

令和元年6月7日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07257

研究課題名(和文) DNAからのPCNAクリアランス機構の多様性の解析

研究課題名(英文) Study of diversity of PCNA clearance systems from DNA

研究代表者

塩見 泰史 (Shiomi, Yasushi)

兵庫県立大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：80380567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノムの恒常性には、その制御諸因子の中心で機能するPCNAのクロマチン結合が必須である。一方で私は、クロマチンからのPCNA除去も、結合と同等にゲノム恒常性に重要な役割を持つことを示してきた。このPCNA除去はElg1-RFCが行っているが、さらに新規な除去因子の存在が示唆されたため解析を進めた。その結果、PCNAがユビキチン修飾によって除去される機構が存在することが明らかとなった。現在は、この除去経路でPCNAの修飾に機能するユビキチン連結酵素の同定に取り組んでいる。この成果を基盤として、多様なPCNA除去によるゲノム維持制御についての研究を展開したいと考えている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究では、クロマチンからの適切なPCNA除去機構が複数存在することを明らかにしつつある。これまでの解析で示唆された新規な除去機構としては、PCNAのユビキチン修飾によるものが第一の候補である。現在は、PCNA除去のために機能するユビキチン連結酵素の同定を目指している。この研究は将来的に、PCNA修飾の機能を喪失させるケミカルツールで、クロマチン結合したPCNA量の制御異常を惹起しがん細胞の増殖を抑えるなど、PCNAのユビキチン修飾の観点から細胞機能を制御できる創薬の開発といった、医学的な応用にもつながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：PCNA, a central platform for the various functional factors, loading onto chromatin is required for genome integrity. My study showed that, however, not only PCNA loading onto chromatin, but also remove from chromatin also plays crucial role for maintaining genome stabilities. PCNA was removed from chromatin by Elg1-RFC, play as a PCNA unloader. My studies also indicated that novel PCNA removal factor exist in the nucleus. My studies revealed that novel PCNA removal mechanism is depending on ubiquitination. Thus, now I tried to identify the E3 ubiquitin ligase for PCNA removal from chromatin.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ゲノム維持制御 PCNA RFC複合体 PCNAローディング PCNAアンローディング PCNA除去 PCNAクリアランス ユビキチン修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト PCNA(増殖細胞核抗原)はリング構造のタンパク質で、その中央に二本鎖を通して DNA に結合(ロード)する。複製(S)期に DNA 結合する PCNA は、DNA ポリメラーゼをはじめとした様々な因子の DNA 集合と反応促進に機能し、ゲノム維持制御における中心的役割を担っている。S 期の間、DNA 結合する PCNA 量は結合と

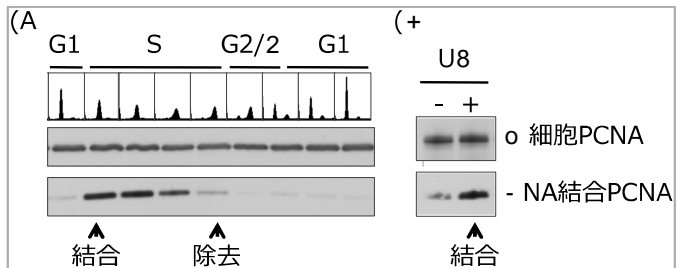


Fig.1 (A) 細胞周期P (+ 損傷修復でS PCNA結合P 除去. 複製(S 期f は結合P 除去が平衡状態R F V C PCNA量がn MれNG るP 考えU れる.

除去(アンロード)のバランスによって一定に保たれているが、複製完了後のG2/M期では、PCNAは全てDNAから除去されてゲノムは娘細胞に分配され次の周期をむかえる(Fig.1A)。また、複製前(G1)期のPCNAはDNA結合していないが、紫外線などによるDNA損傷が起こった場合には、その修復過程でDNA結合して機能する(Fig.1B)。しかし、PCNAそれ自体にDNA結合や除去する機能はなく、ATP加水分解依存的にPCNAリングの一時的な開環を仲介して結合や除去を仲介するのがRFC(複製因子C)複合体で、ヒトではPCNAと共に機能するRFC複合体が3種存在する(Fig.2)。PCNAローダーであるRFC1-RFCはDNAポリメラーゼの補助因子としてPCNAと共に複製や修復で機能し、同じくローダーのCtf18-RFCは複製された染色体対をM期まで保持するコヒージョンでの機能に加え、損傷乗り越えDNAポリメラーゼや(Shiomi *et al*,2007,*JBC*)、ユビキチンリガーゼCRL4-Cdt2複合体の機能を制御している(Shiomi *et al*,2013,*MBC*)。そしてElg1-RFCは私を含めた複数のグループの解析から、PCNAをDNAから除去する“PCNAアンローダー”として特異的に機能し、DNA結合したPCNA量を抑制的に制御することが明らかとなった(Shiomi and Nishitani,2013,*Genes Cells*、Lee *et al*,2013,*JCB*、Kubota *et al*,2013,*Mol Cell*)。Elg1をRNAiで抑制したノックダウン(KD)細胞では、DNAに過剰なPCNAが結合するだけでなく、S期進行の遅延、間期および分裂期のクロマチン構造に異常が生じることから、PCNAの積極的な除去もゲノムの維持制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

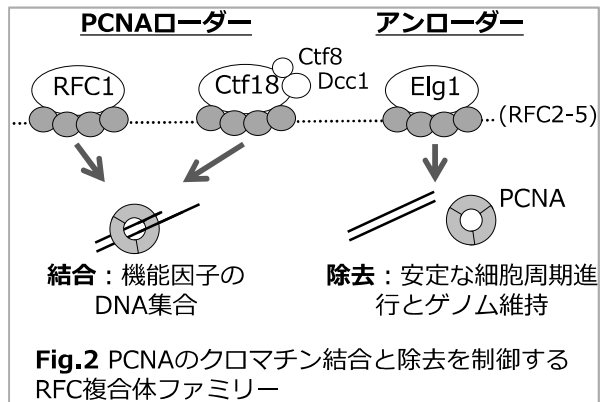


Fig.2 PCNAのクロマチン結合と除去を制御するRFC複合体ファミリー

一方、この解析過程では、Elg1-KD細胞でもG2/M期への進行過程でPCNAはDNAから除去されることを見出した(Fig.3)。また、CRISPR/Cas9法でElg1ノックアウト(KO)細胞を作製しても、周期進行が遅延するのを除けば増殖した(未発表)。これらの結果は、Elg1-RFCが唯一のPCNA除去機構ではないことを示唆している。

以上より、DNAからのPCNA除去(クリアランス)の機能はElg1-RFCに特化されたものではなく、多様な機構(他のRFC複合体によるもの、または、未知の因子やメカニズム)が細胞周期の過程で連携し協調しながら行っていると考えられる。したがって、これまではPCNAがロードし機能することだけが注目されてきたが、多様な機構による積極的なPCNA除去を合わせて明らかにすることが、DNA結合PCNAの量的制御とゲノムの維持制御との関係を理解する上で重要である。

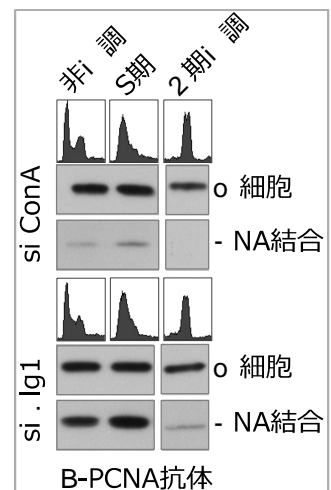


Fig.3 . Ig1-1-細胞では - NA結合K M PCNAが過剰RなるがC 2期では対照細胞P i様R PCNAは除去される.

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、私のこれまでの解析から示唆された「DNA からの PCNA クリアランス機構の多様性」を明らかにするため、3 つの RFC 複合体が示す PCNA アンローダーとしての特性、アンロードのターゲットとなる PCNA の修飾状態や、相互作用因子との結合状態といった特性を生化学的に明らかにする。G2/M 期における新規な PCNA 除去因子の存在を検討し、

新規に除去因子が見出された場合には、各 RFC 複合体との機能分担を細胞周期での発現と分解、修飾状態から検討する。～ の解析結果から、多様に存在する PCNA クリアランス機構を明らかにし、これらメカニズムの連係の研究へと発展させていく。以上を基盤として将来的には、PCNA クリアランスの視点から捉えたゲノムの維持制御について展開できる研究とする。

## 3. 研究の方法

目的 については「精製 RFC 複合体による PCNA アンロード特性の解析」として、精製した RFC 複合体が示す PCNA ローダー・アンローダーとしての生化学特性を *in vitro* で解析する。同時に、目的 に関連した目的 については「アンロードされる PCNA 特性の解析」として、どのような PCNA(修飾や相互作用因子との結合状態)を特異的なターゲットとしてアンロードするのかを解析する。また、3 つの RFC 複合体それぞれに特異的な相互作用因子の探索を行う。目的 については「G2/M 期で機能する新規 PCNA 除去因子の解析」として、G2/M 期で機能する Elg1-RFC 以外の PCNA 除去因子、または、クリアランスメカニズムの存在を検討する。上記 の結果をもとに、目的 では「PCNA クリアランス機構の多様性の解析」として、RFC 複合体や新規除去因子それぞれの細胞周期進行に伴った発現や分解、化学修飾、クロマチンや PCNA との結合といった特性を検討する。

## 4. 研究成果

研究の目的 について、これまでに行ってきた解析との関連から、まずは細胞内における Elg1-RFC 以外の RFC 複合体の PCNA 除去への関与を検討した。この解析過程において、RNAi と細胞周期同調を併用する解析は 1 週間程度の時間が必要で、細胞コンディションの維持が困難であると感じたため、オーキシン添加依存的に Elg1 や RFC1 を分解できる AID-変異株を作製した(未発表、Natsume *et al*, 2016, *Cell Rep* など)。これにより、速やかに特定の RFC 複合体を除去する事が可能になり、細胞コンディションに影響の出ない短期間での解析が可能になった。この細胞も用いて、Elg1-RFC 以外の RFC 複合体による PCNA 除去の可能性を、特に G2/M 期に着目して検討したが関与は低いと考えられた(未発表)。一方で PCNA と、PCNA との相互作用部位である PIP-box (PCNA interacting protein box)を持つタンパク質との結合を阻害する薬剤を添加すると、S 期、G2/M 期共にクロマチン結合した PCNA が増加した。これは、PCNA 上の PIP-box 結合部位が、Elg1-RFC によるアンロードと、新規 PCNA 除去経路の両方に必要であることを示しており(未発表)、研究の目的 に関連した重要な知見となった。しかし、PIP-box を持つ新規な PCNA 除去因子を同定するには至っていなかった。

そうした中、本研究に類似して、複製で機能する DNA ヘリカーゼ MCM2-7 は S 期開始前、Cdt1 や Cdc6 の働きでクロマチンにロードされるが、DNA 合成完了後にはどのようにクロマチンから除去されるのかという不明な点があった。しかし、ユビキチンリガーゼ(E3)である CRL2-LRR1 複合体によってユビキチン修飾を受けた後、p97 複合体によりクロマチンから除去されることが報告された(Dewar *et al*, 2017, *Genes Dev* など)。そこで、目的 に関連して、CRL2-LRR1 や p97 複合体の PCNA 除去への関与を検討した。それぞれの複合体中で主の機能を担う LRR1、p97 の RNAi を行っても、S 期細胞のクロマチン結合 PCNA 量に変化はなかった。しかし M 期細胞では、LRR1 の RNAi では PCNA が除去されるが、p97 の RNAi では PCNA がクロマチンに残った。これは、PCNA が MCM2-7 とは別の E3 でユビキチン修飾を受けるが、クロマチンからは p97 複合体によって除去されることを示す(未発表)。したがって、このユビキチ

ン修飾経路が新規な PCNA 除去機構の第一候補となった。そこで現在は、PCNA を S 期後期から G2 期にかけてユビキチン修飾する E3 酵素の同定を試みている。

目的 に関連しては、3 つの RFC 複合体に特異的に相互作用する因子の探索を、細胞抽出液からのプルダウンと質量分析により行った。その結果明らかとなった、Elg1-RFC にのみ特異的に結合する因子を RNAi で細胞から除去し、クロマチン結合した PCNA を解析した結果、対照細胞と比較してその量が低下していた。これより、この結合因子は Elg1-RFC の機能を抑制的に制御しているのではないかと考え、Elg1-RFC との機能関係について解析を進めている。

そして、目的 および の in vitro における解析については、Elg1-RFC の精製を行い、その ATP 加水分解依存的な PCNA アンロード能は確認した (Shiomi and Nishitani, 2017, *Genes*)。しかし、アンロードされる PCNA の修飾状態等については現時点で明らかにできていない。

## 5. 主な発表論文等

Mazian M, Suenaga N, Ishii T, Hayashi A, Shiomi Y, Nishitani H.

“A DNA-binding domain in the C-terminal region of Cdt2 enhances the DNA synthesis-coupled CRL4Cdt2 ubiquitin ligase activity for Cdt1”

J Biochem. 2019 Jan 12. doi: 10.1093/jb/mvz001. [Epub ahead of print]

Hayashi A, Giakoumakis NN, Heidebrecht T, Ishii T, Panagopoulos A, Caillat C, Takahara M, Hibbert RG, Suenaga N, Stadnik-Spiwak M, Takahashi T, Shiomi Y, Taraviras S, von Castelmuur E, Lygerou Z, Perrakis A, Nishitani H.

“Direct binding of Cdt2 to PCNA is important for targeting the CRL4Cdt2 E3 ligase activity to Cdt1”

Life Sci Alliance. 2018 Dec 31;1(6):e201800238. doi: 10.26508/lsa.201800238. eCollection 2018 Dec.

Nukina K, Hayashi A, Shiomi Y, Sugasawa K, Ohtsubo M, Nishitani H.

“Mutations at multiple CDK phosphorylation consensus sites on Cdt2 increase the affinity of CRL4Cdt2 for PCNA and its ubiquitination activity in S phase”

Genes Cells. 2018; 23(3):200-213.

Shiomi Y, Nishitani H.

“Control of Genome Integrity by RFC Complexes; Conductors of PCNA Loading onto and Unloading from Chromatin during DNA Replication”

Genes (Basel). 2017; 26;8(2).

Tanaka M, Takahara M, Nukina K, Hayashi A, Sakai W, Sugasawa K, Shiomi Y, Nishitani H.

“Mismatch repair proteins recruited to ultraviolet light-damaged sites lead to degradation of licensing factor Cdt1 in the G1 phase”

Cell Cycle. 2017; 16(7):673-684.

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 16 件)

塩見 泰史、織田 里美、佐藤 護、夏目 豊彰、鐘巻 将人、西谷 秀男

「クロマチンからの PCNA 除去と、それに連係した細胞内機能の解析」

2018 年 11 月 28 日～30 日、第 41 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市

羽田野 達也、前田 武志、林 晃世、塩見 泰史、西谷 秀男

「DNA 複製ライセンス化因子 Cdt1 の M 期における機能の解析」

2018 年 11 月 28 日～30 日、第 41 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市

林 晃世、遠藤 浩太郎、塩見 泰史、西谷 秀男

「DNA 再複製に伴う細胞応答の解析 (DNA 再複製と中心体複製の連係について)」

2018 年 11 月 28 日～30 日、第 41 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市

Muadz Mazian, Kohei Nukina, Naohiro Suenaga, Takashi Ishii, Akiyo Hayashi, Yasushi Shiomi, Hideo Nishitani

「The C-terminal region of Cdt2 regulates the PCNA-dependent CRL4-Cdt2 ubiquitin ligase activity」

12-16, Nov., 2018, 11th 3R+3C international symposium, Kanazawa City, Ishikawa, Japan

塩見 泰史、織田 里美、佐藤 護、夏目 豊彰、鐘巻 将人、西谷 秀男

「RFC 複合体による DNA への PCNA 着脱と連係した細胞内機能の解析」

2017 年 12 月 6 日~9 日、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸ポートアイランド、神戸市

貫名 康平、塩見 泰史、西谷 秀男

「ゲノム維持に関わる E3 ユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 の基質認識サブユニット Cdt2 のリン酸化による制御の解析」

2017 年 12 月 6 日~9 日、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸ポートアイランド、神戸市

荻野 寛行、植田 麻紗子、林 晃世、塩見 泰史、西谷 秀男

「Cdt2-PCNA 融合体は CRL4Cdt2 の抑制制御を損なう」

2017 年 12 月 6 日~9 日、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸ポートアイランド、神戸市

林 晃世、石井 健士、末永 尚弘、高原 教代、塩見 泰史、西谷 秀男

「ゲノム複製を制御するユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 は PCNA と直接結合して機能する」

2017 年 12 月 6 日~9 日、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸ポートアイランド、神戸市

羽田野 達也、前田 武志、村上 裕輔、林 晃世、塩見 泰史、西谷 秀男

「DNA 複製ライセンス化因子 Cdt1 の M 期における機能の解析」

2017 年 12 月 6 日~9 日、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸ポートアイランド、神戸市

高原 教代、田中 美如、貫名 康平、林 晃世、酒井 恒、菅澤 薫、塩見 泰史、西谷 秀男

「紫外線照射による G1 期 CRL4Cdt2 の活性化におけるミスマッチ修復系の関与」

2017 年 12 月 6 日~9 日、2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)、神戸ポートアイランド、神戸市

塩見 泰史、夏目 豊彰、鐘巻 将人、西谷 秀男

「Eig1-RFC による PCNA アンロードと連係した細胞内機能の解析」

2017 年 11 月 27 日~29 日、第 24 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、長良川国際会議場、岐阜市

貫名 康平、塩見 泰史、西谷 秀男

「E3 ユビキチンリガーゼ CRL4Cdt2 の基質認識サブユニット Cdt2 のリン酸化による制御の解析」

2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市

高原 教代、末永 尚弘、石井 健士、林 晃世、塩見 泰史、西谷 秀男

「ゲノム複製を制御するユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 の PIP ボックスの役割 細胞での解析」

2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市

北詰 麻衣、熊田 ちひろ、村上 裕輔、前田 武志、塩見 泰史、西谷 秀男

「DNA 複製ライセンス化因子 Cdt1 は M 期にリン酸化され、分解から保護される」

2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市

林 晃世、高原 教代、末永 尚弘、石井 健士、高橋 達郎、塩見 泰史、西谷 秀男

「ゲノム複製を制御するユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 の PIP ボックスの役割 試験管内解析」

2016 年 11 月 30 日~12 月 2 日、第 39 回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、横浜市

Akiyo Hayashi, Naohiro Suenaga, Michiyo Takahara, Takashi Ishii, Yasushi Shiomi,  
Hideo Nishitani.  
“Direct binding between PCNA and E3 ligase CRL4Cdt2 supports substrate targeting,  
and subsequent proteolysis during DNA replication”  
13-17, Nov., 2016, 10th 3R international symposium, Matue City, Shimane, Japan

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]  
出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年:  
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:  
ローマ字氏名:  
所属研究機関名:  
部局名:  
職名:  
研究者番号 (8 桁):

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名: 西谷秀男  
ローマ字氏名: Hideo Nishitani

研究協力者氏名: 小布施力史  
ローマ字氏名: Chikashi Obuse

研究協力者氏名: 鐘巻将人  
ローマ字氏名: Masato Kanemaki