

## 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 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770170

研究課題名（和文） ユビキチン修飾を介した DNA 複製フォーク制御機構の解析

研究課題名（英文） Regulation of DNA replication fork by protein ubiquitination

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）：

複製フォークに局在しフォークの進行を制御する、出芽酵母のユビキチンリガーゼ 2 種の働きを明らかにするために、結合する因子を出芽酵母ツーハイブリッド法を用いて探索し、結合因子の候補を得た。しかし、これらが出芽酵母内でユビキチンリガーゼによって分解されているという証拠は得られなかった。

複製因子 Ctf4 はこれらのユビキチンリガーゼの両方に結合する。Ctf4 の過剰発現に基づいた機能解析を行い、複製フォークの進行制御に重要な領域を同定した。

研究成果の概要（英文）：

In order to clarify the molecular function of two ubiquitin ligases, which localize at and regulate replication forks, associated proteins were screened by yeast two-hybrid screening. However, I could not obtain the evidence that these proteins are destabilized by the ubiquitin ligases in vivo.

Replication factor Ctf4 of budding yeast binds to both ubiquitin ligases. Through the over-expression analysis, novel functional domain of Ctf4 was identified.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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、ユビキチン修飾、ゲノム安定性、出芽酵母

1. 研究開始当初の背景

DNA 複製は多数の因子が関わり、複製に関

わる因子の転写レベル、リン酸化などの翻訳後修飾レベルなどによって高度に制御された複雑な反応である。細胞は DNA に傷害がある、あるいはヌクレオチド量が低下しているなどのストレス条件下でも DNA を完全に複製しなければならない。DNA 傷害などにより複製に遅延が生じると複製チェックポイントが活性化されて細胞周期の進行を遅延させること、また複製フォークを安定に停止させ、修復機構を活性化し、複製を再開させることが知られている。しかし、複製成分の構成成分が、複製チェックポイントによりどのような制御を受けているのかは未だ不明な点が多い。

ユビキチンを介した蛋白質分解経路は様々な生命現象に関わっており、細胞機能に重要な働きを持っている。ユビキチンリガーゼ E3 には多数の種類があり、その中に Cullin 型 E3 と呼ばれる複合体を形成して働くグループがある。Cullin 型 E3 は基本的に Ring-finger 蛋白質、Cullin、アダプター蛋白質、基質認識サブユニットからなる 4 量体から構成されている。真核生物は複数の Cullin を持つ。中でも Cul1 (出芽酵母 Cdc53) は最も知られた Cullin で基質認識蛋白質として F-box というモチーフを持った F-box 蛋白質を用いる。生物は多数の F-box 蛋白質を持っており (出芽酵母で 21 種、ヒトでは 70 種以上) これらを交換することによって基質蛋白質に対する多様性を生み出していると考えられ、それによって幅広い現象に関わっていると推測されるが、現時点で効率的な基質同定法が存在しないことに起因して、それらの基質蛋白質が不明なものも多く、機能不明なものが多い。

出芽酵母の F-box 蛋白質の一種である Dia2 はその欠失株が DNA 傷害剤に感受性を示すことから障害を持った DNA の複製に関与す

ることが示唆されていたがその働きは不明であった。最近、申請者は、出芽酵母の F-box 蛋白質の一種である Dia2 が、複製フォークの構成成分である Mrc1, Ctf4 および Mcm2 と直接結合して複製フォークに局在し、複製フォークの進行の制御に関与することを見いだした。しかしながらこれらの複製関連蛋白質はいずれも Dia2 の N 末端領域に存在する TPR モチーフに結合する。さらに TPR モチーフは特殊な条件下をのぞいては Dia2 の機能に必須ではないことを明らかにした。それに対して、C 末端領域に存在する LRR モチーフが Dia2 の機能に必須であることを見いだした。以上の結果は Dia2 が LRR モチーフで基質蛋白質を認識しユビキチン化を行っていることを強く示しており、LRR モチーフに結合する蛋白質を単離すれば Dia2 の基質蛋白質を同定できる可能性が高いことを示している。

また、出芽酵母の cullin の一種である Rtt101 についても傷害を持った DNA の複製に関与することが示唆されているが、その分子機構は不明である<sup>5,8</sup>。最近、申請者は Rtt101 の働きを理解するため Rtt101 と結合する蛋白質を複数同定した。これらの中には Dia2 と結合することを見いだしていた Ctf4 も含まれており、Ctf4 がこれらのユビキチンリガーゼの複製フォークへの局在に重要な働きを持つことを示唆している。

以上の結果は、複製制御においてもユビキチンシステムが重要な働きを持つことを示しているが、これらにユビキチンリガーゼがどのような蛋白質を基質としユビキチン化しているのか未だわかっていない。

## 2. 研究の目的

安定なゲノム維持には、DNA を正確に複製することが必須である。DNA 複製を行う複製フォークには多数の因子が存在し、様々な

制御を受けているがその機構は未知な部分が多い。申請者は、ユビキチンリガーゼ SCF<sup>Dia2</sup> 複合体が複製フォークに局在し、複製フォークの進行の制御に関わることを最近明らかに報告した。また、傷害を持った DNA の複製に関与する、出芽酵母の cullin の一種である Cul8 ついても Cul8 と結合する蛋白質を複数同定し報告した。本研究では、申請者がこれまで培ってきた DNA 複製研究に関わる技術、知見を生かして、これらの複製に関わるユビキチンリガーゼの標的蛋白質の同定を通じて、SCF<sup>Dia2</sup> および Cul8 複合体を含めたユビキチンリガーゼがどのように複製フォークの進行を制御しているのか、その分子機構を明らかにし、細胞増殖研究の一助となることを目指す。

### 3. 研究の方法

#### **Dia2 の結合蛋白質の同定**

申請者はこれまでに様々な欠失 Dia2 を用いて、Dia2 の機能に必要な領域の解析を行い、Dia2 の中央部に位置する F-box と、C 末端領域に位置する LRR モチーフが Dia2 の機能に必要なことを見いだした。この結果は Dia2 が基質蛋白質を LRR モチーフで認識しユビキチン化を行っていることを強く示している。そこで、この情報を元に、Dia2 の LRR モチーフに結合する蛋白質を探索し、Dia2 の基質の同定を目指す。

また、Dia2 の LRR モチーフを出芽酵母内で過剰発現させ、結合する蛋白質を生化学的に単離し質量分析で同定する生化学的アプローチも行う。

#### **Cul8 の結合蛋白質の解析**

Cul8 複合体のさらなる構成蛋白質を明らかにする。そこで、エピトープタグを付加した Cul8 を発現する酵母株を作成し、生化学的手法と質量分析によって結合する蛋白質を同

定する。得られた蛋白質の Cul8 結合部位を決定することにより、Cul8 結合のコンセンサス配列を推定し、配列からさらに Cul8 結合蛋白質の同定を目指す。Cul8 が E3 ユビキチンリガーゼとして働く際これらの蛋白質がどのように機能するのか？特にこれらの蛋白質のうちどれが基質認識サブユニットなのか？を今後調べていく。

### 4. 研究成果

#### (1) Dia2 の結合蛋白質の同定

DNA 複製を行う複製フォークには多数の因子が存在し、様々な制御を受けているがその機構は未知な部分が多い。申請者は、ユビキチンリガーゼ SCF<sup>Dia2</sup> 複合体が複製フォークに局在し、複製フォークの進行の制御に関わることを報告した。本研究では、SCF<sup>Dia2</sup> 複合体を含めたユビキチンリガーゼがどのように複製フォークの進行を制御しているのか、その分子機構を明らかにすることを目指す。これまでに様々な欠失 Dia2 を用いて、Dia2 の機能に必要な領域の解析を行い、Dia2 の中央部に位置する F-box と、C 末端領域に位置する LRR モチーフが Dia2 の機能に必要なことを見いだした。この結果は Dia2 が基質蛋白質を LRR モチーフで認識しユビキチン化を行っていることを強く示している。LRR モチーフのどの領域が Dia2 の機能に必要なかを調べるために C 末端を欠いた様々な長さの Dia2 変異体を dia2 欠失株に発現させ DNA 傷害剤に対する感受性を調べたところ 1-733 アミノ酸があれば Dia2 に機能があることがわかった。この領域を用いてイーストツーハイブリッドスクリーニングを行い 10 数個の結合因子を同定した。これらの中にはヒストンシャペロンである Nap1, Vps75, Rtt106 などが含まれており Dia2 のクロマチン構造を介した複製フォーク制御

の関与が考えられる。これらの結合因子が Dia2 の基質となるかどうかを調べた。組み替えタンパク質を用いた *in vitro* のユビキチン化反応を行ったところこれらの因子のほとんどすべてが *in vitro* で SCFDia2 によってユビキチン化を受けた。次にこれらの因子が *in vivo* で SCFDia2 の基質となっているかどうか調べるために、細胞内でのタンパク質の安定性を調べたところこれらはいずれも安定なタンパク質であり、Dia2 を欠失させても安定性に影響は認められなかった。この結果からはこれらの因子が SCFDia2 の基質であるという証拠を得ることができなかった。しかし、複製フォークの近傍に存在する極少量の因子が Dia2 によって分解されている可能性を否定することはできず、基質でないと断言することはできない。

また、*dia2* や *cul8* 変異株において RNR と呼ばれるタンパク質の増大が認められるという知見を得たため、このタンパク質がユビキチンリガーゼの基質であるかどうか検証を行ったが、RNR がこれらのユビキチンリガーゼの基質であるという証拠は得られなかった。

## (2) 複製因子 Ctf4 の機能解析

Dia2 の N 末端にある TPR モチーフと、Rtt101 複合体のサブユニット Mms22 はいずれも複製フォークの構成タンパク質である Ctf4 と結合していることを示した。Ctf4 がこれらユビキチンリガーゼの複製フォーク局在のための足場となっていることが考えられる。Ctf4 は過剰発現により増殖阻害を引き起こすがその機構はわかっていない。私たちは Ctf4 の過剰発現により S 期に遅延が起きること、複製ストレスに感受性となることを明らかにした。様々な Ctf4 断片を過剰発現させ細胞増殖への影響を調べたところ C

末端の 27 アミノ酸を欠くと過剰発現しても増殖阻害を引き起こさないことがわかった。Ctf4 と結合する複製因子をツーハイブリッド法で調べたところ、今まで結合が知られていた Pol1, Sld5, Ctf4, Dia2 のほか、Cdc45, Mcm2, Mrc1 との結合が確認された。これらのうち Cdc45, Mcm2 は Ctf4 の C 末端 27 アミノ酸が結合に必要であった。以上の結果より、Ctf4 の過剰発現は Cdc45, Mcm2 との過剰な結合を介して増殖阻害を引き起こすことを考えている。これらの結果は複製フォークの制御機構の一端を反映していると思われる。

3) 出芽酵母ユビキチンリガーゼの機能解析  
出芽酵母機能未知 F-box タンパク質 Roy1/Roy1/Ymr258c の細胞内膜輸送に関する機能解析と、出芽酵母 SCF を利用した目的タンパク質分解系の改良に携わった。

## 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 1 件)

① Liu Y., Nakatsukasa K., Kotera M., Kanada A., Nishimura T., Kishi T., Mimura S., Kamura T.  
Non-SCF-type F-box protein Roy1/Ymr258c interacts with a Rab5-like GTPase Ypt52 and inhibits Ypt52 function  
Molecular Biology of the Cell 22, 1575-1584, 2011 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

① 三村 覚、橋本 吉民、滝澤 温彦  
Possible role of *Xenopus* Mcm3 and 6 isoforms during development  
第 34 回日本分子生物学会年会 ワークショップ (座長)  
2011 年 12 月 16 日 パシフィコ横浜 (神奈川)

② 中島 美恵、滝澤 温彦、三村 覚  
Analysis of cell growth defect by Ctf4 over expression in budding yeast  
第 34 回日本分子生物学会年会 一般口頭発

表

2011年12月15日 パシフィコ横浜（神奈川県）

③小畑 有以、西村 浩平、三村 覚、 滝澤 温彦、鐘巻 将人

Functional Proteomics using an improved auxin-inducible degron (AID) system

第 34 回日本分子生物学会年会 一般口頭発表  
2011 年 12 月 13 日 パシフィコ横浜（神奈川県）

④三村 覚

複製異常とレトロトランスポジション活性化

遺伝研研究集会（招待講演）

2011 年 10 月 15 日 国立遺伝学研究所（静岡）

⑤Satoru Mimura and Takumi Kamura

UBIQUITIN LIGASES INVOLVED IN THE REGULATION OF DNA REPLICATION IN BUDDING YEAST

The 7<sup>th</sup> 3R meeting, 2010 年 10 月 29 日 アナクラウンホテル富山

## 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