

平成22年 3月 31日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2005～2009
 課題番号：17080013
 研究課題名（和文）ほ乳動物細胞における複製開始複合体形成とその染色体安定性への関与の分子機構
 研究課題名（英文）Molecular mechanisms for pre-replication complexes assembly and its implication in chromosomal stability in mammalian cells
 研究代表者
 藤田 雅俊 (FUJITA MASATOSHI)
 国立がんセンター研究所・ウイルス部・室長
 研究者番号：30270713

研究成果の概要（和文）：遺伝情報の本体である染色体 DNA は、細胞増殖時に過不足なく正確に受け継がれなくてはならない。その異常は細胞死、あるいはがん化などを引き起こす。本研究では、細胞が二つに分裂する際に DNA を正確に一度だけ複製するための精緻なしくみ（分子機構）を明らかにした。特に、Cdt1 分子が極めて厳密な制御を受けている事、そしてその制御が正確な DNA 複製にとって必須であることを明らかにした。これらの知見に基づき、Cdt1 を分子標的とした抗がん剤開発の可能性を見いだし、その検討も始めた。併せて、これら DNA 複製制御蛋白質が他の染色体恒常性維持にも関与している事が明らかとなって来た。

研究成果の概要（英文）：Chromosomal DNA, an essential genetic element, should be precisely replicated during cell growth, failure of which leads to cell death or cancer development. In this research project, we have clarified molecular mechanisms by which DNA replicates once and only once during cells dividing into two daughter cells. Especially, we found that Cdt1 protein is strictly regulated by multiple mechanisms, which are essential for precise DNA replication. Base on these findings, we think that Cdt1 would be a novel target of anti-cancer drugs and we are now trying to find out such compounds. In addition, it turned out that such mechanisms for DNA replication also contribute to maintenance of other chromosomal functions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	23,400,000	0	23,400,000
2006年度	23,600,000	0	23,600,000
2007年度	23,000,000	0	23,000,000
2008年度	23,000,000	0	23,000,000
2009年度	23,000,000	0	23,000,000
総計	116,000,000	0	116,000,000

研究分野：分子生物学、腫瘍ウイルス学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：染色体 DNA 複製、細胞周期、クロマチン、染色体安定性

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の本体である染色体 DNA は、細胞増殖時に過不足なく正確に娘細胞に受け継がれなくてはならない。その変異や異常の多くは好ましくない結果、すなわち細胞の機能低下や細胞死あるいはがん化、などを引き起こす。よって正確な DNA 複製を保証する分子機構の解明は、細胞増殖機構の理解という生命科学的視点のみならず、がんや DNA ウイルス感染の理解を深めその治療法を開発する上からも、重要である。

一方、細胞周期・DNA 複製の研究は、酵母やカエル卵抽出液を用いた試験管内複製系等のモデル系を中心に発展してきた。しかし、上記の点を考えれば、ほ乳動物細胞での研究の重要性は明白である。しかしながら、解析法の難しさ等のために、モデル系と比べやや遅れていると言わざるを得ない。

その中で研究代表者のグループは、哺乳類細胞において複製開始調節因子の一つである MCM7 の単離同定およびその機能解析を世界に先駆けて行い、引き続いて MCM、CDC6、Cdt1、ORC 等の制御蛋白による複製細胞周期制御の分子機構、特に一細胞周期に一度だけ複製を行うライセンス制御機構、について積極的に研究を進めてきた。これらの研究から、DNA 複製の細胞周期制御機構の基本は酵母からヒト細胞に至るまで保存されている部分が多い一方で、ヒト等のほ乳動物細胞での制御機構はより複雑で巧妙であることも明らかとなってきた。よってそれらをさらに深く解明して行く事が重要であると考えた。繰り返しになるが、そのような研究は、細胞増殖機構の理解という生命科学的視点のみならず、がんや DNA ウイルス感染の理解を深めその治療法を開発する上からも、重要であろう。

2. 研究の目的

本研究の第一の目的は、ORC、CDC6、Cdt1、MCM 等の複製開始複合体形成因子の詳細な解析を推進し、ほ乳動物細胞における DNA 複製制御の分子機構の理解を目指すことであった。

(1) 複製の細胞周期制御において Cdt1 が極めて重要であることを示唆する結果をす

で得ていたので、Cdt1 の機能・制御の分子機構の詳細な解析を行うことを目標とした。

(2) 今まで研究代表者らは ORC、CDC6、Cdt1、MCM 各蛋白の時間空間的制御を明らかにしてきた。そこでこれらを踏まえ、本研究ではこれらの因子を発現・精製し、その試験管内での生化学的解析を行い、最終的には試験管内での複製開始複合体形成系の確立を目指した。

次にこれらの研究をもとに、DNA 複製制御機構と他の細胞制御機構、特にクロマチン制御機構との interplay (連携) の研究へと発展させることを第二の目的とした。

(3) 我々は、Cdt1 が癌細胞において過剰発現していること、そして実際に過剰発現させると染色体障害が引き起こされることを発見しつつあった。Cdt1 制御異常の染色体不安定性・発がんへの関与を検討した。

(4) 複製開始因子 ORC がテロメア維持に関与している TRF2 と結合していることを見出しつつあった。ORC のテロメア維持機構への関与を明らかにすることを目的とした。

(5) CDC6 が複製開始複合体形成以外に S 期の checkpoint 機構に関与している可能性を考え、それも検討した。

3. 研究の方法

分子生物学的手法、細胞生物学的手法及び生化学的手法等を駆使して研究を行った。以下にその概略を述べる。

(1) Cdt1 制御の解析：主に二つのアプローチを取った。一つは Cdt1 結合蛋白質の網羅的同定である。Cdt1 を大腸菌で作成し、ビーズに固相化後、細胞核抽出液を Cdt1 カラムに通し、Cdt1 結合蛋白を得た。そして mass spectrometry で網羅的に結合蛋白の同定を行った。二つ目は、種々の変異体を用いる事によって、Cdt1 の制御に係るドメインを同定することである。

(2) ORC、CDC6、Cdt1、MCM の各蛋白質を大腸菌あるいはバキュロウイルスを用いて大量発現し、精製することを試みた。そして各蛋白質の生化学的性質を解析し、試験管内での複製開始複合体形成系の確立を目指した。

(3) 各種正常細胞、がん細胞株に Cdt1 を過剰発現させ、再複製や染色体傷害の誘導を

調べた。また、Cdt1 による染色体不安定性誘導も調べた。

(4) ORC や MCM がテロメアに結合するのかどうかを、クロマチン免疫沈降法で調べた。またその TRF2 依存性を RNAi による抑制を用いて調べた。

(5) CDC6 の checkpoint 制御への関与に関しては、ヒト細胞を用いた実験系に加え、カエル卵抽出液を用いた試験管内複製系も用いた。

4. 研究成果

(1) Cdt1 制御 (藤田、西谷) : Cdt1 は ORC/CDC6 と共に、複製ヘリカーゼ MCM 複合体の染色体への loading を行っている (pre-RC 形成)。S 期以降は再複製防止のために、geminin 結合に加え Cdk リン酸化依存性 SCF-Skp2 ユビキチンリガーゼ及び PCNA 依存性 Cul4-DDB1 ユビキチンリガーゼによる分解制御を Cdt1 は受けていることを、藤田と西谷は明らかにした (12, 14)。さらに藤田は、Cdt1 が G1/G0 期に APC/C^{Cdh1} ユビキチンリガーゼによる制御を受けていることも明らかにした (5)。以上をモデル図で示すと次のようになる。

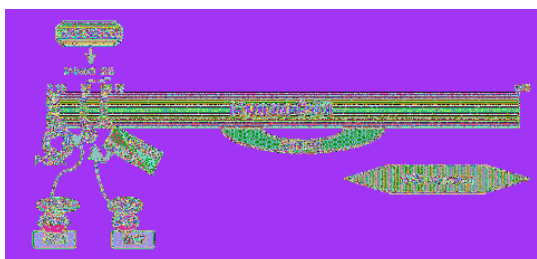


図 1. 3 種類のユビキチンリガーゼによる Cdt1 分解制御

以上の成果は、極めて激しい国際競争の中で出されたものであり (Cdt1 の Cdk による制御と Skp2 による分解の報告は、ほぼ同時に Scripps 研究所のグループによってもなされ、PCNA 結合を介した cullin4 による分解制御の発見は、我々を加え同時期に Nature Cell Biology を含む四誌に報告された)、重要な知見であると言える。一方、これら厳密な制御から予想される通り、Cdt1 の脱制御は再複製を強く促進し、正常ヒト細胞においてさえも Cdt1 と ORC1 あるいは CDC6 の同時脱制御により再複製が誘導される (3, 5)。ORC1 と CDC6 の同時脱制御では再複製は惹起されない。また、がん細胞において Cdt1 は過剰発現して

おり、これは発がんにつながる新たな染色体不安定性誘導の分子機構と考えられる (11)。そのような Cdt1 の強いライセンス促進能に Cdt1 新規結合蛋白 (5) である topoisomerase、SNF2、及び GRWD1 (新規ヒストン結合性 WD-repeat 蛋白質) が関与していることが明らかとなりつつある。一方 Cdt1 機能亢進による染色体傷害は正常細胞よりがん細胞で強く起こる (3)。そこで、Cdt1 と geminin の結合を阻害することによりがん細胞特異的に障害を与えられる可能性があるとの考えに至り、低分子化合物のスクリーニング・同定を開始している (6, 7)。これにより有効な抗がん剤を開発出来れば嬉しい。

(2) pre-RC 因子の他の染色体制御への関与 (藤田) : ORC が主にテロメア結合蛋白 TRF2 との結合を介してテロメアに集積し、テロメアに pre-RC が細胞周期依存的に形成されること、そして ORC がテロメア恒常性維持に重要であることを明らかにした (8)。



図 2. テロメアでの pre-RC 形成とその意義のモデル図

また、ヒト細胞及びカエル卵抽出液において、CDC6 は ATR と相互作用することにより複製チェックポイント活性化を制御していることも明らかにした (1)。これらの結果は、新たな染色体機能制御の研究を切り開く可能性がある。

(3) PCNA-Cul4-DDB1 系による Cdk インヒビター p21 の分解制御 (西谷) : CDK インヒビター p21 も Cdt1 と同様に PCNA 依存的に Cul4-DDB1 により分解されることを明らかにした (9)。PCNA 依存性 Cul4-DDB1 によるこれらのタンパク質の分解は、重要な G1-S 期移行制御機構の一つであると考えられる。また、PCNA 依存性 Cul4-DDB1 による Cdt1 分解には、PCNA 結合部位に加えて周辺配列も必要であることが明らかとなった。

(4) 哺乳類細胞の複製前複合体の試験管内

再構成系確立の試み (水野) : マウス ORC1-5 複合体(ORC1,ORC2 に N 末欠損を持つ), Cdc6, Cdt1, Mcm4/6/7 複合体を精製した。脱凝縮させたツメカエル精子核を鋳型として各因子を添加した結果、ORC に依存した DNA の取り込みは検出できなかった。大腸菌から精製した ORC 複合体を過剰にカエル卵抽出液に加えると複製を阻害したことから、完全長の ORC 複合体が必要であると推測される。

(5) Cdt1 の構造解析 (水野) : マウス Cdt1 の C 末端の 107 アミノ酸領域が winged turn helix という構造をとることを NMR による解析から明らかにした。変異体を用いた *in vitro* の実験結果及び出芽酵母の *in vivo* の実験結果から、Mcm4/6/7 との結合に重要なアミノ酸残基と結合様式を明らかにした。これらの解析から、Cdt1 は中央の geminin 結合領域と C 末の Mcm 結合領域とが重複した構造を持っており、結合ドメインが重複して進化してきたことが推測された。また、Cdt1 の C 末領域が古細菌の Cdc6 の C 末領域と立体構造上の相同性を有していたことから、MCM との結合に関して共通の結合様式を一般化し得ることが推測された(2)。

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 20 件)

- ① Yoshida K, Sugimoto N, Iwahori S, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Fujita M. CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells. *J. Cell Sci.* 123: 225-235, 2010.
- ② J.-G. Jee, Mizuno T, Kamada K, Tochio H, Chiba Y, Yanagi K, Yasuda G, Hiroaki H, Hanaoka F, Shirakawa M. Structure and mutagenesis studies of the C-terminal region of licensing factor Cdt1 enable the identification of key residues for binding to replicative helicase MCM proteins *J. Biol. Chem.* doi/10.1074/jbc.M109.075333
- ③ Sugimoto N, Yoshida K, Tatsumi Y, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Waga S, Kiyono T, Fujita M. Redundant and differential regulation of multiple licensing factors ensures prevention of rereplication in normal human cells. *J. Cell Sci.* 122: 1184-1191, 2009.
- ④ Katsuno Y, Suzuki A, Sugimura K, Okumura K, Zineldeen DH, Shimada M, Niida H, Mizuno T, Hanaoka F, Nakanishi M. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 3184-3189, 2009.
- ⑤ Sugimoto N, Kitabayashi I, Osano S, Tatsumi Y, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Matsukage A, Kiyono T, Fujita M. Identification of novel human Cdt1-binding proteins by a proteomics approach: Proteolytic regulation by APC/C^{dh1}. *Mol. Biol. Cell* 19: 1007-1021, 2008.
- ⑥ Mizushina Y, Takeuchi T, Hada T, Maeda N, Sugawara F, Yoshida H, Fujita M. The inhibitory action of SQDG (sulfoquinovosyl diacylglycerol) from spinach on Cdt1-geminin interaction. *Biochimie* 90: 947-956, 2008.
- ⑦ Mizushina Y, Takeuchi T, Takakusagi Y, Yonezawa Y, Mizuno T, Yanagi K, Imamoto N, Sugawara F, Sakaguchi K, Yoshida H, Fujita M. Coenzyme Q10 as a potent compound that inhibits Cdt1-geminin interaction. *Biochim. Biophys. Acta.* 1780: 203-213, 2008.
- ⑧ Tatsumi Y, Ezura K, Yoshida K, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Ohta S, Obuse C, Fujita M. Involvement of human ORC and TRF2 in pre-replication complex assembly at telomeres. *Genes Cells* 13: 1045-1059, 2008.
- ⑨ Nishitani H, Shiomi Y, Iida H, Michishita M, Takami T, Tsurimoto T. CDK inhibitor p21 is degraded by a PCNA coupled Cul4-DDB1Cdt2 pathway during S phase and after UV irradiation. *J. Biol. Chem.* 283: 29045-29052, 2008.
- ⑩ Xouri G, Squire A, Dimaki M, Geverts B, Verveer PJ, Taraviras S, Nishitani H, Houtsmuller AB, Bastiaens PI, Lygerou Z. Cdt1 associates dynamically with chromatin throughout G1 and recruits Geminin onto chromatin. *EMBO J.* 26, 1303-1314, 2007.
- ⑪ Tatsumi Y, Sugimoto N, Yugawa T, Narisawa-Saito M, Kiyono T, Fujita M. Dereglulation of Cdt1 induces chromosomal damage without rereplication and leads to chromosomal instability. *J. Cell Sci.* 119: 3128-3140, 2006.
- ⑫ Nishitani H, Sugimoto N, Roukos V, Nakanishi Y, Saijo M, Obuse C, Tsurimoto T, Nakayama K-I, Nakayama K, Fujita M, Lygerous Z, Nishimoto T. Two E3

ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *EMBO J.* 25: 1126-1136, 2006.

- ⑬ Fujita M. Cdt1 revisited: complex and tight regulation during the cell cycle and consequences of deregulation in mammalian cells. *Cell Div.* 1: 22, 2006.
- ⑭ Sugimoto N, Tatsumi Y, Tsurumi T, Matsukage A, Kiyono T, Nishitani H, Fujita M. Cdt1 phosphorylation by cyclin A-dependent kinases negatively regulates its function without affecting geminin binding. *J. Biol. Chem.* 279: 19691-19697, 2004.

[学会発表] (計 20 件)

- ① Sugimoto N, Waga S, Kiyono T, Fujita, M. A chromatin remodeler SNF2H is involved in pre-RC formation and Cdt1-induced checkpoint activation. *Keystone Symposia "Telomere Biology and DNA Repair"*, Ashmore, Queensland, Australia. October 11, 2009.
- ② Fujita M. CDC6 interaction with ATR regulates activation of a replication checkpoint in higher eukaryotic cells. *International Symposium on Chromosome Cycle and Genome Dynamics.* Nasu, Japan. November 11, 2009.
- ③ Yoshida K, Kiyono T, Fujita M. Cdk phosphorylation-dependent interaction of human CDC6 with ATR is involved in G2/M checkpoint response. *The Meeting on DNA Replication and Genome Integrity at Salk Institute*, La Jolla, USA. July 18, 2008.
- ④ Tatsumi Y, Ezura K, Yoshida K, Kiyono T, Ohta S, Obuse C, Fujita, M. Involvement of human ORC and TRF2 in pre-replication complex assembly at telomeres and telomere homeostasis. *Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on Eukaryotic DNA Replication & Genome Maintenance*, Cold Spring Harbor, USA. September 6, 2007.

[図書] (計 4 件)

- ① 藤田雅俊. 染色体動態制御における複製開始複合体因子の新たな機能. *蛋白質核酸酵素 増刊号「染色体サイクル」* (正井久雄、升方久夫、釣本敏樹、仁木宏典、

篠原彰編集)、54 巻、pp531-536、2009 (共立出版)

- ② Fujita M. DNA Replication Initiation. In *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine* (edited by Ganten, D. and Ruckpaul, K.). Springer, Berlin Heidelberg & New York, pp446-449, 2006.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 「抗癌性物質のスクリーニング方法」
発明者: 藤田雅俊、水品善之
権利者: 財団法人ヒューマンサイエンス振興財団
種類:
番号: 特願 2006-281754
出願年月日: 平成 18 年 10 月 16 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等
現所属、九州大学・大学院薬学研究院ホームページ:
<http://tansaku.phar.kyushu-u.ac.jp/saito/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 雅俊 (FUJITA MASATOSHI)
国立がんセンター・ウイルス部・室長
研究者番号: 30270713

(2) 研究分担者

西谷 秀男 (NISITANI HIDEO)
兵庫県立大学・大学院生命理学・教授
研究者番号: 40253455
水野 武 (MIZUNO TAKESHI)
理化学研究所・今本細胞核機能・専任研究員
研究者番号: 30281629