再複製を反映すると推測される S 期初期様の PCNA foci が観察された。今後、MCM2-7 の結合を調べることでより再ライセンス化がどの様に確立するのか解析する必要がある。

また、DNA 損傷時にカルシウム応答が寄与することが報告されたことを受けて、再複製誘導時における $[Ca^{2+}]$ の変化を調べた。カルシウムセンサー GCaMP6 の安定発現 U2OS 細胞を作成し MLN4924 投与後、再複製が観察される 24 時間にて核内での顕著な $[Ca^{2+}]$ の増加を観察した。再複製に伴う障害による細胞死から守ろうとする応答ではないかと考えられる。

3) PCNA の機能を制御する反応機構の解析

ゲノムの維持と細胞増殖の過程では、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、様々な因子の 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 TRAIIP が PCNA 除去に寄与することがわかってきた。TRAIIP 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 に残存していたことから、TRAIIP 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、TRAIIP 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、TRAIIP による M 期での PCNA 除去に関連したゲノム維持について解析を進めると、次の G1 期における複製開始複合体の形成に要求されることが示唆されたので、現在さらに詳細な解析を進めている。

発表論文 List of Publications

- 1 飯田康介、渡邊雄一郎、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：DNA再複製に伴う細胞内Ca²⁺濃度変化の解析 第45回日本分子生物学会年会 2022年11月30日～2022年12月2日

- 2 田所あすか、西谷秀男、塩見泰史：新規PCNA除去機構におけるTRAIPの機能解析 第45回日本分子生物学会年会 2022年11月30日～2022年12月2日
- 3 塩見泰史、田所あすか、鐘巻将人、西谷秀男：クロマチンからのPCNA除去に関連したDNA複製制御 第45回日本分子生物学会年会 2022年11月30日～2022年12月2日

生命科学専攻

博士前期課程

- 飯田康介 : 再複製に伴う細胞内 Ca^{2+} 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
- 清水優輝 : 共に PCNA のクロマチンからの除去に機能する、ELG1 と TRAIP の関係性
- 松原和司 : Elg1-RFC の PCNA 除去機能制御に関わる新規因子の解析

科学研究費補助金等

- 1 令和4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