

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：24506

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650064

研究課題名(和文) スピンドルチェックポイントと共役した複製開始制御

研究課題名(英文) Coupling of spindle checkpoint with initiation of DNA replication

研究代表者

西谷 秀男 (Nishitani, Hideo)

兵庫県立大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：40253455

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：細胞周期において遺伝情報は、DNAの正確な複製と均等な分配により維持継承される。Cdt1は、複製開始に必須なライセンス化因子で、S期で分解され、M期になると安定化する。Cdt1のM期安定化機構の一つに、サイクリンA-CDKとの結合を抑制する機構が働くことが分かった。M期にCdt1の一部は、中心体近傍の紡錘体周辺に検出され、Cdt1をノックダウンすると、紡錘体形成が乱れスピンドルチェックポイントが活性化して、M期後期の開始が遅れた。M期にもCdt1が機能して十分量蓄積することにより、次のサイクルのDNA複製のライセンス化を確実に確立するようM期とS期が共役されていると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Integrity of Genomic information during a cell cycle is maintained by precise replication and segregation of chromosomes. Cdt1, an essential factor acting for replication licensing, is degraded in S phase, but is stabilized upon entry into M phase. To prevent Cdt1 degradation, a mechanism operates that blocks binding of CyclinA-CDK to Cdt1. In M phase, Cdt1 was detected around the spindles proximal to the centrosome. In the absence of Cdt1, abnormal spindles were formed, spindle assembly checkpoint was activated, and anaphase onset was delayed. We propose that accumulation of Cdt1 in M phase couples initiation of S phase with mitotic events and ensures correct cell cycle progression.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞周期 紡錘体 DNA複製 スピンドル タンパク質分解

1. 研究開始当初の背景

細胞増殖の過程で遺伝情報が正確に継承されることにより、我々の生命が維持される。従って、基本的に我々のすべての細胞は受精時の遺伝情報を正しく受け継いでいる。遺伝情報は、細胞周期において、正確な一回の複製と均等な分配により維持継承される。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て、複製起点がライセンス化されたのち開始する。我々は分裂酵母を用いて、ライセンス化因子 Cdc6 や Cdt1 を高発現させると過剰複製（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。その後ヒト Cdt1 のクローニングを行ない、ヒト Cdt1 は S 期が開始した以降は速やかに分解されることを見だし、2 種類の E3 ユビキチンリガーゼ (SCF-Skp2 と CRL4 複合体) により素早く分解されることを明らかにした。その後、Cdt2 が CRL4 と複合体を形成して機能することが示された。

一方、新たなサイクルのための複製のライセンス化は、細胞周期の M 期が終了すると直ぐに行なわれる。これまでの研究により M 期における Cdt1 の蓄積が、次のサイクルのためのライセンス化に重要であることが明らかになっている。ジェミニンは、S 期では Cdt1 に結合してライセンス化を抑制するが、M 期では Cdt1 と結合して分解から保護することが報告された。しかし我々は、ジェミニンとの結合領域を欠く Cdt1 の N 末領域だけでも M 期に安定に存在することを見だし、Cdt1 を M 期に安定化する新規な分子機構があると考えた。特に、SCF-Skp2 により分解される p27 タンパク質は M 期に分解されているが、同じく SCF-Skp2 のターゲットとなる Cdt1 は安定に存在していることから、何らかの方法で分解から守られていると考えられた。また、近年の報告で Cdt1 が動原体に局在して染色体分配に関与することが示された (Varma et al. Nature Cell Biol., 2012)。そして、DNA 複製のライセンス化に関わる ORC、MCM5 や Cdt1 の抑制因子ジェミニンが中心体に存在し中心体複製の制御に関与することが報告されている。中心体は染色体分配に直接関わる構造体である。これらの知見から、複製開始因子は、複製開始に関わるだけでなく、M 期

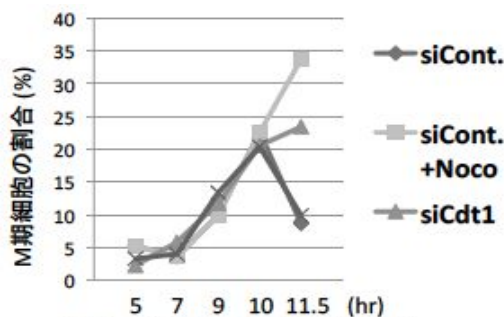


図1. s期リリース後の時間経過

においても機能して染色体分配制御にも寄与すると捉えられた。実際、Cdt1 も M 期での働きがあり、ノックダウンした細胞では、S 期は影響なく終了したが、M 期終了に遅れを生じる結果を得ていた (図 1)。

2. 研究の目的

これまで我々は、独自の Cdt1 抗体を作成して解析を行なってきたが、論文に発表されたような M 期に動原体に局在するという観察結果は得ていない。しかし、これまでの知見から、Cdt1 は M 期の始まりとともに蓄積し始め、M 期の進行に直接関与することが分かってきた。これらの結果をもとに、Cdt1 が M 期の進行に直接関わり、そのことにより、次のサイクルのための DNA 複製のライセンス化に十分な量を確保するように働く未知の制御機構を有すと考えるに至った。これはおそらく、スピンドルチェックポイント機構と関連していると予想された。

そこで、本研究においては、1) Cdt1 が M 期に安定に存在する分子機構、および 2) Cdt1 が M 期進行に関わる分子機構を調べることにより、M 期染色体分配と S 期染色体複製をカップルさせる新たな機構を開拓することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) Cdt1-FLAG 発現 HeLa 細胞 (S 期及び M 期) を用いて FLAG ビーズにより調整した Cdt1 と精製サイクリン A-Cdk2 タンパク質 (市販品) を混合して結合を調べた。S 期及び M 期から精製した Cdt1 で結合量の差を比較した。

(2) Cdt1 タンパク質の M 期リン酸化の解析を行なうため、Cdt1 のサイクリン結合部位 Cy モチーフに近接した S73 におけるリン酸化を特異的に検出するリン酸化ペプチド抗体を作成し、ウエスタン法で調べた。Cdt1-FLAG 発現細胞 (S 期及び M 期) より FLAG ビーズにより Cdt1 を調整した後、ウエスタン法で解析した。

(3) Cdt1 をベイトとした酵母 2 ハイブリッド法あるいは M 期 Cdt1 結合タンパク質の質量分析解析により Cdt1 結合タンパク質の探索を行なった。M 期 Cdt1 は、FLAG ビーズによりプルダウン後、FLAG ペプチドにて溶出したサンプルを用いた。

(4) Cdt1 抗体 (研究室で作成分、市販のもの) を用いて、M 期 Cdt1 の局在を調べた。パラフォルムアルデヒドで細胞の固定を行なう際、同時に Triton X-100 による抽出を行なう、遠心にて細胞をスライドガラスに固定する方法などを試みた。

(5) Cdt1 の発現を siRNA により抑制した。M 期でのスピンドル形態の異常の有無、スピンドルチェックポイントの活性化の有無を、チ

チューブリン抗体、Mad2 抗体による免疫染色法により調べた。細胞を M 期に同調する際は、siRNA 導入後、過剰チミジンで S 期に停止させた後にリリースを行ない、ノコダゾールを添加した。M 期細胞を集めて、ノコダゾールを洗い流して、リリースした。

(6) ライブイメージングにて M 期進行の様子を Cdt1 のノックダウンにより検討した。Cdt1 に対する siRNA を導入した細胞を、Leica コンフォーカル顕微鏡 TCS SP8 にて 2 分おきに観察した。

(7) CRL4-Cdt2 依存の分解のみを調べるため、Cy 変異 Cdt1(1-151 アミノ酸領域)を発現する細胞を S 期に同調後、同調させて M 期に進行させた。G2 期にあたるリリース 7-8 時間後に紫外線照射した。また、ノコダゾールで M 期に同調後、紫外線照射し Cdt1 の分解を調べた。

4. 研究成果

(1) S 期 (プロテアソーム阻害剤である MG132 添加により Cdt1 を安定化した) 及び M 期細胞より Cdt1-FLAG を調整し結合したサイクリン A-Cdk の量を調べると、S 期と比べて M 期 Cdt1 では結合量が低下していた。その要因が、Cdt1 側にあるのか、サイクリン A 側にあるのかを調べるため、精製したサイクリン A-Cdk2 との結合を調べた。その結果、M 期 Cdt1 は精製サイクリン A-Cdk2 との結合が低下していることが分かり、少なくとも M 期 Cdt1 は何らかの機構でサイクリン A-Cdk2 との結合が抑制されていることが示された。

(2) 上記の制御機構に関して、これまでの Cdt1 の M 期リン酸化部位の解析により、サイクリン A 結合部位である Cy モチーフに近接した S73 が M 期に高頻度でリン酸化されることを見だしていた。この部位が本当に M 期特異的にリン酸化されるかどうか確認するため、P-S73 ペプチドに特異的に反応する抗体を作成した。この抗体を用いて、S 期 (MG132 添加により Cdt1 を安定化) 及び M 期細胞より Cdt1-FLAG をプルダウンしてウエスタン法で調べたところ、M 期 Cdt1 のみ反応が見られた。これらの結果を元に、S73 を含めた Cy 近傍のリン酸化がサイクリン A-Cdk の結合を抑制し、SCF-Skp2 の結合に必要な 29T や 31S のリン酸化を阻害することにより Cdt1 が M 期で安定に存在するのではないかと考えられた。

(3) Cdt1 抗体による免疫染色を行なった。研究室で作製した Cdt1 抗体での染色を行なった。Cdt1 は、G1 期に蓄積し、S 期に進行、あるいは、紫外線などの DNA 損傷を受けると分解される。精製した Cdt1 抗体は、この特性をウエスタン法でも免疫蛍光抗体法でも検出できることを確認した。M 期細胞での染

色は、細胞全体が染色される傾向があったため、固定と同時に Triton X-100 処理を行ない、浮遊性の Cdt1 を抽出除去後、固定を行なった。その結果、HeLa 細胞にて中心体近傍の紡錘体近辺での染色が認められた。しかし、動原体での局在は検出されなかった。一方、論文にて動原体が染色されていた市販の抗体を用いて調べると、論文通りに動原体と思われるドット状のシグナルが認められた。また、この抗体でも、中心体近傍の紡錘体の染色も認められた。このことから、Cdt1 は中心体近傍の紡錘体形成に関わっているのではないかと予想した。

(4) Cdt1 のノックダウンにより M 期進行の遅れを引き起こすが、Cdt1 の局在から紡錘体形成との関わりが示唆された。そこで、チューブリン抗体で紡錘体形成を調べると、コントロール細胞では、赤道面に並んだ染色体を円弧状に取り囲んだ紡錘体が観察されるが、Cdt1 ノックダウン細胞では中心体から乱雑に伸びた紡錘体が観察された。このとき、Mad2 のキネトコアへの結合が見られ、スピンドルチェックポイントの活性化が確認できた。スピンドル形成異常は、M 期進行の遅れを引き起こしていると予想された。実際、ノコダゾールで微小管形成を阻害し M 期前中期に同調後、ノコダゾールを洗い流して M 期を進行させると Cdt1 ノックダウン細胞では、M 期終了の遅れが見られた。ノックダウン耐性の正常な Cdt1 を持たせると、遅れは回復した (図 2)。よって、Cdt1 が M 期進行に関わっていることを示している。

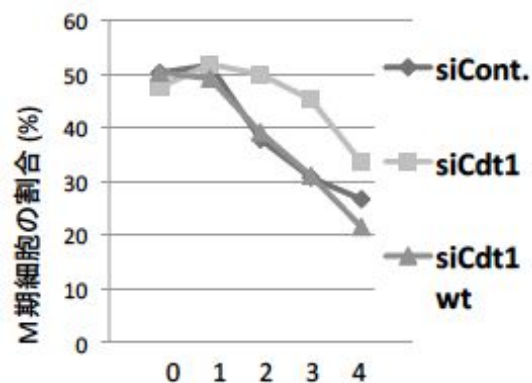


図2. Nocodazoleリリース後の時間(hr)

(5) Cdt1 ノックダウン細胞の M 期進行が遅延することをライブイメージングで観察した。核膜が崩壊後、コントロール細胞に比べて、後期の開始が遅れる傾向が見られた。(4)の結果と合わせると、Cdt1 が欠損すると正常な紡錘体の形成ができないため、動原体を捉えることができず、M 期進行が抑制されたと考察される。当初予定していた、チューブリン-GFP を用いたライブイメージングの確立による検証が重要である。

(6) Cdt1 結合タンパク質を検索した。これま

で、PIK1 が M 期特異的に Cdt1 と結合することを見いだしていた。酵母の 2 ハイブリッドスクリーニングにより、Cdt1 結合タンパク質を探索した。また、Cdt1-FLAG 発現細胞 M 期細胞から Cdt1 を精製し、結合タンパク質を質量分析により解析した。その結果、紡錘体と関連のある TACC3 や NuMA タンパク質などを見いだした。細胞に発現後、Cdt1 の結合を調べたところ TACC3 と、弱い結合が見られた。PIK1 が中心体に局在すること、また、TACC3 も中心体やその近傍の紡錘体に存在すること、Cdt1 が中心体近傍に存在したことを合わせ考えると、Cdt1 はこれらのタンパク質と一緒に紡錘体形成に関わり M 期で機能していると考えられた。

(7) 追加の実験として、Cdt1 の分解に関わるもう一つの E3 ユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 の関与を調べた。この E3 は、S 期 DNA 複製時のみならず、紫外線照射などの DNA 損傷時にも機能する。Cdt1-Cy(1-151) 発現細胞を S 期からリリースすると、S 期終了時あるいは G2 期から蓄積を始め、M 期になってから蓄積の見られる野生型の Cdt1 とは異なっていた。このことから、DNA 複製が終了すると CRL4-Cdt2 の働きもオフになり、M 期での Cdt1 の蓄積を可能としていると捉えることができる。また、紫外線照射による Cdt1 分解は、M 期では起こらないことを報告していたが、G2 期においても、CRL4-Cdt2 による分解は抑制されているようであった。これらの結果は、M 期において Cdt1 は、SCF-Skp2 および CRL4-Cdt2 の両方の分解系が作用しないようになり、安定に存在するよう制御されていることを示している。

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 3 件)

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. Epub 2017 Feb 22. PMID: 28278049 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28278049>

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

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28134787>

Shiomi Y, Suenaga N, Tanaka M, Hayashi A, and Nishitani H: Imaging analysis of cell cycle-dependent degradation of Cdt1 in mammalian cells. *Methods Mol Biol*. 査読有 2014;1170:357-65. doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2_18. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24906323>

〔学会発表〕(計 4 件)

北詰 麻衣、熊田-岸 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のリン酸化によるM期安定化機構の解析. 第38回 日本分子生物学会年会 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CRL4-Cdt2の細胞周期制御 第38回 日本分子生物学会年会 2015年12月1日-4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)

〔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

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

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

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

(4) 研究協力者

()