

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16042

研究課題名(和文) ミスマッチ修復機構によるPCNAダイナミクス制御メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of regulations of PCNA dynamics by the mismatch repair system

研究代表者

河添 好孝 (Kawasoe, Yoshitaka)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：60805422

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：複製クランプPCNAは、DNA複製や修復に関与する様々な因子の足場として機能することで、それらの反応を統御するDNA複製に必須の因子である。本研究では、PCNAのDNAからの脱装着(アンローディング)反応に着目し、クランプローダー複合体やミスマッチ修復機構によるPCNAアンローディングの制御メカニズムの解明を目指した。ツメガエル卵抽出液を用いた解析から、Elg1-RFCが主たるPCNAアンローダーであることが明らかとなった。さらに、精製Elg1-RFCのみではPCNAアンローディング活性を示すのに不十分であり、未同定の因子が制御に関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCNAのDNA上でのダイナミクスは、DNA複製反応や修復反応を適切に行うために厳密に制御される必要がある。実際、PCNAアンローダーと考えられているElg1の欠失は、ゲノムの変異や染色体再編の頻度を上昇させ、多くの臓器に腫瘍形成が起こることも知られている。本研究におけるPCNAをDNAからアンロードさせる反応の生化学解析により、その制御メカニズムの一端が明らかとなった。また、Elg1-RFCの活性制御因子が存在する可能性も示唆された。本研究結果は、DNA複製完了時の反応に関する知見を与えただけでなく、Elg1-RFCの活性制御因子の同定は腫瘍形成の抑制につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The replication clamp PCNA is an essential factor that functions as a platform for numerous factors involved in DNA replication and repair. The aim of this study is to elucidate regulatory mechanisms of the PCNA unloading reaction by clamp loader complexes and DNA repair systems, especially the eukaryotic mismatch repair system. Analyses using *Xenopus* egg extracts revealed that the Elg1-RFC complex is the major PCNA unloading complex. Furthermore, purified Elg1-RFC was not sufficient to exhibit PCNA unloading activity in a reconstitution system, suggesting that additional factor(s) may be involved in the regulation.

研究分野：分子生物学(DNA修復)

キーワード：PCNAアンローディング ミスマッチ修復 クランプローダー複合体 DNA複製 ツメガエル卵抽出液 試験管内再構成

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 遺伝情報を担う DNA の正確な複製と修復は、種や個体の維持に必須の反応である。複製クランプ PCNA は、DNA 複製因子や修復因子の足場として機能し、さまざまな反応を DNA 複製反応と協調的に機能させる必須因子である。PCNA は DNA 複製の開始前に DNA に装着 (ロード) され、DNA 複製の完了後に DNA から脱装着 (アンロード) される。

(2) PCNA の DNA へのローディングやアンローディングといった PCNA ダイナミクスは、クランプローダー複合体によって制御される。真核生物には PCNA ダイナミクスに関わるクランプローダー複合体が、少なくとも 3 種類あると考えられている (Arbel et al., *Genes*, 2021, Shiomi et al., *Genes*, 2017 など)。すべての複合体が、Rfc2、Rfc3、Rfc4、Rfc5 を共通のサブユニットとして保有し、大サブユニットの違いがそれぞれの機能特異性を生み出す。それぞれ、大サブユニットの名称から RFC、Ctf18-RFC、Elg1-RFC と呼ばれる。RFC と Ctf18-RFC は PCNA のローダーとして、Elg1-RFC は PCNA のアンローダーとして機能すると考えられている。RFC や Ctf18-RFC に関する解析とは遅れて、Elg1-RFC による PCNA アンローディング活性については近年その活性が発見され、解析が活発化してきた (Kubota et al., *Mol Cell*, 2013, Lee et al., *JCB*, 2013, Shiomi and Nishitani, *Genes to Cells*, 2013)。様々な解析から Elg1-RFC が PCNA のアンローダーとして機能すると捉えられているものの、Elg1 を欠失させた細胞においても、最終的には PCNA が DNA から解離することも知られている。さらに、ローダーとして考えられている RFC、Ctf18-RFC も、PCNA のアンローディング活性を有することが再構成実験より示されている (Yao et al., *Genes to Cells*, 1996, Bylund and Burgers, *MCB*, 2005)。そのため、Elg1-RFC が生体内において唯一の PCNA アンローディング経路なのか、また、RFC や Ctf18-RFC のもつ PCNA アンローディング活性が生体内においてどの程度寄与するのか、という点についてはよくわかっていない。

(3) PCNA アンローディング反応は、2013 年以降に研究が活発化した分野であり、DNA 複製機構との関連性に着目した解析が主流であった (Kubota et al., *Mol Cell*, 2013, Lee et al., *JCB*, 2013, Shiomi and Nishitani, *Genes to Cells*, 2013 など)。我々は、DNA の誤対合 (ミスマッチ) を修復する際の分子メカニズムを解析する過程において、ミスマッチ修復 (mismatch repair: MMR) 機構も、PCNA のアンローディングを阻害することを見出していた (Kawasoe et al., *eLife*, 2016)。ミスマッチセンサーである MutSa は、PCNA との相互作用を介して PCNA アンローディングを阻害し、MMR 可能な時間を確保していた。しかしながら、MMR 機構が PCNA アンローディングのどのステップを阻害しているのかはわかっていない。

## 2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、PCNA アンローディング反応に機能する制御メカニズムを明らかにすることである。そのために、大きく 2 つの問題を設定した。1 つ目は、PCNA ローダーとして捉えられている RFC と Ctf18-RFC のクロマチン上での PCNA アンローディングに対する寄与である。2 つ目は、MMR 機構が PCNA アンローディング反応のどのステップを阻害しているのかという点である。これらの問題点を明らかにすることで、PCNA アンローディングに対する DNA 複製機構ならびに MMR 機構による制御メカニズムの解明を目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究には、生理的な経路での DNA 合成反応に伴った PCNA ローディング/アンローディング反応や MMR 反応を試験管内で再現するツメガエル卵核質抽出液 (Nucleoplasmic extract: NPE) を解析系に用いた。NPE の作製については、Walter 博士らの方法に従った (Sparks et al., *CSH Protocols*, 2018)。NPE から着目する因子の免疫除去実験や加え戻し実験などによって、PCNA アンローディング反応に対する影響を解析した。

(2) クランプローダーを生体内から欠失させた場合、PCNA ローディング反応にも影響を与えるために、アンローディング反応にのみ着目して解析を行うことは難しい。そのため、我々が構築した精製ヒト PCNA、RFC を用いた PCNA ローディング反応の試験管内再構成系を用いた (Kawasoe et al., *eLife*, 2016)。この系のメリットはロードする PCNA がヒト由来のタンパク質であ

るため、特異的な抗体を用いることで、NPE 中のツメガエル PCNA と区別可能であることにあ  
る。そのため、予めロードされた PCNA のアンローディング反応のみを解析できる。本研究で  
は、PCNA の DNA 上の結合数を定量的に解析し、ロードした PCNA がアンロードされる過程  
を NPE、もしくは試験管内再構成系を用いて経時的に解析した。

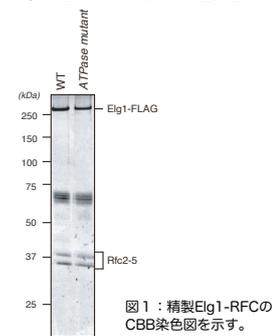
(3) クランプローダー複合体の大サブユニットそれぞれに対する 3 種類の抗体を作成し、クラ  
ンプローダー複合体を NPE から免疫除去することで、それぞれの複合体の PCNA アンローデ  
ィングに対する寄与の大きさについて解析した。

(4) MMR 因子によって PCNA アンローディング反応のどのステップが阻害されているのか明  
らかにするため、Elg1-RFC による PCNA アンローディング反応の試験管内再構成系の構築  
に取り組んだ。ヒト細胞発現系を用いた Elg1-RFC の発現・精製を行い、精製 Elg1-RFC の活性  
を卵抽出液を用いて評価した。

#### 4. 研究成果

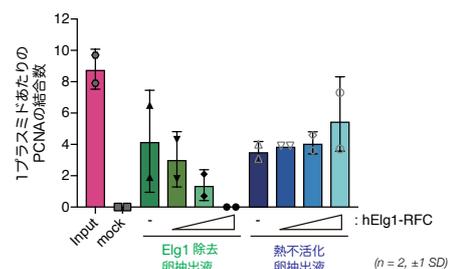
(1) ツメガエル Rfc1、Ctf18、Elg1 に対する抗体を作成した。作製した抗体を用いて、NPE から  
それぞれの因子の免疫除去を行った。それぞれの因子を除去した NPE 中での PCNA アンロー  
ディング反応を、研究の方法 (2) に示した基質を用いて解析した。Rfc3 の免疫除去によって  
PCNA アンローディング反応は大きく遅延したことから、NPE 中での PCNA アンローディ  
ング反応は、クランプローダー複合体に依存していることが明らかとなった。Rfc1 や Ctf18 を免  
疫除去した NPE 中では、コントロール NPE 中と同程度に、DNA 上の PCNA は速やかにアン  
ロードされた。一方で、Elg1 除去 NPE では、PCNA のアンローディング反応は大きく遅延し  
た。以上の結果から、Elg1-RFC がツメガエル卵抽出液中での主たる PCNA アンローダーである  
ことが示唆された。

(2) Elg1-RFC による PCNA アンローディング反応の試験管内再構成系を作製するために、ヒト Elg1-RFC の発現・精製系の構築に取り組  
んだ。ヒト 293T 細胞を用いて Elg1-RFC の発現系を構築し、Elg1 の C 末  
端に付加した FLAG タグを用いて一段階の粗精製を行った (図 1)。また、Elg1 に存在する ATP 加水分解 (ATPase) ドメインの変異体も同様  
の方法で発現・精製を行った。



(3) Elg1-RFC の活性を評価するため、卵抽出液を用いて加え戻し実験を行った。Elg1 対  
する抗体を用いて卵抽出液から免疫除去を行った後、精製 Elg1-RFC を加え戻し、予め DNA に結  
合させた PCNA のアンローディング反応を解析した。DNA 上の PCNA は、Elg1 を免疫除去す  
ることでアンローディングが大きく阻害されたが、精製 Elg1-RFC を加え戻すことで、アンロ  
ーディング反応の遅延は回復した (図 2、緑)。さらに、その反応は Elg1 のもつ ATPase 活  
性に依存していた。また Elg1 の除去は、卵抽出液を用いた DNA 複製反応においても、クロマチ  
ン上への PCNA の蓄積を引き起こした。この異常なクロマチン上の PCNA の蓄積も、精製 Elg1-  
RFC を加え戻すことで解消した。以上の結果から、今回の方法で精製したヒト Elg1-RFC は、  
DNA 複製と協調した PCNA アンローディング反応など、抽出液中の反応を内在性 Elg1-RFC  
と比較しても遜色なく行うことができることがわかった。さらにその活性が ATPase 活  
性に依存していたことから、Elg1-RFC が他のクランプローダーと同様に、PCNA のリング構造を開い  
て PCNA を DNA からアンロードすることが示唆され  
た。

(4) MMR 因子による PCNA アンローディング反応の  
阻害メカニズムを明らかにするため、まず、Elg1-RFC による PCNA アンローディング反応の試験管内再構成を  
試みた。(3) に示したように、卵抽出液中では精製 Elg1-  
RFC は PCNA アンローディング活性を示したものの、  
Elg1-RFC のみでは、様々な条件下においても DNA 上  
の PCNA をアンロードできなかった (図 2)。以上の結  
果から、Elg1-RFC が PCNA をアンロードするために



は、さらなる因子を必要とする可能性が示唆された。近年、Elg1のN末端領域を大きく欠失させた精製Elg1-RFC(全長1,844アミノ酸のうちN末端から692アミノ酸を欠失させた変異体)が、試験管内でDNA上のPCNAをアンロードすることが示されている(Kang et al., *Nat Commun.*, 2019)。我々もこの変異体を精製し、同様にPCNAアンローディング活性を示すことを確認する必要があるが、このことを踏まえると、Elg1のN末端領域にはPCNAアンローディングを制御する領域が存在する可能性があり、その領域に結合する因子が、Elg1-RFCの活性を生み出す因子であると予測される。そのため、今後はこの因子を同定することが、Elg1-RFCによるPCNAアンローディングの制御メカニズムの解明につながると考えている。

<引用文献>

- ① Arbel M, Choudhary K, Tfilin O, Kupiec M. PCNA Loaders and Unloaders—One Ring That Rules Them All. *Genes*, 2021, 12, 1812.
- ② Bylund GO, Burgers PM. Replication protein A-directed unloading of PCNA by the Ctf18 cohesion establishment complex. *Mol Cell Biol*, 25: 5445-5455, 2005.
- ③ Kang M.S., Ryu E., Lee S.W., Park J., Ha N.Y., Ra J.S., Kim Y.J., Kim J., Abdel-Rahman M., Park S.H., et al. Regulation of PCNA cycling on replicating DNA by RFC and RFC-like complexes. *Nat Commun*, 10, 2420, 2019.
- ④ Kawasoe Y, Tsurimoto T, Nakagawa T, Masukata H, Takahashi TS. MutSalpha maintains the mismatch repair capability by inhibiting PCNA unloading. *Elife*, 5, 2016.
- ⑤ Kubota T, Nishimura K, Kanemaki MT, Donaldson AD. The Elg1 replication factor C-like complex functions in PCNA unloading during DNA replication. *Mol Cell*, 50: 273-280, 2013.
- ⑥ Lee KY, Fu H, Aladjem MI, Myung K. ATAD5 regulates the lifespan of DNA replication factories by modulating PCNA level on the chromatin. *J Cell Biol*, 200: 31-44, 2013.
- ⑦ Shiomi Y, Nishitani H. Alternative replication factor C protein, Elg1, maintains chromosome stability by regulating PCNA levels on chromatin. *Genes Cells*, 18: 946-959, 2013.
- ⑧ Shiomi Y, Nishitani H. Control of Genome Integrity by RFC Complexes; Conductors of PCNA Loading onto and Unloading from Chromatin during DNA Replication. *Genes*, 2017, 8, 52
- ⑨ Sparks J, Walter JC. Extracts for Analysis of DNA Replication in a Nucleus-Free System. Cold Spring Harb Protoc, 2018.
- ⑩ Yao N, Turner J, Kelman Z, Stukenberg PT, Dean F, Shechter D, Pan ZQ, Hurwitz J, O'Donnell M. Clamp loading, unloading and intrinsic stability of the PCNA, beta and gp45 sliding clamps of human, E. coli and T4 replicases. *Genes Cells*, 1: 101-113, 1996.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Jones Mathew J.K., Gelot Camille, Munk Stephanie, Koren Amnon, Kawasoe Yoshitaka, George Kelly A., Santos Ruth E., Olsen Jesper V., McCarroll Steven A., Frattini Mark G., Takahashi Tatsuro S., Jallepalli Prasad V.	4. 巻 81
2. 論文標題 Human DDK rescues stalled forks and counteracts checkpoint inhibition at unfired origins to complete DNA replication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 426 ~ 441.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2021.01.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Ryota Miyashita, Atsuya Nishiyama, Yoshie Chiba, Satomi Kori, Norie Kato, Chieko Konishi, Soichiro Kumamoto, Hiroko Kozuka Hata, Masaaki Oyama, Yoshitaka Kawasoe, Toshiki Tsurimoto, Tatsuro S. Takahashi, Kyohei Arita, Makoto Nakanishi	4. 巻 -
2. 論文標題 The termination of UHRF1-dependent PAF15 ubiquitin signaling is regulated by USP7 and ATAD5	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河添 好孝、坂詰 彩、織田 里美、高橋 達郎
2. 発表標題 WRNヘリカーゼはDNA二重鎖切断修復の正確性維持に重要である
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河添 好孝、下川 紗貴子、釣本 敏樹、高橋 達郎
2. 発表標題 ツメガエル卵抽出液におけるPCNAアンローディングは主にElg1-RFCが担う
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河添 好孝、織田 里美、坂詰 彩、久持 涼子、高橋 達郎
2. 発表標題 WernerヘリカーゼとMutL エンドヌクレアーゼは一本鎖アニーリングの正確性を制御する
3. 学会等名 第26回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河添 好孝、坂詰 彩、織田 里美、高橋 達郎
2. 発表標題 WernerヘリカーゼとMutL エンドヌクレアーゼはDNA二重鎖切断修復の正確性を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田 翔太、河添 好孝、高橋 達郎
2. 発表標題 クロマチンを基質としたミスマッチ修復反応の試験管内再構成に向けた解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河添 好孝、織田 里美、坂詰 彩、久持 涼子、高橋 達郎
2. 発表標題 WernerヘリカーゼとMutL エンドヌクレアーゼは一本鎖アニーリングの正確性を制御する
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

九州大学理学部 染色体機能学研究室 ホームページ  
<http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~chromosome/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Memorial Sloan Kettering Cancer Center			