

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390072

研究課題名(和文) DNA複製開始制御における新規機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of novel mechanism for regulation of DNA replication start

研究代表者

丹伊田 浩行(Niida, Hiroyuki)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20336671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,400,000円

研究成果の概要(和文)：HBO1は細胞周期の促進因子であるがDNAダメージ下におけるの制御機構は良く解っていないかった。我々は細胞周期を抑制するためにDNAダメージ後、HBO1が分解されることを証明した。HBO1 Ser50/53はUV照射後ATM/ATRによりリン酸化され、CRL4/DDB2によりユビキチン化される。Ser50/53をアラニンに変異させたHBO1変異体はUV照射後、ヒストンH3 Lys14のアセチル化を維持し、細胞周期制御を失わせた。これらの結果はHBO1がDNAダメージチェックポイントの標的であり、ユビキチン依存的HBO1分解はUVに対する生存率に寄与することを示していた。

研究成果の概要(英文)：HBO1 plays positive regulation for cell proliferation under unperturbed condition, whether there is regulation mechanism of HBO1 under DNA damage is poorly understood. We demonstrated that HBO1 was degraded after DNA damage to suppress cell proliferation. Ser50 and Ser53 of HBO1 were ATM and ATR-dependently phosphorylated after UV treatment. ATM/ATR-dependent phosphorylated HBO1 preferentially interacted with DDB2 and was ubiquitinated by CRL4DDB2. Replacement of endogenous HBO1 to Ser50/53Ala mutants maintained acetylation of histone H3K14 and impaired cell cycle regulation in response to UV. These results indicated that HBO1 is one of the targets by DNA damage checkpoint. These results show that ubiquitin-dependent control of HBO1 protein contributes to cell survival toward UV irradiation.

研究分野：細胞周期

キーワード：HBO1 DDB2 ユビキチン UV

1. 研究開始当初の背景

細胞が増殖するにあたり、一回の分裂につき正確に一度だけ全 DNA 領域を複製しなければならない。哺乳動物細胞は短時間に長大な DNA を複製する為に、多くの複製起点から DNA 合成を開始する。DNA に損傷を生じた時には複製起点からの発火を抑制する必要があるが、その機構の詳細に付いては良く解っていない。アフリカツメガエルの実験系を用いた研究から、真核生物の複製開始には複製開始領域へライセンス化された複製酵素を含む一連の因子が集合し DNA 合成を開始することが明らかにされている。pre-RC の形成においては、Cdc6 と Cdt1 に依存して複製起点に Mcm 複合体がロードされる。最近この Mcm 複合体のローディングを促す因子としてヒストンアセチルトランスフェラーゼ、HBO1 が同定された (Miotto B and Struhl K, Genes & Development. 2008)。HBO1 のこの機能は特に癌細胞で顕著であるが、細胞内で HBO1 が如何に制御されているのかは不明である。

2. 研究の目的

複製開始機構を調節する因子として HBO1 に着目し、DNA 損傷や阻害に際して HBO1 が ATM/ATR 依存的なリン酸化修飾を受けていることを見出した。このリン酸化は HBO1 活性を負に制御していることが推測され、本研究でこの分子機構を明らかにすることは Pre-RC 形成機構の理解に重要と考えている。

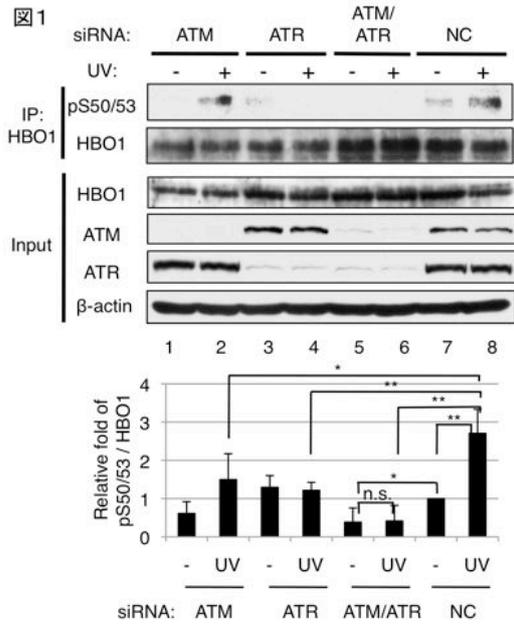
3. 研究の方法

HBO1 の ATM/ATR 依存的なリン酸化を阻害した時に pre-RC 形成が抑制されるかを明らかにする。また、この pre-RC 形成抑制機構が如何なる仕組みを伴って実行されるのか、分子的作用機序について HBO1 リン酸化部位変異体を細胞内に発現させることで検討を進める。さらにこの機構が阻害された場合に、細胞内の DNA 安定性の維持が損なわれるかを検討、癌細胞と正常細胞においてこの機構への依存度を比較し、発癌との関係に迫る。

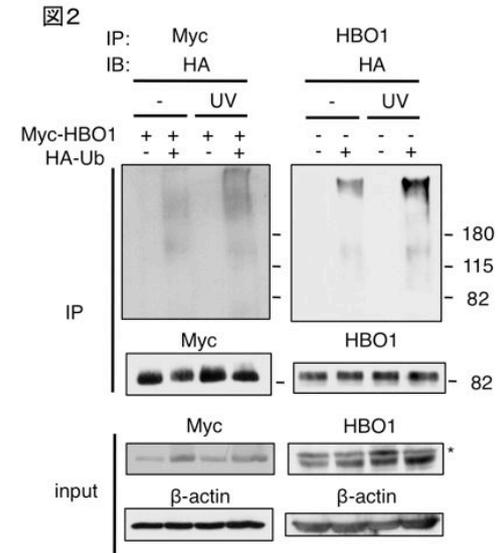
4. 研究成果

HBO1 は複製起点に pre-RC 複合体形成を促すヒストンアセチルトランスフェラーゼである。Pre-RC 形成は MCM2-7 複合体のローディングをもって完了する。HBO1 は CDT1 依存的に複製起点周辺のヒストン H4 をアセチル化し、クロマチン構造を変換する。一方、ヒストン H3 のアセチル化の意義については明らかになっていなかった。HBO1 は平常、細胞周期の促進因子であるが、DNA ダメージ下においての制御機構は良く解っていなかった。我々は細胞周期を抑制するために DNA ダメージ後、HBO1 が分解されることを証明した。HBO1 Ser50/53 は UV 照射

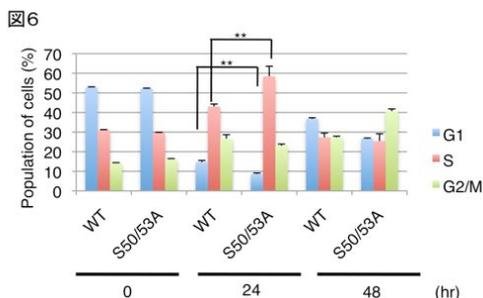
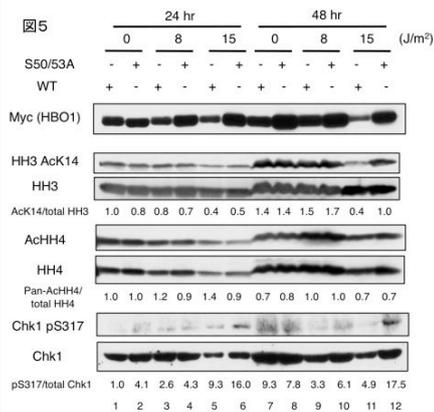
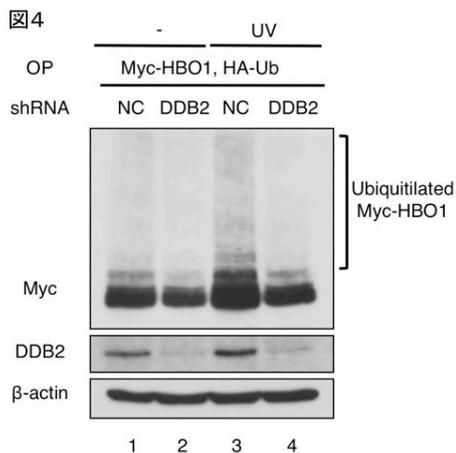
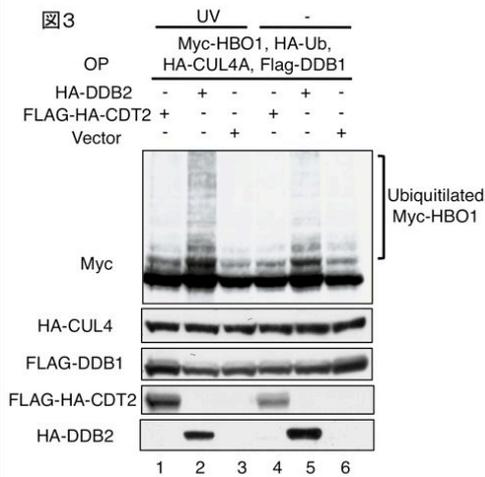
後チェックポイントタンパクである ATM/ATR によりリン酸化された (図 1)



このリン酸化された HBO1 は速やかにユビキチン化される事が明らかになった。(図 2)。



我々は HBO1 と結合し複製起点にリクルートする CDT1 が UV 照射後に CUL4/CDT2 により分解されること、また UV 照射後に CUL4/DDB2 が活性化することから基質認識サブユニットについて CDT2 と DDB2 を候補とし細胞内においてユビキチン化アッセイを行った。すると HBO1 は CUL4/DDB2 によりユビキチン化されることがわかった (図 3)。この DDB2 における作用が内在性の HBO1 分解においても見られるか、内在性 DDB2 をノックダウンした細胞で UV 照射後の HBO1 のユビキチン化を検討すると DDB2 ノックダウン細胞内の HBO1 はユビキチン化が抑えられていた (図 4)。



Ser50/53 をアラニンに変異させた HBO1 変異体は UV 照射後、ヒストン H3 Lys14 のアセチル化を維持し、細胞周期制御を失わせた (図 5、6)。

これらの結果は HBO1 が DNA ダメージチ

ェックポイントの標的であり、ユビキチン依存的 HBO1 分解は UV に対する生存率に寄与することを示していた。

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 2 件)

1. Matsunuma R, Niida H, Ohhata T, Kitagawa K, Sakai S, Uchida C, Shiotani B, Matsumoto, M, Nakayama KI, Ogura H, Shiiya N and Kitagawa M.: UV Damage-Induced Phosphorylation of HBO1 Triggers CRL4DDB2-Mediated Degradation to Regulate Cell Proliferation. Mol Cell Biol. In press.

(RM and HN contributed equally, HN corresponding author)

2. Niida H, Kitagawa M.: Regulation of DNA replication licensing. Curr Drug Targets. 13:1588-1592, 2012

[学会発表] (計 10 件)

1. DDB2-dependent HBO1 recruitment is required for efficient repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimmer. IMB conference 2015 [ポスター] (MAINZ, GERMANY)
2. ATM/ATR-dependent phosphorylation dissociates HBO1 from replication origin, Cold Spring Harbor Lab meeting, 2014 [ポスター] (COLD SPRING HARBOR, USA)
3. DDB2-dependent HBO1 recruitment is required for efficient repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimmer、日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 [ポスター] 鹿児島
4. DDB2-dependent HBO1 recruitment is required for efficient repair of

UV-induced cyclobutane
pyrimidine dimer、第73回日本
癌学会学術総会、2014年9月
[一般口演] 横浜

5. ATM/ATR-dependent
phosphorylation dissociates HB01
from replication origin、第37
回日本分子生物学会年会、2014
年11月[一般口演、ポスター] 横
浜

6. Regulation of Licensing by Cell
Cycle Checkpoint、第65回日本細
胞生物学会大会、2013年6月
[招待講演] 名古屋

7. UV 損傷における複製ライセンスフ
ァクターの制御、日本放射線影響学
会第56回大会、2013年10月
[ポスター] 青森

8. ATM/ATR-dependent
phosphorylation dissociates HB01
from replication origin、第36
回日本分子生物学会年会、2013
年12月[ポスター] 神戸

9. ATM/ATR-dependent
phosphorylation of HB01 is
required for HB01 dissociation
from replication origin、第71回
日本癌学会学術総会、2012年9月
[ポスター] 札幌

10. ATM/ATR-dependent
phosphorylation of HB01
suppresses pre-RC formation
after DNA damage、第35回日本分
子生物学会年会、2012年12月[ポ
スター] 福岡

[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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
丹伊田 浩行 (NIIDA, Hiroyuki)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20336671