

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：82609

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15725

研究課題名(和文) Cdc7-ASK(Dbf4)キナーゼの個体レベルでの機能の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the function of Cdc7-ASK(Dbf4) kinases in vivo

研究代表者

井口 智弘 (IGUCHI, Tomohiro)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・研究員

研究者番号：10783516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、Cdc7およびASKの増殖・分化への関与は細胞系列毎に異なることが明らかとなった。また、個体レベルでRif1がCdc7-ASK依存的複製を抑制することが示された。細胞系列によっては、Cdc7-ASK複合体に依存しないDNA複製開始メカニズムが存在すること、その一つはCdkが担っている可能性があることが示唆された。Cdc7-ASK非依存的な新規複製制御機構の解明は、DNA複製機構の多様性を明らかにし、癌細胞や正常細胞、細胞系列特異的な細胞増殖メカニズムに新たな知見をもたらすことが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究から、Cdc7やASKが個体を形成する異なる細胞系列において、異なる要求性を示すこと、Cdc7あるいはASK非依存的な複製様式が存在すること、Rif1やCdk阻害因子がそれらの経路を阻害していることが明らかとなった。生体内では細胞系列ごとに多様なDNA複製開始システムが採用されている可能性があり、Cdc7-ASK非依存的な新規複製制御機構の解明は、DNA複製機構の多様性を明らかにし、癌細胞や正常細胞、細胞系列特異的な細胞増殖メカニズムに新たな知見をもたらす。さらに細胞種特異的な複製メカニズムの解明は、癌などの疾患細胞を標的とした新規創薬に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The involvement of Cdc7 and ASK in proliferation and differentiation was found to be different in each cell lineage. It was also shown that Rif1 suppresses Cdc7-ASK-dependent replication in vivo. The results suggest that there are Cdc7-ASK complex-independent mechanisms of DNA replication initiation in some cell lines, one of which may be played by Cdk. The elucidation of a novel Cdc7-ASK-independent regulatory mechanism of replication reveals the diversity of DNA replication mechanisms. It is also expected to provide new insights into cell lineage-specific cell proliferation mechanisms.

研究分野：分子生物学

キーワード：Cdc7-ASKキナーゼ DNA複製 脳形成 血球系細胞 RIF1 サイクリン依存性キナーゼ

1. 研究開始当初の背景

細胞は娘細胞を正しく再生産するために、細胞周期が秩序正しく進行していく必要がある。特に、遺伝情報の担い手である染色体 DNA は正確に倍化され、その後、娘細胞に分配されなければならない。実際、細胞は染色体 DNA を正確に倍化し分配するための制御機構を備えている。真核細胞の DNA 複製は染色体上の複数の部位(複製起点)から開始するとともに、S 期内の特定の時期に特定の複製起点から複製される。この制御は、染色体の核内配置やエピゲノム制御などにより厳密に管理されているが、細胞の種類及び発生・分化の過程において柔軟に変化していると考えられている。しかしながら、その制御分子機構の大部分が不明確である。DNA 複製は、複製開始前(G1 期)に ORC 複合体を中心とした pre-RC (pre-replication complex) を複製起点に形成する。その後(S 期) CDK (cyclin-dependent kinase) および DDK (Cdc7/ASK kinase) の 2 つのキナーゼ依存的に複製が開始する。この複製開始において重要な機能を担う Cdc7 は、DNA 鎖の巻き戻しを触媒している複製ヘリカーゼの中心因子である Mcm をリン酸化することにより複製開始複合体の形成を促進し、DNA 複製の複製起点とタイミングの決定を担う重要な因子の 1 つであると考えられている(図 1)。

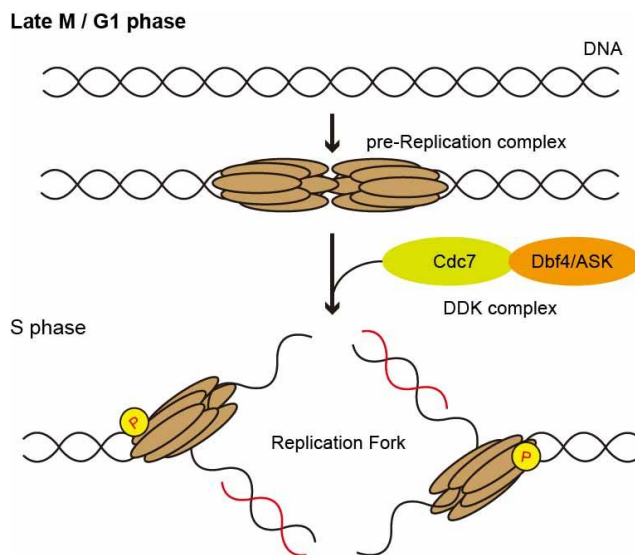


図 1. DNA 複製開始メカニズム

Cdc7 は酵母からヒトまで保存されているセリンスレオニンキナーゼであり、Cdc7 のキナーゼ活性を完全に活性化するには活性化サブユニットである ASK との複合体の形成が必須である。Cdc7 完全欠損マウスは、胎生 6.5 日までに死亡する。また、ES 細胞における欠損では、DNA 複製が停止し、DNA 損傷が蓄積した結果、p53 依存的に細胞死に至る (Kim JM *et al.* (2002) EMBO J)。更に、Cdc7 は複製開始だけでなく、DNA 組換え・修復、クロマチン制御など多様な生物学的機能の制御に関与することが明らかとなってきた。このように、多くの研究者が Cdc7/ASK の分子機構や機能的意義に迫ってきたが、これらの知見の多くは、*in vitro* における細胞株を用いた研究や真核生物である酵母を用いた研究結果であり、Cdc7/ASK キナーゼの高等生物における個体発生や各種組織の分化における機能など個体レベルでの研究知見はほとんどなく不明な点が多い。

そこで代表者は、個体レベルでの各種細胞の分化における Cdc7/ASK キナーゼの機能を明らかにすることが必要であると考え、本研究計画を考案した。

2. 研究の目的

本研究では、Cdc7 とその活性化サブユニットである ASK の個体レベルでの各種細胞の分化における機能および分子機構を明らかにすることと、Cdc7 に依存しない DNA 複製制御メカニズムと、その生物学的意義の解明を目的とする。

Cdc7 完全欠損マウスの作製及びその表現型の解析は既に報告されているが、早期の胚性致死であり、各種細胞の分化や機能における Cdc7 の役割は未だ明らかにされていない。そこで、Cdc7 および ASK の組織特異的遺伝子欠損マウスの樹立を行い、各種細胞の分化における機能および

分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Cdc7 および ASK 領域に loxP 配列を有する Floxed マウスと Cre を細胞系列特異的に発現するマウスを交配し、各臓器特異的に Cdc7 あるいは ASK 欠損マウスを作製し、表現型を解析した。

(2) マウス個体においても酵母の研究成果と同様に、Rif1 が Cdc7 の欠失をバイパスすることが可能かどうか検討するために、Rif1 Floxed マウスと交配し、二重欠損マウスを作製し、Cdc7 あるいは ASK 単独欠損で見られた表現型を回復できるかどうかを検討した。

(3) Cdc7 あるいは ASK ノックアウト細胞における複製様式を解析する。

4. 研究成果

(1) 組織特異的 Cdc7 あるいは ASK 欠損マウスの解析

神経系細胞特異的欠損マウス

Cdc7 または ASK 欠損マウスともに非常に似た表現型を示した。両マウスともに野生型より体長が小さく、生後 1 週間ほどから歩行時のバランスのもつれや震えなどの所見を示し、約 3 週間以内に致死に至る。脳の組織切片解析から、小脳の形成不全や大脳における層構造異常などが観察された。小脳においては生後数日の段階で小脳顆粒細胞の細胞増殖および移動により小脳が発達形成されていくが、欠損マウスでは小脳顆粒細胞における BrdU の取り込みが低下しており、細胞増殖が阻害されていることが明らかとなった。大脳の層構造において欠損マウスでは、第 V 層以降の形成が阻害されていたが第 VI 層は形成されていた (図 2 上段)。

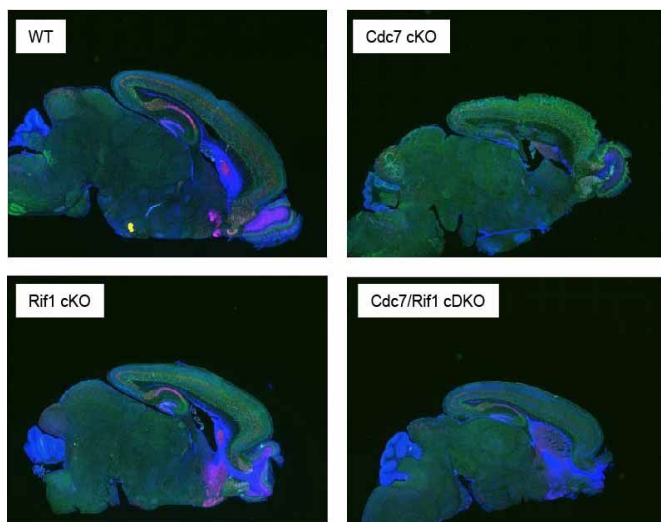


図 2. P6 における各欠失マウスの脳切片の免疫染色像 [Tbr1 (緑: VI 層マーカー)、Ctip2 (赤: V 層マーカー)、核染色 (青)]
Cdc7 欠失 (右上) では大脳皮質の V 層形成が阻害されているが、RIF1 との二重欠失 (右下) では部分的に回復した。

血球系細胞特異的欠損マウス

神経細胞における欠損とは異なり、Cdc7 あるいは ASK 欠損は全く異なる表現型を示した。ASK 欠損マウスでは胎生期～生後数日で重度の貧血を示し致死するだけでなく、造血幹細胞数の低下やリンパ球の分化異常が観察され、血球系細胞の細胞増殖に ASK が必須であることが明らかとなった。一方で、Cdc7 欠損マウスでは全く異なる表現型を示し、個体の生存及び多くの血球系細胞の細胞数や分化に異常は見られない。また、Cdc7 欠損細胞を刺激し細胞増殖を誘導し DNA 複製開始の指標である MCM のリン酸化レベルを検討したが、Cdc7 欠損では野生型と同レベルリン酸化が起きており、Cdc7 の機能を代替するキナーゼが存在する可能性が強く示唆された。この結果から、血球系細胞において Cdc7 は必須ではなく、Cdc7 を必要としない DNA 複製開始メカニズムが存在することが明らかとなった。

これらの結果は、従来考えられていた Cdc7-ASK 複合体による DNA 複製開始のメカニズムだけでなく、生体内においては各臓器や細胞系列ごとに、Cdc7 や ASK に依存しない多様な DNA 複製開始制御メカニズムが存在することが強く示唆された。

(2) 二重欠損マウスの解析、Cdc7 欠損時の複製様式

酵母では Cdc7 欠失による細胞増殖の阻害は DNA 複製開始を負に制御する因子である Rif1 との二重欠損により回復する。そこで、個体における各臓器の形成にも同様のことが生じるのか検討を行った。その結果、神経細胞特異的欠損で見られた所見の多くが二重欠損マウスでは回復されているだけでなく（図 2 下段）血球系細胞特異的欠損における表現型も回復した。また血球系細胞特異的 ASK 欠損の表現型は、CDK の活性を阻害する p21 との二重欠損でも多くの表現型の回復が確認されたことから、ASK 欠損血球系細胞では CDK 活性により MCM をリン酸化し DNA 複製開始を促進すると考えられる。

本研究の解析から、Cdc7 や ASK が個体を形成する異なる細胞系列において、異なる要求性を示すこと、Cdc7 あるいは ASK 非依存的な複製様式が存在すること、Rif1 や Cdk 阻害因子がそれらの経路を阻害していることが明らかとなった（図 3）。細胞が正常に機能することや細胞分化の段階において、Cdc7 や ASK が相互作用因子を取り替えることにより多様な機能を獲得している（標的基質の変更など）可能性があり、このような分子機構は他のキナーゼ因子の機能制御にも関与する可能性がある。また、生体内では細胞系列ごとに多様な DNA 複製開始システムが採用されている可能性があり、Cdc7-ASK 非依存的な新規複製制御機構の解明は、DNA 複製機構の多様性を明らかにし、癌細胞や正常細胞、細胞系列特異的な細胞増殖メカニズムに新たな知見をもたらす。又、細胞種特異的な複製メカニズムの解明は、癌などの疾患細胞を標的とした新規創薬に繋がる可能性がある。

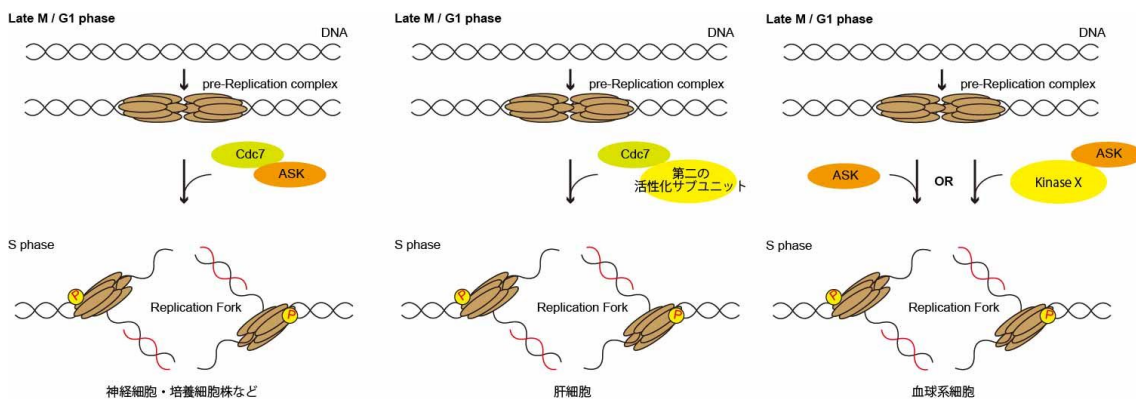


図 3. 本研究による DNA 複製機構の概略図
 左：Cdc7-ASK 依存的 DNA 複製機構
 中：ASK 非依存的 DNA 複製機構（ASK 以外の第二の活性化サブユニット存在する可能性）
 右：Cdc7 非依存的 DNA 複製機構（ASK が Cdc7 以外のキナーゼを活性化 or ASK 単独でリン酸化以外の機能を有している可能性）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tomohiro Iguchi, Satoshi Yamazaki, Tomio Ono, Rie Ishii, Karin Hori, Shunsuke Kobayashi, Hisao Masai
2. 発表標題 Roles of Cdc7 and its activation subunit ASK(Dbf4) in immune cell proliferation and differentiation
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 Karin Hori, Tomohiro Iguchi, Satoshi Yamazaki, Tomio Ono, Chiaki Maruyama, Hisao Masai
2. 発表標題 Roles of Cdc7-ASK kinase complex in brain development
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 Tomohiro Iguchi, Karin Hori, Tomio Ono, Rie Ishii, Satoshi Yamazaki, Hisao Masai
2. 発表標題 Neural stem cell- or Hematopoietic stem cell-specific knockout of Cdc7 or ASK(Dbf4) exhibits common and distinct phenotypes
3. 学会等名 先端モデル動物支援 若手支援技術講習会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiro Iguchi, Satoshi Yamazaki, Tomio Ono, Rie Ishii, Karin Hori, Shunsuke Kobayashi, Hisao Masai
2. 発表標題 The activation subunit of Cdc7, ASK(Dbf4), but not Cdc7 catalytic subunit, is essential for immune cell proliferation and differentiation
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 Karin Hori, Tomohiro Iguchi, Satoshi Yamazaki, Tomio Ono, Chiaki Maruyama, Hisao Masai
2. 発表標題 Role of Cdc7-ASK kinase complex in brain development
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------