

平成 23 年 5 月 13 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19687012
 研究課題名（和文） CDK/cyclinの標的因子の探索
 研究課題名（英文） Screening for targets of CDK/cyclin
 研究代表者
 三村 覚 (MIMURA SATORU)
 大阪大学・大学院理学研究科・助教
 研究者番号：60432233

研究成果の概要（和文）：真核生物の細胞周期制御を司る CDK/サイクリンによって制御されている真核生物の DNA 複製の制御機構の解析を主に行った。その結果、出芽酵母において、特定のタンパク質の分解に関わるユビキチンリガーゼの一種である SCFDia2 が複製フォークに局在し、複製フォークの進行制御に関わっていること、及び、同じくユビキチンリガーゼの一種である Cul8 が様々なタンパク質と複合体を形成し、ゲノムの安定性の維持に関与していることを見だし報告した。

研究成果の概要（英文）：CDK/cyclin regulates the progression of the eukaryotic cell cycle. To understand the function of CDK/cyclin, I investigated the regulation of DNA replication, which is regulated by CDK/cyclin activity. I found that an ubiquitin ligase, SCFDia2 localized at replication fork and regulates its progression, and that Cul8, which is also an ubiquitin ligase, forms varieties of protein complex and participates in the regulation of genome stability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2008 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2009 年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
年度			
年度			
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：DNA複製、ユビキチンリガーゼ、細胞周期制御

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞周期は複数の CDK/サイクリンによって制御されている。細胞周期に応じて、特定の CDK/サイクリンが活性化されその下流の現象を引き起こしていると考えられている。CDK/サイクリンの細胞周期おける制

御機構については分子機構の解明が進んでいるが、実際に活性化された異なる CDK/サイクリンがどのように特異性を発揮しているのか、また、CDK/サイクリンが実際にどのようなタンパク質をリン酸化しているのかもあまり分かっておらず、不明な点が多い。申

請者は出芽酵母のM期サイクリン、Clb2が特定の基質をリン酸化し、そのリン酸化依存的に結合することを見だしていた。そこでサイクリンと特異的に結合する因子を同定すればCDK/サイクリンの新規基質を同定できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

(1)真核生物の細胞周期を司るタンパク質リン酸化酵素CDK/サイクリンの基質をタンパク質タンパク質間相互作用を指標として探索し、CDK/サイクリンによって制御されている細胞周期イベントの分子機構の理解に貢献する。

(2)細胞周期の進行の過程ではゲノムDNAの正確な複製が行われる。(この現象もCDK/cyclinにより制御されている。)近年の研究により出芽酵母で2種類のユビキチンリガーゼ、F-box蛋白質Dia2と、CullinであるCul8/Rtt101が傷害を持った染色体DNAの複製に関与していることが示された。これらのユビキチンリガーゼの機能解析、特に基質蛋白質の同定を行い安定なゲノム維持機構の理解に貢献する。

3. 研究の方法

(1)出芽酵母のM期サイクリンであるClb2と特異的に結合するタンパク質を酵母ツーハイブリッド法を用いてスクリーニングする。ヒト培養細胞で、M期サイクリンであるサイクリンBをレトロウイルス発現系を用いて発現させ、生化学的に単離し強精製されるタンパク質を質量分析により同定する。

(2)Dia2とCul8/Rtt101がどのような複合体を形成してユビキチンリガーゼとして働いているか、また、どのような蛋白質を基質として認識しているのかを蛋白質間相互作用を指標として探索する。

4. 研究成果

(1)出芽酵母のClb2をbaitとしてツーハイブリッドスクリーニングを試みた。その結果Cdk活性化能のあるClb2をbaitに用いた場合細胞の増殖が著しく阻害されることがわかった。そこでClb2のCdkとの結合領域に点変異を導入したClb2変異体を用いてスクリーニングを行ったところいくつかの結合因子を得た。それらの中にはCDKリン酸化コンセンサス配列を複数持つものが存在した。これらの因子と、Clb2の結合を免疫沈降法などの生化学的手法により確認することを試みたが有意な結合は認められなかった。バッファー条件など更なる条件検討が必要だったかもしれない。ほ乳動物培養細胞におけるレトロウイルス発現系を用いた解析においてもCyclinB結合蛋白質を探索したところ既知の因子との結合しか認められなかった。

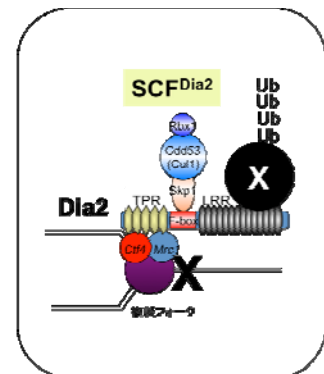
cyclinBの発現量が少なかったことが理由として考えられる。

(2)Dia2と基質との結合を安定化するように改変したツーハイブリッド法を用いてSCF^{Dia2}の基質候補を探索したところ、複製チェックポイントの活性化に関わるMrc1、姉妹染色体の対合に関わるCtf4、複製ヘリカーゼの本体と考えられているCMG複合体の構成因子の一つMcm2の3つの複製関連蛋白質を同定した。さらに、Mrc1とCtf4についてはin vitro, in vivoの両方でSCF^{Dia2}の基質となりうることを確認した。Dia2が複製フォークに局在する蛋白質と相互作用があることからDia2自身も複製フォークに局在するのではないかと考えてDia2蛋白質の挙動をChip-CHIP法を用いて解析したところ、HUでS期初期に同調した細胞中で、Dia2はearly origin近傍に局在することがわかった。さらに、dia2欠失株では、HU存在下でも複製フォークが若干進行することがわかった。これらの結果はDia2が複製フォークに局在し複製フォークの進行に重要な働きを持っていることを示唆している。

Dia2はN末端側にTPR(tetratricopeptide repeat)、中央部にF-box、C末端側にLRR(leucine rich repeat)のモチーフを持つ。TPRは、Mrc1, Ctf4, Mcm2との結合と、Dia2蛋白質自身の不安定化に必要であった。しかし、LRRを欠いたDia2DLRRはdia2欠失株の薬剤感受性を回復できなかったのに対し、TPRを欠いたDia2DTPRは回復することができた。この結果は、Dia2がその重要な基質をLRRで認識しており、TPRは局在や安定性の制御を通じてDia2の活性制御に関わることを示唆している。(Mimura et al., 2009)。

Dia2の基質タンパク質を同定するため、Dia2のLRRの機能に必須な領域を決定し、そこに結合する因子をツーハイブリッドスクリーニング法によって探索し、基質候補タンパク質として解析を行った。これらのうち細胞内でDia2欠失株でタンパク質の安定性が上昇するものは認められず、現在のところこれら

がDia2の基質であることを示す積極的な証拠は得られていない。細胞内の総タンパク質量ではなく、例えば複製フォーク上など局所的なタンパク質の量の変化を調べる必要があると感じている。

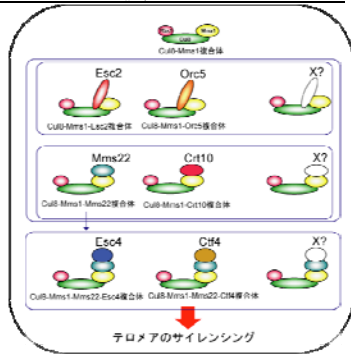


SCF^{Dia2}は複製フォークに局在し、フォーク停止時に有るかの量も監視して結合することによりフォークの進行を制御する。

出芽酵母 Cul8 は Cullin の一種であり、DNA複製中の傷害の修復に関与することが示唆されていた。Cul8 と複合体を形成している蛋白質を同定する目的で Cul8 結合蛋白質を生化学的に単離し質量分析で解析した結果、Mms1 および Mms22 を同定した。さらに MMS1, MMS22 をベイトとしてツーハイブリッドスクリーニングを行ったところ、Mms1 結合蛋白質として Esc2 および Orc5、Mms22 結合蛋白質として Ctf4 および Esc4 を見いだした。免疫沈降実験およびツーハイブリッド法により、これらの蛋白質がどのように複合体を形成しているかを明らかにした。その結果、Cul8-Mms1-Orc5, Cul8-Mms1-Esc2, Cul8-Mms1-Mms22-Esc4, Cul8-Mms1-Mms22-Ctf4 の少なくとも4つの複合体が形成されていることを明らかにした。

Cul8 結合蛋白質の中には、転写のサイレンシングに関わる蛋白質が多く含まれたことから Cul8 の転写のサイレンシングへの影響を調べたところ、cul8 欠失株はテロメアでの転写のサイレンシングに欠損があることがわ

かった。以上の結果は Cul8 が様々な蛋白質と複合体を形成することにより、染色体で起こる様々な現象に関わっていることを示唆している (Mimura et al. 2010)。



Cul8-Mms1 複合体は様々な因子と結合して複合体を形成し、DNA複製の阻害、転写のサイレンシングなどの染色体不安定に関与する。

以上の結果は、いずれも学会発表及び論文発表を行った。Dia2 に関しては我々の論文と同時期に2つのグループから重複する結果を示す論文が報告されており複製制御の分野で一躍注目を集める分子として認識された感がある。今後は Dia2 の真の基質探しが重要であると思われる。Cul8 についても我々が報告した Cul8 結合因子の解析および転写のサイレンシングの関与という情報を元にして今後機能解析がさらに進んでいくことが期待される。

上記の結果に加えて、細胞老化に関わる Lag2 と呼ばれる蛋白質が SCF 複合体の活性制御に関わっていること (Liu et al., 2009)、機能未知であった F-box 蛋白質 Ymr258c が細胞内小胞輸送に関与すること (Liu et al. 2011) を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計4件)

①Liu, Y., Nakatsukasa, K., Kotera, M., Kanada, A., Nishimura, T., Kishi, T., Mimura, S. and Kamura, T. (2011) Non-SCF-type F-box protein Royl/Ymr258c interacts with a Rab5-like GTPase Ypt52 and inhibits Ypt 52 function Mol. Biol. Cell 22, 1575-1584 査読あり

②Mimura, S., Yamaguchi, T., Ishii, S., Noro E., Katsura, T., Obuse, C. and Kamura, T. (2010) Cul8/Rtt101 forms a variety of protein complexes that regulate DNA damage response and transcriptional silencing. J. Biol. Chem. 285, 9858-9867 査読あり

③ Mimura, S., Komata, M., Kishi, T., Shirahige, K. and Kamura, T. (2009) SCFDia2 regulates DNA replication forks during S-phase in budding yeast. EMBO J. 28, 3693-3705 査読あり

④Liu, Y., Mimura, S., Kishi, T. and Kamura, T. (2009) A longevity protein Lag2, interacts with SCF complex and regulates SCF function. EMBO J. 28, 3366-3377 査読あり

〔学会発表〕 (計7件)

① UBIQUITIN LIGASES INVOLVED IN THE REGULATION OF DNA REPLICATION IN BUDDING YEAST Satoru Mimura and Takumi Kamura The 7th 3R meeting 2010年10月29日 アナクラウンホテル富山

②出芽酵母 SCFDia2 による DNA 複製フォークの制御 三村覚、古俣麻希子、岸努、白髭克彦、嘉村巧 第32回日本分子生物学会年会 2009年12月12日 神奈川県パシフィコ横浜

③ Regulation of DNA replication by E3 Ubiquitin ligase, SCFDia2 Satoru Mimura, Makiko Komata, Tsutomu kishi, Katsuhiko Shirahige and Takumi Kamura International Symposium on Chromosome cycle and genome dynamics 2009年11月11日 栃木県サンバレー那須

④安定な DNA 複製に関わる出芽酵母 F-box 蛋白質 Dia2 の解析 三村覚、古俣麻希子、岸努、白髭克彦、嘉村巧 BMB2008 (第31回日本分子生物学会年会第81回日本生化学会大会合同大会) 2008年12月11日兵庫県神戸国際会議場

⑤ Regulation of DNA replication by E3

Ubiquitin ligase, SCFDia2 Satoru Mimura,
Makiko Komata, Tsutomu kishi, Katsuhiko
Shirahige and Takumi Kamura International
Symposium on Chromosome Dynamics in Ise
2008 年 10 月 28 日 静岡県掛川つま恋リゾー
ト

⑥ Regulation of DNA replication by E3
Ubiquitin ligase, SCFDia2 Satoru Mimura,
Tsutomu kishi, and Takumi Kamura
International Symposium on Chromosome
Dynamics in Ise 2008 年 5 月 29 日 三重県
伊勢志摩ホテル近鉄アクアピラ

⑦出芽酵母 F-Box 蛋白質 Dia2 と複製フォー
ク蛋白質との結合 三村 覚、嘉村巧
BMB2007 (第 30 回日本分子生物学年会第 81
回日本生化学会大会合同大会) 2007 年 12 月
11 日 神奈川県パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三村 覚 (MIMURA SATORU)
大阪大学・大学院理学研究科・助教
研究者番号：60432233

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：