

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て倍加したのち、均等に分配されなければならない。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することも重要である。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) DNA 複製の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) 再複製の開始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続けている。

1) CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの機能制御の解析

Cdt1 は DNA ヘリカーゼ (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 期が開始すると速やかに分解され、よって再複製が抑制される。CRL4-Cdt2 はこの分解に働く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、一方、S 期以降に起こるリン酸化は Cdt2 と PCNA との結合を抑制し負に働くことを報告した。これらのモチーフ、領域、修飾が CRL4-Cdt2 の DNA 複製部位である PCNA フォーサイへの集積に及ぼす効果を調べるために、mCherry と融合した以下の 5 種類の発現プラスミドを作成し：Cdt2-WT (野生型)、-PIPm (PIP 変異体)、- Δ DBD (DNA 結合部位欠失変異体)、- Δ DBD PIPm (二重変異体)、-18A (リン酸化部位変異体)、これらを EGFP-PCNA 安定発現 U2OS 細胞に導入してライブイメージ観察を行った。Cdt2-WT は、予想通り S 期開始後に PCNA フォーサイへの集積が見られ、S 期中期以降消失した。 Δ DBD による影響はほとんど見られなかった。一方、予想に反して PIPm が S 期初期に集積する様子が観察された。興味深いことに PIPm と Δ DBD の二重変異体では、集積が見られなくなった。Cdt2 の N 末基質認識ドメインが PCNA に結合した Cdt1 を認識して捉える過程において、PIP と DBD が相互に寄与することが示唆された。また、Cdt2-18A 発現細胞では S 期後期においても PCNA に局在し S 期進行が遅延することが観察された。

2) 再複製の過程の解析

2 倍体細胞が 4C よりも多い DNA 量を有す場合、再複製が予測される。しかし、再複製がどのように開始するのか、そして、細胞は再複製に対してどのような応答を示すのかよく分かっていない。

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。これまでに EGFP-PCNA 細胞に MLN4924 を添加し、長時間タイムラプス撮影を行うと、通常の複製フォークを形成しながら S 期を終了した後、再複製特有のフォークが長時間続くことを示した。今回新規手法として、新たに複製された DNA に取り込まれるヒストン H4K20 は非メチル化状態(me0) であることから、H4K20me0 を認識する ARD ドメインの核局在を観察すると、再複製が開始するタイミングや部位を特定できると予想して、GFP 融合 ARD ドメイン発現細胞を構築しライブ観察で追跡した。通常の細胞周期進行時においては GFP-ARD は S 期進行に伴い核内に斑点状の蛍光シグナルが現れて広がっていき、その後輝度が減少したのち M 期に入るが、MLN4924 を添加した場合は、通常と同様の輝度の変化を示したのち M 期には移行せず、一定期間において再び GFP シグナル強度が増加することがわかった。PCNA と ARD の解析を合わせて、S 期を終えたのち長い G2 期様の期間において再複製が開始すると推測された。

また、DNA 損傷時にカルシウム応答が起こ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 $[Ca^{2+}]$ の変化を解析している。これまでに Ca^{2+} センサー GCaMP6 安定発現 U20S 細胞にて、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。この時期に、 Ca^{2+} キレート剤で処理すると、細胞死が高頻度で発生することを見出した。おそらくアポトーシス誘導が促進したことによると推測された。カルシウム応答は再複製に伴う障害による細胞死から守る働きをすると考えられる。

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。

DNA からの PCNA 除去を担う Elg1-RFC について、その相互作用因子を質量分析で探索すると、WDR18 と STUB1 が新規相互作用因子としてみいだされた。そこで、これらの因子は Elg1-RFC の機能を制御する役割があるのではと考え、解析を進めている。

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 除去に連係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、高尾一仁、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：染色体再複製の開始と細胞応答について 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2023年6月5日～2023年6月7日
- 2 塩見泰史、松原和司、清水優輝、田所あすか、鐘巻将人、小布施力史、西谷秀男：DNAからPCNAを除去する反応経路の解析 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2023年6月5日～2023年6月7日
- 3 田所あすか、鐘巻将人、西谷秀男、塩見泰史：M期進行時のPCNA除去を介して安定な細胞周期進行に寄与するTRAIPの機能解析 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ 2023年6月5日～2023年6月7日
- 4 花崎聡太郎、高尾一仁、渡邊雄一郎、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：MLN4924による核内再複製開始過程の解析 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月6日～2023年12月8日
- 5 飯田康介、林晃世、宇野未来、塩見泰史、西谷秀男：DNA再複製に伴う細胞内カルシウム応答の解析 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月6日～2023年12月8日
- 6 戸次龍哉、海老原溪、林晃世、塩見泰史、西谷秀男：ライブイメージングによるDNA複製部位へのCRL4-Cdt2ユビキチンリガーゼの集積機構の解析 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月6日～2023年12月8日
- 7 松原和司、清水優輝、小布施力史、西谷秀男、塩見泰史：Elg1-RFCによるDNAからのPCNA除去の制御に関わる新規因子の解析 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月6日～2023年12月8日
- 8 清水優輝、松原和司、小布施力史、西谷秀男、塩見泰史：クロマチンPCNAの量的制御機構におけるSTUB1の機能解析 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月6日～2023年12月8日
- 9 塩見泰史、清水優輝、松原和司、岩井結希、鐘巻将人、西谷秀男：クロマチンからのPCNA除去に連係したゲノム維持 第46回日本分子生物学会年会 2023年12月6日～2023年12月8日

生命科学専攻

博士後期課程

田所あすか：PCNA新規除去機構におけるTRAIPの機能解析

博士前期課程

- 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 TRAIIP 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
花崎聡太郎 : 染色体再複製開始の機構の解析
戸次龍哉 : CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの PCNA foci 集積の細胞周期制御

科学研究費補助金等

- 1 令和 5 年度 兵庫県立大学 研究活動推進費 (若手)
研究課題 正確な DNA 複製を保證するタンパク質分解系の分子構造基盤の解明
研究代表者 林晃世
- 2 令和 5 年度 公益財団法人兵庫県立大学科学技術後援財団
研究課題 DNA からの PCNA 除去に連係したゲノム維持機構
研究代表者 塩見泰史