

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291025

研究課題名(和文) PCNAサイクルと連動したタンパク質分解による複製制御

研究課題名(英文) Regulation of DNA replication through proteolysis coupled with PCNA cycle

研究代表者

西谷 秀男(Nishitani, Hideo)

兵庫県立大学・生命理学研究科・教授

研究者番号：40253455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：CRL4-Cdt2はユビキチン化酵素で、DNA複製のライセンス化因子Cdt1の分解により再複製を抑制する。本研究では、S期が開始するとCRL4-Cdt2がCdt2のC末を介してPCNAと結合して素早い分解に関わることを示した。精製Cdt2はPCNAと直接結合した。一方、サイクリン-CDKはCdt2をリン酸化し、PCNAとの結合を抑制する結果を得た。よって、CRL4-Cdt2の活性は細胞周期の進行に応じて制御されている。また、紫外線照射後のCdt1分解には、ヌクレオチド除去修復に加えてミスマッチ修復系も関わり、損傷修復を円滑に行うために必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The CRL4-Cdt2 ubiquitin ligase plays an important role to prevent re-replication by targeting Cdt1 for degradation. In this project, we demonstrated that C-terminus of Cdt2 contributes to its association with PCNA upon initiation of S phase for rapid Cdt1 degradation. Purified proteins confirmed that the interaction is direct. On the other hand, Cdt2 is phosphorylated by cyclin-CDKs, which appeared to be important to inhibit its interaction with PCNA. Thus, CRL4-Cdt2 activity is regulated through the cell cycle. In addition, we showed that in response to UV damage, not only nucleotide repair but also mismatch repair participate in Cdt1 degradation for efficient repair of UV damages.

研究分野：分子生物学

キーワード：タンパク質分解 ゲノムDNA 複製 修復 細胞周期

## 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伝達により成り立つ。クローン生物の作成や iPS 細胞を作成し各種細胞に分化させることが可能なのも、受精時の遺伝情報・ゲノムを正しく受け継いでいるからである。染色体の複製は、G1 期に Cdt1 や Cdc6 により DNA ヘリカーゼである MCM2-7 が染色体にロードされ、複製起点がライセンス化されて開始する。我々は分裂酵母を用い、Cdc6 や Cdt1 を高発現させると、細胞が過剰複製（再複製）を引き起こすことを初めて発見し、これらの因子の制御が複製を一回に限定する制御機構において中心的役割を果たしていることを証明した（1. Nishitani & Nurse, Cell, 1995; 2. Nishitani et al, Nature, 2000）。

これらの結果を踏まえ、ヒト細胞での過剰複製は病気の原因になるのではと考え、ヒト Cdt1 をクローニングし、ヒト Cdt1 は S 期が開始した以降速やかに分解されること、過剰発現すると再複製が起こることを明らかにした。また、Cdt1 を高発現すると細胞のがん化が誘導されることも報告された。そこで Cdt1 の分解機構に注目して研究を進め、S 期に入ると独立に機能する 2 種類の E3 ユビキチンリガーゼにより素早く分解されることを明らかにした（3. Nishitani et al. EMBO J, 2006）。その一つは、これまでに知られていたユビキチンリガーゼ SCF-Skp2 で、もう一つは、複製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である。この新規な系では、複製が始まり PCNA がクロマチンにロードされると、Cdt1 が、N 末端の PIP-ボックス (PCNA-Interacting Protein box) を介して PCNA に結合し、CRL4 複合体によりユビキチン化される。この新規な分解システムは、我々を含め 5 つのラボが、ほぼ同時に報告した。続いて、CRL4 に結合して基質認識に関わるタンパク質 Cdt2 が同定され、さらに Cdt2 のノックダウンが再複製を起こすことが示されるなど、CRL4-Cdt2 による再複製抑制機構が注目された (Review: 4. Havens et al, Genes Dev. 2011) (注: Cdt1, Cdt2 共に、酵母 *Cdc10 dependent transcript1, 2* に由来する)。

Cdt1 はまた、UV などによる DNA 損傷後にも CRL4-Cdt2 により素早く分解される。DNA 損傷部位に PCNA が集積すると Cdt1、CRL4-Cdt2 が数分でリクルートされ Cdt1 が分解される。CRL4-Cdt2 は、修復と DNA 複製の両面でゲノム維持に関わる重要な因子と考えられる。

そして、PCNA 依存の CRL4-Cdt2 の基質

として、Cdt1 のほかに CDK インヒビター-p21 を報告したが、その後、ヒストン H4K20 モノメチル化酵素 Set8 も新たな基質として報告された。これらも DNA の再複製や細胞周期進行におけるゲノム制御に関わることが示されている。

## 2. 研究の目的

CRL4-Cdt2 による分解系は、ライセンス化因子 Cdt1 が機能する G1 期では作動しないが、複製開始により PCNA がクロマチンに結合すると、Cdt1 を分解し再複製を抑制するという合理的なフィードバック制御系を形成する。このとき、複製が開始したのち、Cdt1 が再度機能しないように素早く分解しないといけない。本研究では、どのようにして PCNA がクロマチンにロードされると、効率よく素早く特異的に分解されるのか明らかにする。そして、Cdt2 は細胞周期の S 期以降において高度にリン酸化されており、活性制御に関わっていると予想される。さらに、紫外線照射などによる DNA 損傷を受けた際にも素早く分解されることの意義も合わせて追求する。

## 3. 研究の方法

### (1) タンパク質の精製

CRL4-Cdt2 複合体および Cdt1 タンパク質は、昆虫細胞を用いて発現し精製した。PCNA および RFC ローダータンパク質は大腸菌で発現させ精製した。

### (2) DNA ビーズの調整

ssDNA にビオチン化オリゴ DNA をアニールし DNA 合成およびライゲーションにより 2 本鎖 DNA を作成した。アビジンによりビーズに結合させた。制限酵素によりニックを導入した。

### (3) Cdt2 変異体の作成と発現

C 末欠損 Cdt2 は PCR 法にて作成した。点突然変異体は、Quick change 法 (Stratagene 社) を用いた。18 箇所の CDK リン酸化予想部位に変異を導入した Cdt2-18A は、遺伝子合成にて作成した。それぞれ、FLAG タグを融合して発現するように構築した。これらの発現プラスミドを PEI 法にてヒト細胞 (HEK293 および U2OS 細胞) に導入し、G418 で選択することにより安定発現細胞を樹立した。

### (4) 発現タンパク質の検出

細胞内で発現されたタンパク質は、それぞれのタンパク質あるいはタグに対する抗体を用いてウエスタンブロッティング法あるいは免疫染色法にて検出した。

### (5) RNA 干渉法

Cdt2、Msh2、Msh6、XPA の発現を抑制するため、それぞれに対する siRNA を細胞に導入した。導入試薬は Hiperfect (Qiagen 社) を利用した。

### (6) 紫外線照射

細胞の培地を除去し、UV-cross linker (Funakoshi 社) あるいは UV ランプ (QSP 社)

により適量の紫外線を照射した。培地を戻し一定時間細胞を培養した。

#### 4. 研究成果

(1) ユビキチン化反応を素反応レベルで解析するため精製タンパク質を用いた invitro 系の開発を行った。Cdt2 の C 末に FLAG タグを付け、昆虫細胞に Cul4A, DDB1, Rbx1 発現ウイルスと同時感染させて精製することにより、4 構成タンパク質をほぼ等量含む複合体が精製できた。これを用いて、精製 PCNA と DNA を混合して、Cdt1 のユビキチン化を検出する簡便法を確立して論文にて発表した。

続いて、PCNA を DNA にロードした系の構築を行った。ニックを入れたプラスミドを結合したビーズに PCNA をロードして解析したところ、CRL4-Cdt2 は、基質がなくても DNA 上の PCNA と直接結合することを見出した。これは、後述する PCNA 結合配列部位を介している。

(2) 酵母 2 ハイブリッドスクリーニングにより、Cdt2 の C 末が PCNA と結合することを見つけた。C 末端に PCNA 結合配列が見つかり、この部位に変異を入れると PCNA との結合がなくなった。これまで、Cdt1 などの基質が PCNA に結合し、その後、CRL4-Cdt2 がリクルートされると考えられていたが、CRL4-Cdt2 は直接 PCNA に結合して機能することにより迅速な分解をもたらすと考えられた。

(3) Cdt2 は、S 期が開始したのち、M 期にかけて高度にリン酸化される。Cdt2 の C 末領域には CDK のリン酸化コンセンサス配列が 18 箇所存在する。まず、サイクリン A-Cdk2 およびサイクリン B-Cdk1 を用いて、Cdt2 がリン酸化されることを確認した。18 箇所に変異を導入(Cdt2-18A)して細胞で発現させると、S 期から M 期にかけて見られたリン酸化がほぼ抑制されていた。免疫染色を行うと野生型に比べて PCNA フォーサイに強く結合していた (図 1 参照)。その結果、Cdt1 に対するユビキチン化活性の上昇が見られた。

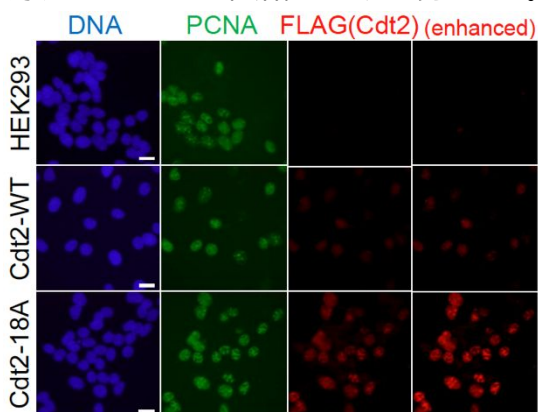


図 1 Cdt2 と PCNA の共局在

細胞周期の S 期後期/G 2 期から CRL4-Cdt2 の基質である Set8 や TDG の蓄積が始まるが、Cdt2-18A 発現細胞ではそのような蓄積が抑制されていた。よって Cdt2 のリン酸化は、

PCNA との結合を抑制することにより CRL4-Cdt2 による分解を抑えらると思われた。これにより、G 2 期からの基質の蓄積を可能にしているという新たな知見を得た。M 期において紫外線照射後の Cdt1 分解が起こらなかったが、Cdt2-18A 発現細胞では、予想通り分解が見られた。

(4) 紫外線照射後、Cdt1 は 10 分程度で分解される。この分解の意義を確かめるため研究を進めた。まず、M 期に同調した細胞では PCNA はクロマチンに結合していたが、Cdt1 の分解は見られなかった。これは前述の通り、少なくとも、Cdt2 のリン酸化によることがわかった。M 期に紫外線照射を受けた細胞が G 1 期に進行すると、Cdt1 の分解が起こり、その結果、複製のライセンス化が抑制された。このような細胞は、G 1 期に停止する様子が見られ、G 1 期に紫外線照射を受けた細胞より生存率が上昇していた。我々は、哺乳動物細胞は、M 期 DNA 損傷に应答した“ライセンス化チェックポイント機能”を持つと提唱した。

紫外線照射後の Cdt1 分解は、ヌクレオチド除去修復(NER)の過程で PCNA がロードされることにより起こることを我々も含め報告した。NER 欠損の XPA 細胞では、Cdt1 の分解が抑制されるが、さらに精査すると、1 時間後には分解されることを見出した。別の修復機構が機能しているのではないかと考えた。ノックダウン実験を行い、ミスマッチ修復(MMR)系が関わることを見出した。MMR に関わる Msh2 および Msh6 タンパク質は、XPA 細胞でも遅れて集積することを確認した。これらの MMR タンパク質をノックダウンするとさらに分解が遅れた。そして、MMR タンパク質を単独でノックダウンした場合でも、XPA 単独でノックダウンした場合と同レベルで分解の抑制が見られた。従って、MMR は本来 S 期で機能するが、G 1 期でも新規な機能(non-canonical MMR)を持つことを報告した。さらに、CRL4-Cdt2 の基質である Cdt1 を高発現すると、損傷修復複製が阻害されることを確認した。よって、損傷後の Cdt1 をはじめとした基質の分解は、修復過程を促進するために重要であると考えられた。

#### 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 11 件)

Nukina K, Hayashi A, Shiomi Y, Sugasawa K, Ohtsubo M, Nishitani H. Mutations at multiple CDK - phosphorylation consensus sites on Cdt2 increase the affinity of CRL4<sup>Cdt2</sup> for PCNA and its ubiquitination activity in S phase. 査読有 Genes Cells 23(3):200-213. 2018 doi: 10.1111/gtc.12563.

Tanaka M, Takahara M, Nukina K, Hayashi A, Sakai W, Sugasawa K, Shiomi Y, Nishitani H:

Mismatch repair proteins recruited to ultraviolet light-damaged sites lead to degradation of licensing factor Cdt1 in the G1 phase. *Cell Cycle*. 査読有 2017 Apr 3;16(7):673-684. doi: 10.1080/15384101.2017.1295179.

Niida H, Matsunuma R, Horiguchi R, Uchida C, Nakazawa Y, Motegi A, Nishimoto K, Sakai S, Ohhata T, Kitagawa K, Moriwaki S, Nishitani H, Ui A, Ogi T, Kitagawa M. Phosphorylated HBO1 at UV irradiated sites is essential for nucleotide excision repair 査読有 *Nat Commun*. 2017 Jul 18;8:16102. doi: 10.1038/ncomms16102.

Shiomi Y, Nishitani H: Control of Genome Integrity by RFC Complexes; Conductors of PCNA Loading onto and Unloading from Chromatin during DNA Replication. *Genes* (Basel). 査読有 2017 Jan 26;8(2). pii: E52. doi: 10.3390/genes8020052. Review. PMID: 28134787

Nakamura T, Murakami K, Tada H, Uehara Y, Nogami J, Maehara K, Ohkawa Y, Saitoh H, Nishitani H, Ono T, Nishi R, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Thymine DNA glycosylase modulates DNA damage response and gene expression by base excision repair-dependent and independent mechanisms. 査読有 *Genes Cells*. 2017 Apr;22(4):392-405. doi: 10.1111/gtc.12481. Epub 2017 Mar 20. PMID: 28318075

Morino M, Nukina K, Sakaguchi H, Maeda T, Takahara M, Shiomi Y, Nishitani H. Mitotic UV Irradiation Induces a DNA Replication-Licensing Defect that Potentiates G1 Arrest Response. 査読有 *PLoS One*. 2015 Mar 23;10(3):e0120553. doi: 10.1371/journal.pone.0120553. eCollection.

Domingues SC, Konietzko U, Henriques AG, Rebelo S, Fardilha M, Nishitani H, Nitsch RM, da Cruz E Silva EF, da Cruz E Silva OA. RanBP9 Modulates AICD Localization and Transcriptional Activity via Direct Interaction with Tip60. 査読有 *J Alzheimers Dis*. 2014 Jan 1;42(4):1415-33. doi: 10.3233/JAD-132495.

Morino M, Tanaka M, Shiomi Y, Nishitani H. Imaging analysis to determine chromatin binding of licensing factors MCM2-7 in mammalian cells. 査読有 *Methods Mol Biol*. 2014;1170:529-37. doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2\_29.

Hayashi A, Suenaga N, Shiomi Y, Nishitani H. PCNA-dependent ubiquitination of Cdt1

and p21 in mammalian cells. 査読有 *Methods Mol Biol*. 2014;1170:367-82. doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2\_19.

Shiomi Y, Suenaga N, Tanaka M, Hayashi A, Nishitani H: Imaging analysis of cell cycle-dependent degradation of Cdt1 in mammalian cells. 査読有 *Methods Mol Biol*. 2014;1170:357-65. doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2\_18.

Shiomi Y, Suenaga N, Tanaka M, Hayashi A, and Nishitani H: Imaging analysis of cell cycle-dependent degradation of Cdt1 in mammalian cells. 査読有 *Methods Mol Biol*. 2014;1170:357-65. doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2\_18.

#### [学会発表](計20件)

塩見 泰史, 織田 里美, 佐藤 護, 夏目 豊彰, 鐘巻 将人, 西谷 秀男 RFC 複合体によるDNAへのPCNA着脱と連係した細胞内機能の解析 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日 - 9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

林 晃世, 石井 健士, 末永 尚弘, 高原 教代, 塩見 泰史, 西谷 秀男 ゲノム複製を制御するユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2はPCNAと直接結合して機能する 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日 - 9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

貫名 康平, 塩見 泰史, 西谷 秀男 ゲノム維持に関わる E3ユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2の基質認識サブユニット Cdt2のリン酸化による制御の解析 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日 - 9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

荻野 寛行, 植田 麻紗子, 林 晃世, 塩見 泰史, 西谷 秀男 Cdt2-PCNA融合体は CRL4Cdt2の抑制制御を損なう 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日 - 9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

高原 教代, 田中 美如, 貫名 康平, 林 晃世, 酒井 恒, 菅澤 薫, 塩見 泰史, 西谷 秀男 紫外線照射による G1期 CRL4Cdt2の活性化におけるミスマッチ修復系の関与 2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 2017年12月6日 - 9日 神戸ポートアイランド (兵庫県)

貫名 康平, 塩見 泰史, 西谷 秀男 E3ユビキチンリガーゼ CRL4Cdt2の基質認識サブユニット Cdt2のリン酸化による制御の解析 第39回 日本分子生物学会年会 2016年11月30日 - 12月2日 パンフィコ横浜 (神奈川県)

高原 教代, 末永 尚弘, 石井 健士, 林 晃世, 塩見 泰史, 西谷 秀男 ゲノム複製を制御

するユビキチンリガーゼCRL4-Cdt2のPIP  
ボックスの役割\_細胞での解析 第39  
回 日本分子生物学会年会 2016年  
11月30日-12月2日 パシフィコ  
横浜(神奈川県)

北詰麻衣、熊田ちひろ、村上裕輔、前田  
武志、塩見泰史、西谷秀男 DNA複製ライ  
センス化因子Cdt1はM期にリン酸化され、  
分解から保護される 第39回 日本分  
子生物学会年会 2016年11月30  
日-12月2日 パシフィコ横浜(神奈川  
県)

林晃世、高原 教代、末永尚弘、石井健士、  
高橋達郎、塩見泰史、西谷秀男 ゲノ  
ム複製を制御するユビキチンリガーゼ  
CRL4-Cdt2のPIPボックスの役割\_試験管  
内解析 第39回 日本分子生物学会年  
会 2016年11月30日-12月2  
日 パシフィコ横浜(神奈川県)

丹伊田浩行、松沼亮一、堀口涼、内田千  
晴、酒井聡、大畑樹也、北川恭子、森脇  
真一、西谷秀男、宇井彩子、荻朋男、北  
川雅俊、DDB2依存的なHBO1のリクルート  
はヌクレオチド除去修復に必須である  
第39回 日本分子生物学会年会 20  
16年11月30日-12月2日 パシ  
フィコ横浜(神奈川県)

Akiyo Hayashi, Naohiro Suenaga, Michiyo  
Takahara, Takashi Ishii, Yasushi Shiomi,  
Hideo Nishitani Direct binding between  
PCNA and E3 ligase CRL4Cdt2 supports  
substrate targeting, and subsequent  
proteolysis during DNA replication. Grad.  
Sch. of Life Sci., Univ. of Hyogo. 10<sup>th</sup> 3R  
International Symposium, Matsue, Japan.  
Nov.13-17, 2016

塩見泰史、西谷秀男 PCNAアンローダー、  
E1g1-RFCの細胞内および生化的機能の解  
析 2015年12月1日-4日 神戸  
ポートアイランド (兵庫県)

見谷 駿治、貫名 康平、森野 公之、塩見  
泰史、西谷 秀男 DNA複製時に機能す  
るPCNA依存性ユビキチンリガーゼC  
RL4-Cdt2の細胞周期制御 20  
15年12月1日-4日 神戸ポートア  
イランド (兵庫県)

Akiyo Hayashi, Yasushi Shiomi, Tatsuro S.  
Takahashi, Hideo Nishitani In vitro analysis  
of DNA-bound PCNA dependent ubiquitin  
ligase CRL4-Cdt2 Cold Spring Harbor  
Laboratory Meeting "Eukaryotic DNA  
replication and genome maintenance"ポスタ  
ー発表、2015年9月1-5日、Cold Spring  
Harbor Laboratory (New York, USA)

Akiyo Hayashi, Yasushi Shiomi, Tatsuro S.  
Takahashi, Naohiro Suenaga, Hideo Nishitani  
Reconstitution of ubiquitination by  
CRL4-Cdt2, an S-phase specific proteolysis  
system on the chromatin 2nd International  
Picobiology Institute Symposium

"Development and Destruction" 9<sup>th</sup>-10<sup>th</sup>  
October, 2014, Center for Advanced Science  
& Technology (Hyogo) Japan  
Kohei Nukina, Yasushi Shiomi, Hideo  
Nishitani Functional analysis of substrate  
recognition subunit Cdt2 of ubiquitin ligase  
CRL4Cdt2 2nd International Picobiology  
Institute Symposium "Development and  
Destruction" 9<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> October, 2014, Center  
for Advanced Science & Technology  
(Hyogo) Japan

中村 知史、村上 浩一、上原 芳彦、小野  
哲也、浦野 健、西谷 秀男、菅澤 薫 DNA  
修復とエピゲノム制御に関わるチミン  
DNAグリコシラーゼの機能制御 第37  
回 日本分子生物学会年会 2014年  
11月25日-27日 パシフィコ横浜  
(神奈川県)

田中 美如、高原 教代、塩見 泰史、西谷  
秀男 紫外線DNA損傷時におけるCdt1分  
解の解析 第37回 日本分子生物学会  
年会 2014年11月25日-27日  
パシフィコ横浜 (神奈川県)

林 晃世、塩見 泰史、高橋 達郎、末永 尚  
弘、西谷 秀男 S期クロマチン特異的なタ  
ンパク質分解系CRL4-Cdt2の制御機構  
第37回 日本分子生物学会年会 20  
14年11月25日-27日 パシフィ  
コ横浜 (神奈川県)

塩見 泰史、西谷 秀男 PCNA アンローダ  
ー、E1g1-RFC の機能解析 第37回 日  
本分子生物学会年会 2014年11月  
25日-27日パシフィコ横浜 (神奈  
川県)

〔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

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biosig/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  
・准教授  
研究者番号：80380567

### (3) 連携研究者

林 晃世 (HAYASHI, Akiyo)  
兵庫県立大学・大学院生命理学研究科  
・助教  
研究者番号：20779350  
(平成28年度より)