

平成 22 年 6 月 9 日現在

研究種目： 特定領域研究
 研究期間： 2008～2009
 課題番号： 20012052
 研究課題名（和文）細胞周期制御因子 CDK による染色体 DNA 複製制御システムの異常とゲノムの不安定化
 研究課題名（英文）Destabilisation of genome by the failure in the regulatory system of chromosome DNA replication which is controlled by cell cycle regulator, CDK
 研究代表者 田中 誠司 (TANAKA SEIJI)
 国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教
 研究者番号： 50263314

研究成果の概要（和文）：

がんは正常な増殖制御を失い異常増殖する細胞の集団であり、がん細胞では、i) 細胞周期の制御経路の異常や、ii) ゲノムの不安定化 がその特徴として観察される。CDK（サイクリン依存性キナーゼ）は真核細胞の細胞周期の進行を制御するのみならず、染色体 DNA 複製が細胞周期につき一度だけ起きるようにする制御システムの中心にある。本研究から、CDK が DNA 複製開始に関わる複数の因子を重複して制御していること、複数の制御系を持つことがゲノムの安定維持に重要であること、がわかった。

研究成果の概要（英文）：

Cancer is a mass of cells that has lost a normal cell cycle control. In human cancer cells, i) abnormality in cell cycle regulatory pathway and ii) destabilization of genome are observed as their hallmarks. Cyclin-dependent kinases, CDKs, not only regulate the progression of cell cycle, but also play a central role in limiting chromosome DNA replication to once per cell cycle. This research reveals that CDK regulates multiple factors for the initiation of DNA replication and having the multiple regulatory mechanisms is important for the stable genome maintenance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,500,000	0	7,500,000
2009 年度	7,500,000	0	7,500,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,000,000	0	15,000,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・ 遺伝・ゲノム動態

キーワード：がん、細胞周期、CDK、DNA 複製、ゲノム不安定化

1. 研究開始当初の背景

がんは正常な増殖制御を失い異常増殖する細胞の集団であり、がん細胞はその細胞周期制御機構そのもの、あるいはそこに起因すると思われる異常を持つ。がん細胞でしばしば観察される特徴として、i) 細胞周期の進行制御経路の異常や、ii) ゲノムの不安定化がある。CDK(サイクリン依存性キナーゼ)は細胞周期エンジンと称されるように、細胞周期の各ステージ特異的に異なるタイプの CDK が活性化することで、正しい細胞周期の進行を制御している。これらのうち、G1 期 CDK の活性化は細胞を分裂・増殖サイクルに決定づけることが知られている。上記 i) のタイプの異常のうち、G1 期 CDK の異常な活性化は多くのがん細胞で観察される特徴であるが、このことは細胞の増殖因子への依存性や増殖阻害因子に対する感受性を下げることで、がん化細胞に他の正常細胞に対する増殖優位性を与え、がんの発生において重要な役割を果たしていると考えられる。これに対し、ii) グローバルなゲノムの不安定化は、そのせいで細胞ががん化するものなのか、逆に細胞ががん化した過程や結果として生じたものか、あるいは両方なのか、決定的な結論が出るにはいたっていなかった。申請者は、真核細胞のモデルである出芽酵母を用いた実験から、G1 期 CDK の異常な活性化とゲノムの不安定化には因果関係があることを強く示唆するデータを発表していた (Tanaka and Diffley (2002), Genes Dev. 16:2639-49.)。また、申請者のものを含むこれまでの研究から、CDK の細胞周期特異的な活性化と不活性化が染色体 DNA の複製を細胞周期一回につき一度だけ起きるように限定している制御の中心にあり、pre-RC (複製前複合体) と呼ばれる複合体の「形成」とその「活性化 (=複製開始)」という 2 段階のステップをそれぞれ制御していることがわかってきていた。上記研究では、人工的に G1 期サイクリンを構成的に発現させることでこの制御システムを異常にすると、実際にゲノムが不安定化することを実験的に示していた。

さらに、申請者は最近の研究で、DNA 複製開始過程に必要な S 期 CDK の基質を同定し (Tanaka et al. (2007) Nature 445: 328-32.)、CDK の活性がなくても複製開始を誘導できるような変異を単離していた。この変異は、DNA 複製を時期尚早に始め、過剰複製してしまうようなシステム異常の系の解析のよいモデルになりうることを示している。また、これは上述の G1 期 CDK の発現による過少複製系とは逆の関係であり、これら両方の系を持って解析を進めることで、「複製システム制御の破綻とゲノムの不安定化、不安定化したゲノムが増殖に与える影響」といった諸問題解決のための新たな知見が得

られることが期待された。

2. 研究の目的

上記のような背景の上にたち、本申請研究では、CDK による DNA 複製制御システムの異常がどのようなタイプのゲノム不安定化を引き起こすのかを同定し、そこに関わる分子機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

DNA 複製の細胞周期における制御システムが破綻した時にゲノムにどういった変化が起きるのか、そういった変異に細胞がどのように対応するのか、これらの過程でゲノムの安定維持にどのような影響が表れるのかということを知ることによって、解析を行った。このために、真核細胞のモデル生物である出芽酵母を用いて、システム異常の結果過少複製となる系 (G1 期 CDK の異常活性化) と過剰複製となる系 (CDK なしで複製開始する変異) の解析を平行して進めた。

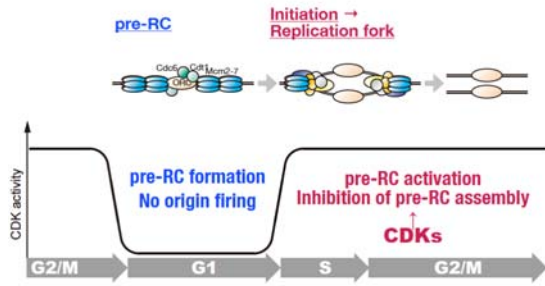
4. 研究成果

これまでの解析から G1 期 CDK の異常活性化がゲノム DNA 複製の効率を低下させること、染色体の転座、欠失等を含む Gross Chromosome Rearrangements (GCRs) の大幅な増加を引き起こすことが分かっていた。この過程においては、停止あるいは長時間存在する複製フォークが染色体異常を誘導すると予想し、複製フォークを遅延させるような配列を用いて GCR 発生率を計測し、実際にこういった配列が GCR を増加させることを見いだした。したがって、複製フォークの進行異常が G1 期 CDK による GCR 増加に大きく寄与していることがわかった。細胞が生存するためにはこの過程において生じたダメージが修復されることが必須である。よく知られている DNA 修復経路である、相同組み換えと非同末端結合の両経路が果たす役割をさらに解析したところ、どちらの経路も生存率維持に寄与している、すなわち、どちらの経路も修復に関与していることが示唆された。これらの経路は細胞周期の状況により使い分けられていることが示唆されていたが、以上の結果はそれ以外に両経路が同時に働くモードを備えていることを示唆しており、大変興味深い。

1 (研究開始当初の背景) の欄で紹介したように、真核細胞の染色体 DNA 複製は CDK により制御を受ける以下のような 2 段階の反応で起こる。細胞周期の G1 期に複製前複合体 (pre-RC) が形成されて準備を整え、S 期に入ると pre-RC が活性化され (複製開始)、複製フォークが形成される。これらの反応が同時に起きると、染色体 DNA の再複製が起きるため、これらの反応は細胞周期中で完全に

分離しておかれる様に厳密に制御されている。これまでに、複製開始後に複製起点に pre-RC が再形成されないようにしている機構は多くのモデル真核細胞において多数の解析がある(下図:ここでは出芽酵母の系を模式的に示した。G1 期には pre-RC は形成されているが、CDK 活性が低いため複製は開始しない。S 期に入ると、CDK が pre-RC を活性化する。同時に、いったん活性化した複製起点に新たな pre-RC が形成しないよう、CDK は pre-RC 構成因子を様々な方法で阻害する)。

CDKs limit DNA replication once per cell cycle in budding yeast



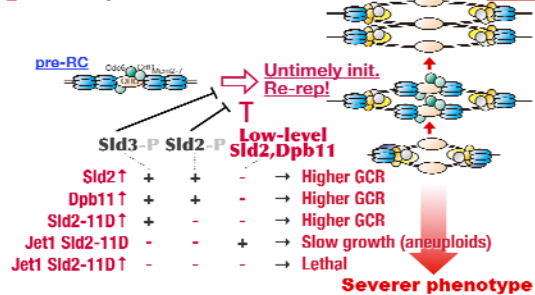
それに対し、G1 期に形成された pre-RC が S 期に入る前に時期尚早に、活性化されないようにしている機構についての解析はほとんどない。というのも、申請者らが、複製開始過程における CDK の必須基質を同定するまで、開始過程の分子機構が謎とされてきたからである。上述したように、申請者らが得ている独自の変異を用いて複製開始過程の制御がどのようにゲノム安定維持に寄与しているかを、このような解析を行うことができる現在唯一の系である出芽酵母を用い、解析した。その結果、人為的に G1 期で複製を誘導すると、ごく初期から細胞は致死となる。生き残る細胞もごく少数存在するが、そのゲノムが著しく不安定化することがわかった。この系では CDK のターゲットを含む複数の因子が重複して制御されており、そのうちどれかでも破壊すると染色体の不安定化が起きることから、複数の制御系を持つことで非特異的複製開始を抑え、ゲノムを安定に維持していることがわかった(論文投稿準備中・下図)。

これらの知見は、ヒトをはじめとする動物細胞においても発見されつつある複製開始因子の細胞のがん化・ゲノムの不安定化における役割を理解する基盤を与えるものといえる。

下図: DNA 複製開始反応が起きるためには、CDK による Sld2, Sld3 タンパクのリン酸化が必須である。両タンパクのリン酸化が DNA 複製起点において新たなタンパク集合形成の引き金となる。したがって、これらのリン酸化を同時にバイパスするような変異(図中 Sld2-11D, Jet1)を組み合わせると、細胞は G1 期であっても DNA 複製を開始する。結果、過剰複製へとつながり、致死となる。この際、

Sld2 をはじめとする複製開始に関わる因子の量も重要となることがわかった。これらのリン酸化、量の制御という複数の制御系があって初めて細胞周期につき一度の複製が確実に担保され、ゲノムは安定に維持される。複数の制御経路がそれぞれ寄与するため、ひとつだけの経路を壊した程度では致死とならない。しかしながら時期尚早に複製開始してしまう確率が上昇するため、ゲノムの不安定化につながる。また、複数の経路による制御であることから、多くの経路がおかしくなれば、その結果はより重篤なものとなってゆく。

Multiple regulatory pathways inhibit untimely initiation in G1



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 3 件)

1. Tanaka, S. and Araki, H. (2010) Regulating the Initiation step of DNA replication by Cyclin-dependent kinases. Chromosoma, in press. 査読有
2. 田中 誠司, 荒木 弘之 (2009) 真核細胞の細胞周期制御機構と染色体 DNA 複製. 遺伝 63:51-58. 査読無
3. 田中 誠司, 荒木 弘之 (2008) 真核細胞染色体 DNA 複製開始反応と CDK による制御. 細胞工学 27:985-991. 査読無

[学会発表] (計 20 件)

1. Tanaka, S. Multiple regulatory mechanisms of the initiation of DNA replication are important for stable genome maintenance. International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010. 2010. 2. 19 於 長崎市
2. Tanaka, S. Temporal regulation of origin firing in budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. 第 32 回日本分子生物学会年会 ワークショップ. 2009. 12. 10 於 横浜市
3. Tanaka, S. Multiple regulatory mechanisms of the initiation of DNA replication are

important for stable genome maintenance.
Cold Spring Harbor Meeting, Eukaryotic
DNA Replication & Genome Maintenance.
2009.9.2 NY, USA

4. Tanaka, S.

Multiple regulatory mechanisms for the
initiation of DNA replication are
important for stable genome maintenance.
Chromosome Dynamics and Genome Stability.
2009.5.15 Villars-sur-Ollons,
Switzerland

5. Tanaka, S.

Periodic expression of replication
protein Sld2 is important for DNA
replication and genome integrity
3R Symposium 2008. 2008.10.27 於静岡県
掛川市

6. Tanaka, S.

Periodic expression of replication
protein Sld2 is important for DNA
replication and genome integrity
2008 FASEB Summer Research Conferences
'Yeast Chromosome Structure,
Replication and Segregation'
2008.6.25 AZ USA

7. Tanaka, S.

REGULATION OF THE REPLICATION PROTEIN
Sld2 AND ITS ROLE IN STABLE GENOME
MAINTENANCE
The 3rd NIG International Symposium
'Chromosome Dynamics'. 2008.5.26 於静
岡県三島市

[図書] (計 1 件)

田中 誠司 悠書館 遺伝子図鑑編集委員会
編 遺伝子図鑑 2010 年刊行予定

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 誠司 (TANAKA SEIJI)

国立遺伝学研究所・細胞遺伝研究系・助教
研究者番号：50263314