

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06547

研究課題名(和文) DNA複製により起動する選択的タンパク質分解によるゲノム維持機構

研究課題名(英文) Mechanism of DNA synthesis-activated proteolysis for genome integrity

研究代表者

西谷 秀男(Nishitani, Hideo)

兵庫県立大学・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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞増殖過程においてゲノム情報を正確に維持制御するため、細胞周期にDNA複製を一度のみに限定する機構が存在する。DNA複製が開始するとCRL4-Cdt2は、複製部位に装着されたPCNAに結合したライセンス化因子Cdt1の分解を誘導して過剰な複製を抑制する。またDNA損傷修復の過程においても、CRL4-Cdt2のPCNAへの集積の制御が重要である。本研究では、ライブ観察によりCdt2のPCNA結合モチーフがPCNAへの集積に主要な働きを行い、さらにCdt2のDNA結合部位およびリン酸化も加わってPCNAに結合した基質を捉える制御機構を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞機能が忠実に遂行されるためにはタンパク質の機能が正確に制御されなければならない。さらに、細胞の状態をセンスして制御する必要がある。CRL4-Cdt2はタンパク質分解に関わるユビキチンリガーゼで、S期が開始すると素早く有害となったタンパク質の分解に関わり、S期が終了すると次のサイクルのために分解機能が抑制される必要がある。我々の成果は、PCNAへの結合(集積)の制御を多重な方法で、また、効率よく制御する仕組みを通して、そのような制御機構を示すものである。

研究成果の概要(英文)：To maintain the genome information during successive cell division cycles, DNA replication is regulated so that it occurs only once in a cell cycle. When DNA replication starts, PCNA is loaded at a replication site and Cdt1 binds to it, which is targeted for degradation by CRL4-Cdt2 to prevent re-replication. In this process, the recruitment of CRL4-Cdt2 to PCNA must be correctly regulated. To address such a regulation, we adopted a live image analysis of Cdt2 recruitment to PCNA. We present evidence that PCNA-interacting motif plays a primal role of Cdt2 recruitment and that DNA binding domain and phosphorylation in Cdt2 fine tune its recruitment to PCNA.

研究分野：DNA複製制御

キーワード：ゲノム情報 DNA複製 タンパク質分解 Cdt2 PCNA

1. 研究開始当初の背景

生命の連続性は、ゲノム情報の正確な維持継承により成り立つ。細胞周期において染色体の複製は一度だけに限定される。この制御に、PCNA に依存した CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼによるタンパク質分解が重要な働きをする。PCNA は複製が始まり DNA にロードされると、染色体複製に関わる多数の因子が結合する足場となり、それらの働きを補佐する。PCNA の新たな機能として、DNA 複製のライセンス化因子 Cdt1 が結合すると、CRL4-Cdt2 による Cdt1 のポリユビキチン化を介した分解を引き起こし、再複製を抑制することが分かってきた。また、紫外線などによる DNA 損傷時にも同様に作動し、ゲノム維持に必須の機能を果たす。Cdt2 の N 末端側は基質認識領域をなす一方、C 末端側はユビキチンリガーゼ活性を制御する機能を持つことが分かってきた。

2. 研究の目的

CRL4-Cdt2 の基質認識サブユニットである Cdt2 は、N 末端側に WD40 リピートからなる基質認識ドメインを持ち、PCNA に結合した基質を認識してユビキチン化する。一方、Cdt2 の C 末端側には、PCNA 結合モチーフ PIP-ボックス、DNA 結合ドメインおよび CDK によるリン酸化部位が存在して、CRL4-Cdt2 のユビキチンリガーゼ活性を制御すると考えられている。PIP ボックスは直接 PCNA への結合を通して基質認識を助け (Hayashi et al. 2018)、一方、CDK によるリン酸化は PCNA への集積を抑制する (Nukina et al. 2018) こと、また DNA 結合部位は活性を促進すること (Mazian et al. 2019) を報告した。本研究では、それぞれのモチーフおよびドメインの詳細な機能、相互の関わりを明らかにして、CRL4-Cdt2 の DNA 結合 PCNA に依存した作動機構、その細胞周期における活性制御機構を解明する。また、Cdt1 分解が阻害され再複製が起こる過程と細胞応答についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) プラスミド:

使用したプラスミドを図 1 に示す。実験目的に応じて C 末に mCherry あるいは FLAG タグを付加したものを作成し使用した。

(2) 3 光子吸収による局所的な紫外線類似 DNA 損傷の誘発とリアルタイム観察:

EGFP-PCNA 安定発現 U2OS 細胞に Cdt2-mCherry (あるいは Cdt2 の変異体) 発現プラスミドを導入し、3 光子吸収を利用して 780nm のレー

ザーを核内の任意の部位に与え 260nm の紫外線相当の DNA 損傷を誘発後、共焦点レーザー顕微鏡下で EGFP-PCNA および Cdt2-mCherry の集積シグナルをリアルタイムで取得した (菅澤薫研究室 (神戸大学バイオシグナル総合研究センター) との共同研究)。

(3) リン酸化部位変異 Cdt2 の解析:

18ヶ所の CDK リン酸化部位 (Nukina et al, 2018) の中で、PIP ボックス近傍の 5ヶ所をアラニンに変異した Cdt2-5A、およびマス解析で報告 (Dephoure et al., PNAS, 2008) されたリン酸化部位 6ヶ所の変異 Cdt2-6A の発現プラスミドを作成した (図 1. 18A, 6A および 5A の赤ドット)。細胞に導入し、ユビキチン化活性を PCNA の mono ユビキチン化レベルにて、また、PCNA との結合強度を、可溶性画分を前抽出して固定後、PCNA および Cdt2 にタグを付けた FLAG に対する抗体にて共染色し、その強度により評価した。

(4) DNA 結合活性の解析:

Mazian et al. 2019 にて報告した DNA 結合部位を分割してタンパク質を精製し DNA 結合をアッセイする。方法は、同論文に従って行った。

(5) 再複製誘導過程と細胞応答の解析

NEDD8 化阻害剤 MLN4924 により CRL4-Cdt2 の Cul4 サブユニットの NEDD8 化を抑制するとユビキチン化活性を阻害するので Cdt1 が蓄積し再複製を誘導する。EGFP-PCNA 発現細胞にて MLN4924 を加えたのち再複製誘導過程の PCNA フォーサイをライブ観察した。また、カルシウムセンサーである GCamp6 の安定発現細胞を取得し、ライブ観察した。

4. 研究成果

(1) 局所的 DNA 損傷部位への CRL4-Cdt2 集積機構の解析について:

これまでの局所的 UV 照射マイクロポアアッセイでは、照射数分後の 1 ポイントのみの解析しかできなかった。集積速度と強度を時間経過に伴って追跡するためには、3 光子吸収を利用した DNA 損傷後のライブ観察が Cdt2 の各種モチーフ、ドメインの働きを詳細に解析するのに有効である。

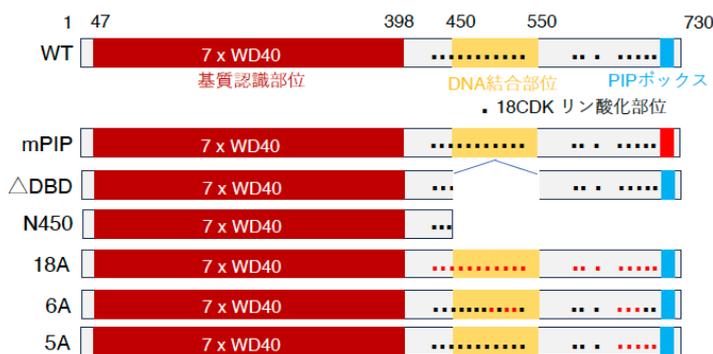


図 1 Cdt2 の 1 次構造と変異体

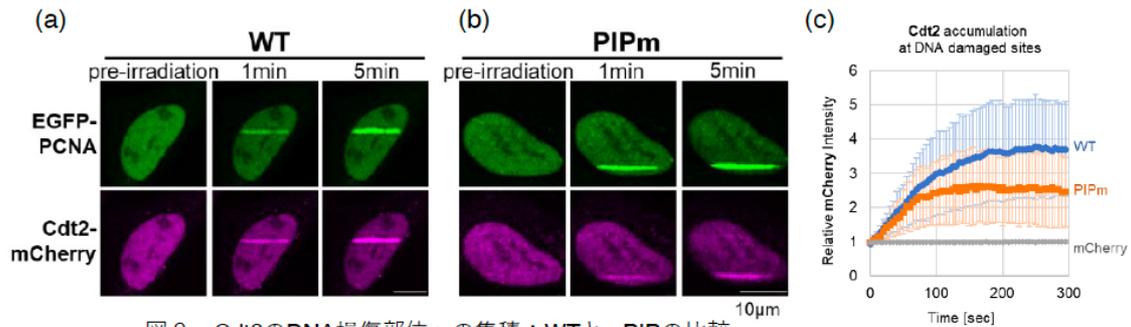


図2 Cdt2のDNA損傷部位への集積：WTとmPIPの比較

そこでまず、PCNAに依存したCRL4-Cdt2によるCdt1分解系がこのDNA損傷誘導系にて機能することを、EGFP-PCNAの照射部位への集積、EGFP-Cdt1の集積およびその後の分解により確かめた。続いて、EGFP-PCNA安定発現U2OS細胞にCdt2(WT)-mCherryを導入し、ライブ観察を行った(図2)。レーザー照射後10秒後にはPCNAおよびCdt2(WT)の集積が観察され、その強度が増加し約3分後に定常値となった。Cdt2(WT)の結果よりこの系が有効であることが示された。そこで、PCNA結合部位変異Cdt2(mPIP)、DNA結合部位変異Cdt2(Δ DBD)、N末WD40リピート領域のみCdt2(N450)を用いて観察した。また、図2(a)のPCNA像から照射細胞は、細胞周期のG1期の細胞と捉えられた。G1期には、Cdt1などの基質が存在しており、基質をとらえるN末WD40領域の効果を、S期における集積と比較することで解析した。

PCNA結合部位変異Cdt2(mPIP)は、図2(b)および(c)に示すようにG1期細胞では、WTに比較して集積速度が少し遅れが見られ、定常値に達した時の強度も半減していた。DNA結合部位の集積への寄与をみるためCdt2(Δ DBD)で調べると、ほぼCdt1(WT)と同じだった。これらから、損傷部位への集積におけるPIPボックスの重要性が再確認された。一方、S期細胞ではCdt2(mPIP)の集積がCdt2(WT)に比べてかなり低下していた。G1期での集積においてはN末の基質認識領域による寄与が予想されたのでCdt2(N450)で調べたところ、G1期では僅かの集積が見られたが、S期ではほとんど集積が見られなかった。N末の基質認識領域による寄与はPIPボックスに比べると低いと考えられた。Cdt2(Δ DBD)は、その変異の影響はなくG1期においてもS期においてもCdt2(WT)とほぼ同じであった。このことからDBDの集積への寄与は低いと予想されたが、DBDを持つCdt2(mPIP)に対してCdt2(N450)では、G1期もS期も集積量が低下していたので、DBD領域が存在するとN450の基質認識が増強する可能性が考えられた。今後、Cdt2(Δ DBD+mPIP)2重変異での解析が重要となる。

(2) リン酸化部位変異Cdt2の解析について：

Cdt2はS開始からM期にかけて高度なリン酸化が見られる(Ishii et al. JBC, 2010)。特にC末領域には18ヶ所のCDKリン酸化部位が存在する。これらの部位をアラニンに置換した非リン酸化型Cdt2(18A)(図1.18A)に変異すると、複製部位に存在するPCNAとの結合が強まりユビキチン化活性が増強することが示された。つまり、Cdt2のリン酸化はCRL4-Cdt2の働きを抑制することが明らかとなった(Nukina et al. Genes Cells, 2018)。そこでまず、C末領域のみでPCNAとの結合がリン酸化により制御されることを、C末(390-730)領域とその18A変異体で免疫沈降しPCNAとの結合が増強することで確かめた。そこで、18ヶ所から重要な部位を同定するため、質量分析にて報告された6ヶ所変異Cdt2(6A)およびPIPボックス近傍変異Cdt2(5A)を作成した(図1)。細胞にて発現させ、PCNAのモノユビキチン化レベルで調べるとCdt2(WT)に比較してCdt2(6A)およびCdt2(5A)ともモノユビキチン化レベルが半減していた。Cdt2(WT)はS期進行に伴いリン酸化が増加し、免疫染色にて調べるとCdt2とPCNAの結合が低下する。一方、Cdt2(18A)はS期を通してPCNAと強く結合する。Cdt2(6A)の安定発現細胞を確立しPCNAとの結合を調べると一部のS期細胞にてPCNAにCdt2(6A)が強く結合することがわかった。これらの細胞はS期初期のものと考えられた。Cdt2のリン酸化はS期を通して増加するので、S期後期になると6A以外の部位のリン酸化が関与することが考えられた。PIPボックス近傍の部位が示唆される。S期終了後のPCNAのアンローディングによるCRL4-Cdt2の機能抑制に加えて、S期進行に伴いCdt2のリン酸化部位を増加させることによりPCNAへの集積を抑制して、次のサイクルのために基質の発現量を上げるように制御されることが窺われる。

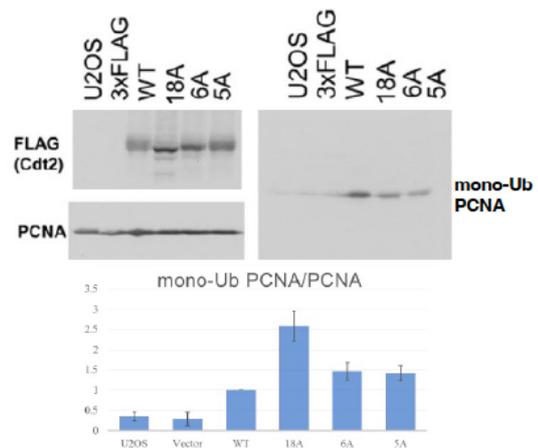


図3 Cdt2のCDKリン酸化とPCNA結合

(3) モレキュラーシミュレーションによるCdt2のドメイン解析について：

Cdt2のN末側は7回のWD40リピートからなる。WD40リピートは β -プロペラ構造を取ることが知られている。マレーシアマラ工科大学M. Mazian博士およびシンガポール国立大学M. Ganasen博士との共同研究にて立体構造モデリング(SWISS MODEL(PDB ID:2YMU)を使用)を行い、基質認識

に係ると予想されるアミノ酸を特定した (図 4A, B)。これをもとに、結晶構造解析されている Cdt2 のターゲットである p21 ペプチドが結合した PCNA とのドッキングシミュレーションを行い、予想された Cdt2 の基質認識アミノ酸が p21 ペプチドの分解に必要なアミノ酸と水素結合する様子を捉えることができた (Mazian et al, Genes, 2022)。

一方、DNA 結合領域(460-580)の DNA 結合シミュレーションを行ったところ、この中央付近で helix turn helix 構造をとり DNA 結合に関わることが示唆された。DNA 結合領域(460-580)を 2 分割 (460-534, 528-580) して大腸菌から精製したタンパク質では DNA 結合能が失われたことからこの領域が重要と考えられた。

(4) 再複製誘導過程と細胞応答の解析について：

CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼは、Cdt1 の分解を制御することにより再複製を抑制するなどゲノム維持において重要な役割を果たす。では、Cdt2 の機能が無くなり再複製が開始する過程において、どの様に再複製が開始し、また、細胞はどのような応答を示すのかも重要な課題である。そこで、CRL ファミリーの NEDD8 化を抑制する MLN4924 を用いて Cdt1 の分解を抑制して再複製を誘導する系で調べた。MLN 投与後、3 時間程度で Cdt1 は安定に蓄積が見られた。しかし、再複製と捉えられる 4C 以上の DNA を有す細胞は 12-24 時間後に見られた。EGFP-PCNA 発現 U2OS 細胞でライブ観察すると、通常の S 期様の foci が観察されたのち G2 期に移行し、かなりの時間を経たのち (M 期には進行せず)、再複製を示すと思われる S 期初期様の PCNA foci が観察された。今後、MCM2-7 の結合を調べるにより再ライセンス化がどのように確立するのか解析する必要がある。また、DNA 損傷時にカルシウム応答が寄与することが報告されたことを受けて、再複製誘導時における [Ca²⁺] の変化を調べた。カルシウムセンサー GCaMP6 の安定発現 U2OS 細胞にて MLN4924 投与後 24 時間にて核内での顕著な [Ca²⁺] の増加を観察した。再複製に伴う障害による細胞死から守ろうとする反応ではないかと期待される。

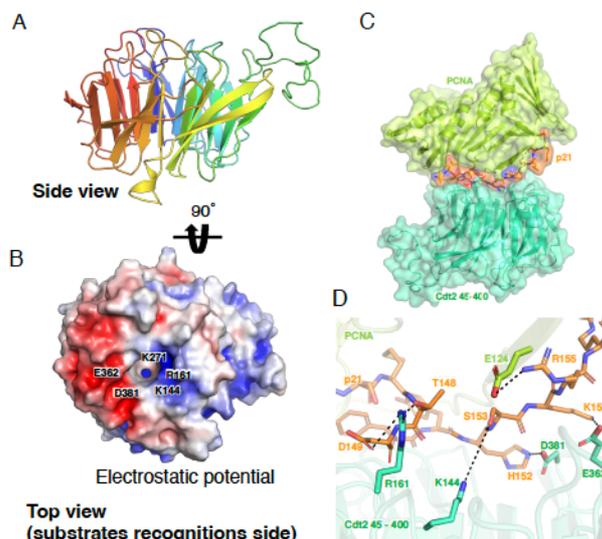


図 4 Cdt2のN末の構造モデルと基質認識シミュレーション

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 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mazian MA, Yamanishi K, Rahman MZA, Ganasen M, Nishitani H.	4. 巻 13(2)
2. 論文標題 CRL4 Cdt2 Ubiquitin Ligase, A Genome Caretaker Controlled by Cdt2 Binding to PCNA and DNA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes (Basel)	6. 最初と最後の頁 266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes13020266.	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 該当する

1. 著者名 Panagopoulos A, Taraviras S, Nishitani H, Lygerou Z.	4. 巻 30
2. 論文標題 CRL4(Cdt2): Coupling Genome Stability to Ubiquitination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Trends Cell Biol.	6. 最初と最後の頁 290-302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.tcb.2020.01.005.	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

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 飯田康介、渡邊雄一郎、林晃世、塩見泰史、西谷秀男
2. 発表標題 DNA再複製に伴う細胞内Ca ²⁺ 濃度変化の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田所あすか、西谷秀男、塩見泰史
2. 発表標題 新規PCNA除去機構におけるTRAIIPの機能解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 塩見泰史、田所あすか、鐘巻将人、西谷秀男
2. 発表標題 クロマチンからのPCNA除去に連係したDNA複製制御
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hideo Nishitani
2. 発表標題 CRL4-Cdt2 ubiquitin ligase, a critical factor to block re-replication of chromosomal DNA and its implication as a target for anti-cancer drug development
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 渡邊雄一郎、林晃世、塩見泰史、西谷秀男
2. 発表標題 NEDD8 化阻害により誘導されるDNA 再複製の機構
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 海老原溪、日下部将之、林晃世、塩見泰史、菅澤薫、西谷秀男
2. 発表標題 ゲノム安定性維持に関わるCRL4Cdt2 ユビキチンリガーゼの損傷部位集積機構の解析
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 海老原 深、日下部 将之、林 晃世、塩見 泰史、菅澤 薫、西谷 秀男
2. 発表標題 DNA損傷修復において機能するCRL4Cdt2ユビキチンリガーゼの損傷部位集積機構のライブイメージ解析
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 渡邊 雄一郎、林 晃世、高原 教代、塩見 泰史、西谷 秀男
2. 発表標題 DNA再複製誘導による過剰な複製の開始タイミングの解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 海老原深、日下部将之、林晃世、塩見泰史、菅澤薫、西谷秀男
2. 発表標題 DNA損傷修復において機能するCRL4-Cdt2ユビキチンリガーゼの損傷部位集積機構の解析
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ホームページ；兵庫県立大学 大学院理学研究科 生体情報学II
<https://www.sci.u-hyogo.ac.jp/edu/kenkyuu/base23.html>

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			
マレーシア	Universiti Teknologi MARA			
シンガポール	National University of Singapore			