

## 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は細胞周期の進行過程で一度だけ正確に複製されたのち、細胞分裂の過程で均等に分配されなければならない。また、細胞増殖の過程でエピジェネティックな情報を維持するためDNA複製に伴うヒストンの修飾反応やクロマチン形成も重要である。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G1期において、DNAヘリカーゼ(MCM2-7)の複製起点へのローディングを担うDNA複製のライセンス化因子として働き、S期が開始すると速やかに分解され再複製を防止する。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。これまでに、基質認識サブユニットである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の分解をそれぞれ正に、また相乗的に制御すること、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。当該年度、PIPbox変異体(PIPm)およびC末の非リン酸化型変異体(18A)さらに、その二重変異体(18A+PIPm)を用い、DNA複製部位および損傷部位へのCRL4<sup>Cdt2</sup>の集積に対する効果を比較するため、PCNAへのCdt2の集積レベルとタイミングをライブイメージングにて解析した。野生型のCdt2(WT)は、S期開始後すぐにPCNA fociに集積し、S期中期以降になると集積が抑制された。PIPmはS期開始直後にわずかに集積したがその後は集積しなかった。一方で、18Aと18A+PIPmはS期を通して集積が見られ、18AではWTあるいは18A+PIPmより過剰に集積する様子が観察された。また、紫外線に相当する損傷を導入し、PCNAが蓄積したDNA損傷部位へのCdt2の集積の経時変化を観察したところ、18AではWTより集積が促進された。一方、PIPmでは集積が半減したが、18A変異を加えた18A+PIPmでは集積がレスキューされた。これらの結果から、Cdt2のPIPboxとC末リン酸化部位(おそらくDNA結合領域)がPCNAへの集積に対して、非リン酸化状態では互いに独立して相乗的に働く一方、リン酸化されると自身だけでなくPIPbox依存の集積も抑制して細胞周期に応じたCRL4<sup>Cdt2</sup>の活性制御を行うと考えられた。

## 2) 再複製の過程の解析

2倍体細胞が4Cよりも多いDNA量を有す状況に至った場合、再複製の誘導が推定される。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、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、過剰なDNA量を持つ細胞を生じる。S期初期に同調したU2OS細胞を用いてMLN4924処理を行い、フローサイトメトリーによりDNA量を継続的に測定すると、G2期ごろに細胞周期が一旦停止しその後、過剰な複製が見られた。DNA損傷マーカーである $\gamma$ H2Aシグナルが過剰複製開始前に上昇し、チェックポイントの活性化によるM期開始が抑制されることを認めた。ライセンス化因子のクロマチンレベルを調べると、Cdt1が蓄積し、続いてMCM2-7レベルが上昇した。その後、APC/Cの標的タンパク質であるジェミニンなどのレベルが減少する様子が得られ、M期を開始することなくAPC/Cの活性化が起こったと考えられた。そこで、細胞周期特異的な分解を受ける蛍光タンパク質を発現するFucci(CA)2細胞をMLN4924で処理すると、細胞は分裂せず核が肥大化し続ける様子が得られた。この過程で、S期にいた細胞では10~20時間後ごろに緑色のmVenus-ジェミニンが分解される様子が得られた。これらの結果から、M期をスキップしてDNAの複製を引き起こしたと示唆された。一方、Cdt2をノックダウンした細胞を観察すると、ジェミニンの分解は起こらずCdt1(degron部位)の両方の蓄積が観察され、M期をスキップすることなくS期が継続して進行して4C以上のDNA量を有し再複製が起こったと考えられた。

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。これまでにカルシウムイオンセンサーであるGCaMP6s安定発現細胞を、MLN4924で処理し再複製を誘導すると細胞内蛍光強度が上昇し、特に核膜周辺で蛍光を強く発したことから、カルシウムシグナル経路の関与が示唆された。そこでMLN4924添加24時間後に $Ca^{2+}$ キレート剤BAPTA-AMで30分処理し72時間まで培養し観察したところ、MLN4924単独処理の細胞と比較してDNA損傷度が上昇し、アポトーシスが高頻度に誘導されることが分かった。以上の結果から、再複製時のカルシウムイオン応答はアポトーシスを抑制すると考えられた。

### 3) PCNAの機能を制御する反応機構の解析

細胞の増殖に伴うゲノムの維持の機構では、複製を基軸とした修復や組換えなどの反応にDNA結合したPCNAが必須であり、このPCNAはさまざまな因子のDNA上への集合や反応制御に機能している。PCNAのDNAへの結合および除去はRFC複合体ファミリーが仲介し、RFC1-RFCおよびCtf18-RFCがPCNAのDNA結合を担っている。一方、もう一つのRFC複合体であるElg1-RFCは、PCNAのDNAからの除去を特異的に担うことが私たちの解析から明らかになった。ヒト細胞においてElg1の発現を抑制すると、複製期のDNAにPCNAが過剰に結合し、複製期の遅延や、核内クロマチン構造および染色体構造の異常が認められた。これらの結果から、PCNAのDNA結合のみならず、積極的なPCNAの除去もゲノム維持に重要な役割を果たしていることを示している。

一方で、Elg1発現抑制細胞でも、複製終了後のG2期からM期にかけてPCNAがDNAから除去されることが観察され、M期への進行過程で機能する新規のPCNA除去機構の存在が示唆された。この点について解析を進めた結果、ユビキチンリガーゼであるTRAIPがPCNAをユビキチン修飾し、それを認識したシャペロンであるp97がDNAから除去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量に差は見られなかったが、M期ではPCNAがDNAに残存していたことから、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考えられる。さらに解析を進めたところ、TRAIPによるM期でのPCNA除去が行われない場合、次のG1期における複製開始複合体の形成が正常に行われず、TRAIP

は複製の開始、および、細胞の増殖にも重要な役割を担っていることが示唆された。そこで現在は、TRAIP による PCNA 除去の分子機構と生理学的意義についての解析を進めている。

## 発表論文 List of Publications

- 1 Yasushi Shiomi, Akiyo Hayashi, Yuichiro Saito, Masato T Kanemaki, Hideo Nishitani : The Depletion of TRAIP Results in the Retention of PCNA on Chromatin During Mitosis Leads to Inhibiting DNA Replication Initiation Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms 30(2)e70006 2025年3月
- 2 Sotaro Hanazaki, Chigusa Naka, Kusakawa Yuki, Akiyo Hayashi, Yasushi Shiomi, Hideo Nishitani : Investigation on the induction of re-replication by NEDD8ylation inhibitor, MLN4924 in human cells. The 12th 3R+3C International Symposium. November 18-22, 2024, Fukuoka, Japan
- 3 Yasushi Shiomi, Akiyo Hayashi, Masato Kanemaki, Hideo Nishitani : The depletion of TRAIP results in the retention of PCNA on chromatin during mitosis, leads to inhibiting DNA replication initiation. The 12th 3R+3C International Symposium. November 18-22, 2024, Fukuoka, Japan
- 4 Akiyo Hayashi, Tatsuya Bekki, Masayuki Kusakabe, Akiko Ueno, Yasushi Shiomi<sup>1</sup>, Kaoru Sugawara, Hideo Nishitani : Cooperation of Cdt2 C-terminal Motifs in Regulating CRL4Cdt2 Dynamics at the DNA Replication Site. The 12th 3R+3C International Symposium. November 18-22, 2024, Fukuoka, Japan
- 5 宇野未来, 飯田康介, 中村実玖, 塩見泰史, 林晃世, 西谷秀男 : DNA再複製開始時の細胞内カルシウムイオン応答は細胞の生存に重要である 第47回日本分子生物学会年会
- 6 戸次龍哉, 日下部将之, 上野晃子, 塩見泰史, 菅澤薫, 林晃世, 西谷秀男 : CRL4Cdt2のDNA合成部位への適切な集積と解離が細胞周期進行を制御する 第47回日本分子生物学会年会
- 7 塩見泰史, 林晃世, 鐘巻将人, 小布施力史, 西谷秀男 : クロマチンからのPCNA除去の制御とゲノム維持への寄与 第47回日本分子生物学会年会
- 8 花崎聡太郎, 中千種, 草川友希, 塩見泰史, 林晃世, 西谷秀男 : MLN4924による核内再複製開始過程の解析 第47回日本分子生物学会年会

## 生命科学専攻

### 博士前期課程

花崎聡太郎：染色体再複製の開始機構の解析

戸次龍哉：Cdt2 のリン酸化による CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの PCNA への集積および活性の抑制機構の解明

岩井結希：細胞周期とクロマチンからの複製因子除去との機能関係

上野晃子：DNA 合成部位への集積における Cdt2 の N 末領域及び C 末領域の役割

宇野未来：DNA 再複製時における Ca<sup>2+</sup>応答による細胞生存の機構