

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 6月 1日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21370081

研究課題名（和文） DNA複製開始とカップルしたフィードバック制御による染色体維持機構の解明

研究課題名（英文） Regulation of genome integrity through a DNA replication coupled feedback control

研究代表者

西谷 秀男（NISHITANI HIDEO）

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授

研究者番号：40253455

研究成果の概要（和文）：細胞周期に染色体の複製を一度のみ行なうため、複製開始因子 Cdt1 は複製開始後、分解されなければならない。我々は、複製因子 PCNA に依存して Cdt1 の分解に関わる CRL4-Cdt2 の働きに注目し研究を行った。Cdt1 は、その N 末端に存在する特殊なアミノ酸部位が認識され分解されること、PCNA のクロマチン結合に必要な因子が、S 期と DNA 修復時で使い分けられることを明らかにした。このように厳密な Cdt1 の分解制御が染色体維持に関わっている。

研究成果の概要（英文）：To ensure that DNA replication is limited to only once during a cell cycle, initiator protein Cdt1 is degraded once DNA replication is initiated. We examined how PCNA dependent CRL4-Cdt2 operates for the degradation of Cdt1. We report that CRL4-Cdt2 recognizes specific residues located at the N-terminus of Cdt1 and that PCNA loaders are differentially required during S phase and repair. Cdt1 degradation is strictly regulated to maintain genome integrity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2011年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA・複製・細胞周期・タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

生命の維持は、細胞周期における正確な遺伝情報の維持伝達により成り立つ。細胞周期

において、DNA複製が終了しないままM期へ進行したり、あるいは過剰複製が起きると、娘細胞に正確に遺伝子が分配されず、正常な

細胞機能が維持できなくなる。その結果、細胞死やガン化を引き起こす要因となりうる。複製を一回に保証する仕組みは、“複製のライセンス化制御”と呼ばれている。染色体の再複製を抑制する機構の解明のため長年にわたり研究が行われてきた。なかでも、高等真核生物における複製のライセンス化因子 Cdt1 の分解機構の解析から、DNA 合成の開始に依存して機能する新たなタンパク質分解システムが見つかった。Cdt1 に PCNA 結合部位が存在し、複製に伴い PCNA が染色体に結合すると、E3 である CRL4(Cul4-DDB1)^{Cdt2} によりユビキチン化される。さらに最近、PCNA と結合する CDK インヒビター p21 が、Cdt1 と同様に S 期に入ると CRL4^{Cdt2} により分解されることを明らかにした。PCNA は元来 DNA ポリメラーゼの補助因子として同定されたが、現在、DNA 複製・修復やクロマチン形成などの多様な機能に関わる数十の因子が働く際、足場として機能することが知られている。さらに、PCNA がタンパク質分解にも関与することが分かり、我々は PCNA の新規な機能として、複製の開始に伴い PCNA がクロマチンに結合すると、細胞は S 期の開始を認識し、G1 期に機能していた Cdt1 や p21 を抑制するフィードバック制御機構を構成すると考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では、我々が Cdt1 の分解の研究から新たに発見した、DNA 複製の開始に依存した分解系、つまり複製開始に伴いクロマチンに結合した PCNA に依存して、CRL4^{Cdt2} により基質タンパク質 (Cdt1 や p21 タンパク質) をユビキチン-プロテアソーム系で分解する系は、これまでになかった PCNA の新規な機能の発見である。我々は、このシステムは S 期の開始と G1 期の終了をリンクさせるフィードバック制御機構であると考え、次のような点を明らかにすることを目的として研究を行った。

(1) PCNA は、染色体の複製、クロマチン形成などに関わる多くの因子に結合する。それらの因子のなかで、どのようにして Cdt1 や CDK インヒビター p21 が選別されてユビキチン化のターゲットとなるのか、その基質認識機構を明らかにする。

(2) CRL4^{Cdt2} 複合体が、複製の開始と同時に PCNA が結合したクロマチンにリクルートされてユビキチン化を行なうしくみを解析する。

(3) UV 照射後においても PCNA に依存して

CRL4^{Cdt2} 系により、Cdt1、p21 がユビキチン化され速やかに分解される。この機構の解明を細胞周期の S 期と比較して明らかにする。

(4) このシステムの主複合体である CRL4^{Cdt2} と共にユビキチン化に関わる因子およびこの系でユビキチン化される分子を同定する。

3. 研究の方法

上記の研究目的に対応して、次のように研究を行った。

(1) PCNA に結合する因子は、PIP ボックス (PCNA interacting protein ボックス: アミノ酸配列 Q-x-x-[L, V, I, M]-x-x-[F, Y]-[F, Y]) をもつ。分解される Cdt1 および p21 と他の因子で PIP ボックス領域及びその周辺のアミノ酸配列を比較した。Cdt1 および p21 に存在する共通配列に変異を導入し分解がどうなるか調べた。特に、PIP ボックス下流の塩基性アミノ酸に注目した。また、分解されない DNA リガーゼとキメラ分子を作成し、分解を促進あるいは阻害するアミノ酸の同定を行なった。

(2) PCNA のクロマチン結合には、PCNA ローダーが関わる。これまで、RFC1-RFC、Ctf18-RFC、Elg1-RFC が知られている。これらの因子を RNAi 法でノックダウンし、分解に及ぼす効果を比較検討した。

(3) UV 照射後の Cdt1 分解にはヌクレオチド除去修復の課程で起こると考えられる。そこでこの課程に欠損のある細胞 (XPA 変異細胞) を用いて Cdt1 分解を調べた。また、3-5 ミクロンの穴の開いたメンブレンにより細胞の核に局所的に UV を照射し、DNA 損傷部位への諸因子の集積を調べた (マイクロポアアッセイ)。PCNA、そのローダー、Cdt2 などを siRNA でノックダウンし、集積がどう影響されるか検討した。

(4) Cdt2 を用いて、酵母 2 ハイブリッドスクリーニングにより、Cdt2 結合因子を同定した。また、Cdt2-FLAG 安定発現細胞株を作成し、FLAG レジンにより精製後、Cdt2 結合タンパク質を質量分析により解析した。

4. 研究成果

(1) 基質分解に必要なアミノ酸配列の同定

我々は、PCNA との結合に必要な PIP ボックスの変異および p21 タンパク質の PIP ボックスから 3-5 アミノ酸下流の塩基性アミノ酸残基 KRR に変異を導入すると分解が抑制されることを報告した (Nishitani et. al. EMBO J,

2006; Nishitani et. al., JBC, 2008)。p21 同様に Cdt1 も PIP ボックス下流 2-4 アミノ酸部位に RRR の塩基性アミノ酸を持つ。そこで、Cdt1 の 3 番目の R、4 番目の R に変異を導入し安定性をしらべたところ、両方のアミノ酸が分解に必要であることが分かった。一方、DNA リガーゼ I も 3-4 部位に KK アミノ酸を持つが、分解はされない。そこで、Cdt1 と DNA リガーゼで PIP-ボックスとその下流のキメラ変異体を作成し、分解に必要な配列あるいは分解を抑制するアミノ酸の特定を行なった。その結果、PIP-ボックス内の TD アミノ酸 (Q-x-x-[L, V, I, M]-T-D-[F, Y]-[F, Y]) が必要であること、また、3、4 番目の塩基性アミノ酸の隣に酸性アミノ酸があると (DNA リガーゼの場合グルタミン酸) 分解を抑制することが分かった。

以上のことをもとに、結晶構造解析が行なわれている p21 ペプチドと PCNA 複合体の解析をもとに、表面電荷より、TD 周辺による負電荷領域と PIP ボックス下流の 3、4 番目の塩基性アミノ酸領域が形成する正電荷領域が CRL4-Cdt2 により認識され分解されると考えた (図 1 参照)。

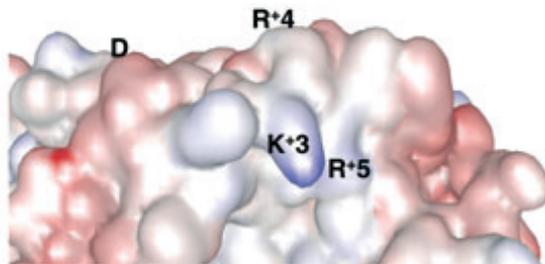


図 1

(2) Cdt1 分解における PCNA ローダーの関与

Cdt1 や p21 の分解は PCNA がクロマチンに結合したときのみ起こる。そこで PCNA のクロマチンのローディングに関わる 3 種の複合体 (RFC1-RFC, Ctf18-RFC および Elg1-RFC) がどのように関わるのか調べた。Cdt1 は、別のユビキチンリガーゼ CRL1-Skp2 によっても分解されるので、この系が機能しないように変異を導入し、また N 末 150 アミノ酸をもつ Cy-Cdt1 (1-150) を発現する細胞を用いた。RFC1, Ctf18 および Elg1 の発現を RNA 干渉法を用いてノックダウンし、Cy-Cdt1 (1-150) の安定化を調べたところ、Ctf18 をノックダウンしたときのみ、Cy-Cdt1 (1-150) の安定化が見られた。Ctf18 は染色体接着に関わることが知られているが、新たに、CRL4-Cdt2 による分解系にも関わっていることが明らかと

なった。Cy-Cdt1 を発現する細胞において Ctf18 をノックダウンすると 4C 以上の DNA 量を持つ細胞が出現したので、Ctf18-RFC は再複製の抑制においても重要な働きをすると結論した。

(3) UV 照射後の Cdt1 分解メカニズムの解析

① UV 照射による DNA 損傷はヌクレオチド除去修復系により修復される。この過程で PCNA がクロマチンにロードされ、Cdt1 の分解が誘導されると考えられた。そこで、ヌクレオチド除去修復の過程に欠損のある細胞を用いて Cdt1 の分解を調べた。損傷部位を切り出す過程で働く XPA に変異を持つ細胞では、Cdt1 の分解が抑制されることを見いだした。また、PCNA のローダーとして、S 期とは異なり RFC1-RFC が機能することを明らかにした。

② マイクロポアアッセイにより、Cdt1 および CRL4-Cdt2 は数分で DNA 損傷部位に集積していること、Cdt1 は、核内クロマチンに強く結合しているのではなく、損傷部位にリクルートされながら分解されることが分かった。また、siRNA を用いたノックダウンにより、PCNA 依存的に Cdt1 や CRL4-Cdt2 が DNA 損傷部位に集積すること、Cdt1 のリクルートは PIP ボックスに依存することを明らかにした。

(4) Cdt2 結合因子の探索

① 酵母 2 ハイブリッドスクリーニングによる探索： Cdt2 を N 末と C 末に分けて、これらをベイトとして結合因子のスクリーニングを行なった。

② Cdt2-FLAG 発現細胞からの結合因子の同定： FLAG 抗体レジンを用いて Cdt2-FLAG を精製し、質量分析により結合因子の探索を行なった。

これらの方法により、Cdt2 の C 末に PCNA が結合する結果を得た。PCNA には基質となる Cdt1 や p21 が、PIP ボックスを介して結合する。Cdt2 の C 末にも PIP ボックス様の配列があるので、この部位に変異を導入して解析を進行している。

(4) 考察

CRL4-Cdt2 の基質となる Cdt1 や p21 は PCNA 結合部位である PIP ボックスに加えて、PIP ボックス内の TD アミノ酸配列と PIP ボックス下流 3-4 の塩基性アミノ酸部位が構成する領域が認識され、ユビキチン化されて分解を受けることを明らかにした。DNA リガーゼも同様に PIP ボックス下流に塩基性アミノ

酸を持つが、隣に酸性アミノ酸を持つことにより分解されなくなっている。PCNA 結合タンパク質は、50種類近く存在すると言われていたが、それらのほとんどは、PCNA と結合してクロマチン複製・修復・形成など、それぞれの機能を発揮するため、分解されてはいけない。一方、Cdt1 や p21 は G1 期に機能して DNA 複製の準備（ライセンス化）や細胞周期進行の制御に重要な働きをするが、S 期が開始した後に存在すると、再複製や細胞周期の進行に悪影響を引き起こすので、分解されることが大切である。PCNA 結合タンパク質は、それぞれ正確に選別されて、機能するか、分解されるか決定されなければならない。このように、複製の開始とリンクした分解によるフィードバック制御が厳密に行なわれることにより染色体の安定性が維持されることが分かる。この識別の特異性がいかに行なわれるのか、今後 Cdt2 の結晶構造解析により明らかになると考えられる。

さらに我々は、PCNA ローダーが、状況によって使い分けられることを発見した。S 期の DNA 複製時には Ctf18-RFC が関わり（図2）、一方 UV 照射後のヌクレオチド除去修復の過程では RFC1-RFC が関わる（図3）。S 期 DNA 複製時には RFC1-RFC が PCNA をロードし DNA ポリメラーゼの働きを補助すること、また、Ctf18-RFC は複製された染色体の接着に関わることが報告されている。従って、S 期の Cdt1 の分解にも RFC1-RFC が関わりと予想されたが、Ctf18 が関わるという我々の結果は、全く予想していなかった新しい発見である。おそらく、RFC1-RFC によってロードされた PCNA は主に、DNA 複製に直接関わる因子の機能発揮のために使われ、一方、Ctf18-RFC

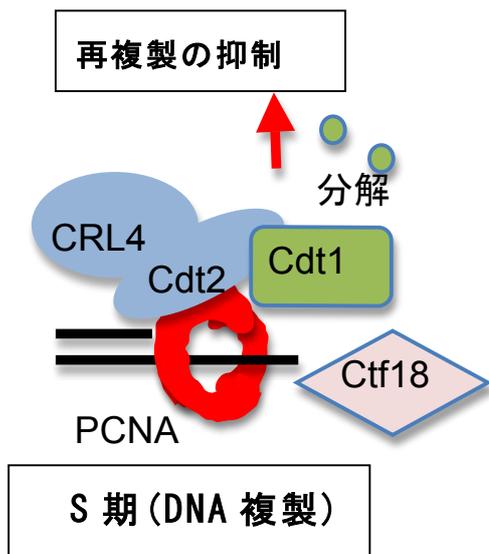


図2

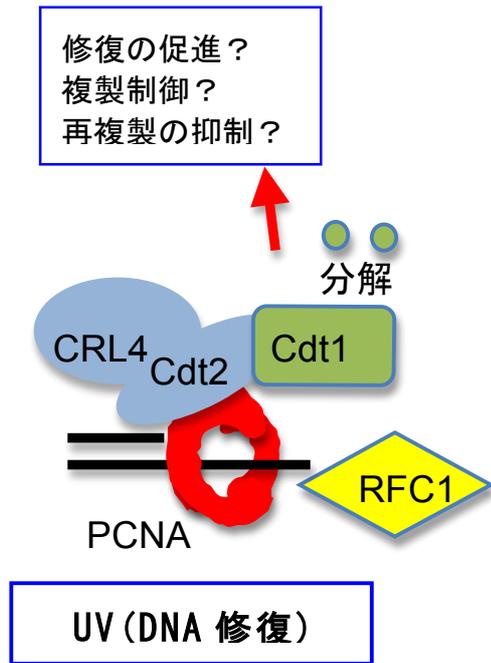


図3

は、染色体接着や Cdt1 の分解など別の機能のために働く PCNA と上手く共役させているのではないかと考えられる。このようにして、CRL4-Cdt2 による Cdt1 の分解は、PIP ボックスとその周辺が構成する特異な領域、さらに PCNA ローダーを使い分けることにより、厳密に選別され遂行されていることが明らかとなった。

S 期での Cdt1 の分解は、再複製の抑制に必須である（図2）。実際、Ctf18 をロックダウンすると再複製を起こしやすくなる結果を得ている。一方、DNA 損傷時の分解（図3）は、どのような生物学的意義があるのか未解決の状態である。Cdt1 は、UV 照射後、10分少々で分解される。DNA 損傷の修復は、数時間かかると言われていたので、Cdt1 の分解は修復系に先立ちおこる素早い反応である。修復を促進する効果があるのか、あるいは、分解されることにより複製のライセンス化を抑制し、複製の開始を抑制するのか、今後の解析が必要である。

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5件）

① Shiomi Y., Hayashi A, Ishii T, Shinmyozu K, Nakayama JI, Sugawara K, Nishitani H. Two different RFC proteins, Ctf18 and RFC1

separately control PCNA-CRL4Cdt2-mediated Cdt1 proteolysis during S phase and following UV-irradiation. *Mol Cell Biol.* 32: 2279-2288. 2012

② Stathopoulou A, Roukos V, Petropoulou C, Kotsantis P, Karantzelis N, Nishitani H, Lygerou Z, Taraviras S. Cdt1 is differentially targeted for degradation by anticancer chemotherapeutic drugs *PLoS One.*;7(3):e34621. Epub 2012 Mar 30. 2012

③ Roukos V, Kinkhabwala A, Colombelli J, Kotsantis P, Taraviras S, Nishitani H, Stelzer E, Bastiaens P, Lygerou Z. Dynamic recruitment of licensing factor Cdt1 to sites of DNA damage. *J Cell Sci.* 124(Pt 3):422-434, 2011

④ Michishita M, Morimoto A, Ishii T, Komori H, Shiomi Y, Higuchi Y, Nishitani H. Positively charged residues located downstream of PIP box, together with TD amino acids within PIP box, are important for CRL4(Cdt2)-mediated proteolysis. *Genes Cells.* 16(1):12-22, 2011

⑤ Ishii T, Shiomi Y, Takami T, Murakami Y, Ohnishi N, Nishitani H. Proliferating cell nuclear antigen-dependent rapid recruitment of Cdt1 and CRL4Cdt2 at DNA-damaged sites after UV irradiation in HeLa cells. *J Biol Chem.*;285(53):41993-42000, 2010

[学会発表] (計 19 件)

① Yasushi Shiomi, Akiyo Hayashi, Naohiro Suenaga, Miyuki Tanaka, Jun-ichi Nakayama, Kaoru Sugawara, Hideo Nishitani: New function of PCNA loaders, RFC1-RFC and Ctf18-RFC, in genome stability through PCNA-CRL4Cdt2 mediated Cdt1 degradation. 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日 (横浜)

② 村上祐輔、前田武志、岸ちひろ、松本雅記、中山敬一、塩見泰史、西谷秀男: M 期キナーゼ Plk1 は Cdk1-CyclinB とともにライセンス化因子 Cdt1 をリン酸化して M 期に分解から守る 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日 (横浜)

③ 石井健士、塩見泰史、西谷秀男: CRL4Cdt2 による Cdt1 のユビキチン化は Cdt2 の PCNA への結合を必要とする. 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日 (横浜)

④ 坂口洋貴、安谷賢識、林晃世、塩見泰史、西谷秀男: DNA 損傷時におけるユビキチンリガーゼ CRL4Cdt2 の活性化制御機構. 34 回日本分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日 (横浜)

⑤ 石井健士、塩見泰史、西谷秀男: PCNA-CRL4Cdt2 によるライセンス化因子

Cdt1 のユビキチン化機構の解析. 第 2 1 回 DNA 複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ 2011 年 10 月 26 日 (福岡)

⑥ 前田武志、村上祐輔、塩見泰史、西谷秀男: Plk1 による DNA 複製ライセンス化因子 Cdt1 の M 期安定化機構の解析. 第 2 1 回 DNA 複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ 2011 年 10 月 26 日 (福岡)

⑦ 林晃世、末永尚弘、塩見泰史、西谷秀男: DNA 複製時に機能する CRL4-Cdt2 によるユビキチン化反応の in vitro 再構成とその活性制御機構の解析. 第 2 1 回 DNA 複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ 2011 年 10 月 26 日 (福岡)

⑧ 森野公之、塩見泰史、西谷秀男: M 期の DNA 損傷に応答した Cdt1 分解による新規の DNA 損傷チェックポイントの可能性. 第 2 1 回 DNA 複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ 2011 年 10 月 26 日 (福岡)

⑨ 塩見泰史・西良太郎・菅澤薫・中山潤一・西谷秀男: 複製と損傷に応答して機能するユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 の制御機構、33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 8 日 (神戸)

⑩ 村上裕輔・岸ちひろ・松本雅記・中山敬一・塩見泰史・西谷秀男: Cdt1 の M 期安定化分子機構の解析、第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 8 日 (神戸)

⑪ 石井健士・塩見泰史・西谷秀男: ライセンス化因子 Cdt1 は PCNA 依存的に DNA 損傷部位に集積し分解される、第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 8 日 (神戸)

⑫ 坂口洋貴・安谷賢識・高見俊宏・塩見泰史・西谷秀男: DNA 損傷時におけるユビキチンリガーゼ CRL4Cdt2 の活性化制御機構、第 33 回日本分子生物学会年会 2010 年 12 月 8 日 (神戸)

⑬ Ishii T, Shiomi Y, Murakami Y, Nishitani H: Cdt1 and CRL4/Cdt2 were recruited rapidly to UV-induced DNA damage site dependent on PCNA-binding. The 7th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium 2010 (Toyama)

⑭ 塩見泰史、石井健士、道下雅人、高見俊宏、大西奈保、西谷秀男: 複製因子 PCNA に依存したユビキチン化システムによる染色体維持機能 第 31 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 12 日 (横浜)

⑮ 塩見泰史、石井健士、中山潤一、西谷秀男: 紫外線に応答したヒト Cu14-DDB1Cdt2 による細胞周期連携因子のユビキチン化と分解機構第 31 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 10 日 (横浜)

⑯ 石井健士、塩見泰史、大西奈保、西谷秀

男: DNA 損傷部位への Cul4/DDB1/Cdt2 複合体の基質認識サブユニット Cdt2 の局在化 31 回日本分子生物学会年会 2009 年 12 月 10 日 (横浜)

⑰ 高見俊宏、塩見泰史、西谷秀男: 細胞周期進行制御因子 Cdt2 の解析 第 20 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2009 年 11 月 1 日 (滋賀県彦根市)

⑱ 道下雅人、塩見泰史、西谷秀男: 染色体複製制御因子 Cul4-DDB1-Cdt2 ユビキチンリガーゼによる基質認識機構の解析 第 20 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2009 年 11 月 2 日 (滋賀県彦根市)

⑲ 塩見泰史、西谷秀男: 紫外線に応答したヒト Cul4-DDB1^{Cdt2} による Cdt1 のユビキチン化と分解機構 第 20 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ 2009 年 11 月 1 日 (滋賀県彦根市)

[図書] (計 1 件)

塩見泰史、西谷秀男、釣本俊樹 : CDK インヒビター-p21 の分解による細胞周期の制御 生体の科学 60, 527 - 532, 2009

[その他]

ホームページ等

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biolog/japanese/Top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西谷 秀男 (NISHITANI HIDEO)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・教授
研究者番号: 40253455

(2) 研究分担者

塩見 泰史 (SHIOMI YASUSHI)
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・助教
研究者番号: 80380567