

**科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書**

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：14301  
 研究種目：挑戦的萌芽研究  
 研究期間：2011～2012  
 課題番号：23651046  
 研究課題名（和文） 細胞周期特異的デグロンによる蛋白質発現制御と機能解析への応用  
 研究課題名（英文） Regulation of protein expression using a cell cycle-specific degron and its application to functional analysis

研究代表者  
 高田 穰 （ TAKATA MINORU ）  
 京都大学・放射線生物研究センター・教授  
 研究者番号：30281728

研究成果の概要（和文）： 細胞周期を同定するマーカーである FUCCI を参考に、細胞周期特異的に蛋白質発現制御を目指した。ニワトリ Cdt1 と Geminin 配列からデグロン配列候補の同定を行い、GFP 融合型として発現させたが、発現量が低く、残念ながら細胞周期を確実に同定するに至らなかった。しかし、酵母 Sld3 のホモログとされる Treslin/ticrr 遺伝子を、オーキシン誘導性デグロン（AID）の系を用いたコンディショナル細胞として作成することには成功した。

研究成果の概要（英文）： FUCCI is a recently developed cell cycle specific fluorescent maker. This is based on the cell cycle dependent degradation of Cdt1 or Geminin proteins induced by polyubiquitination. We reasoned this can be exploited if we fuse a part of Cdt1 or Geminin used in FUCCI with a protein for controlling expression in a cell cycle specific manner. This would be most useful when used in combination with powerful genetics in chicken DT40 cell system. Thus we cloned chicken Cdt1 or Geminin that corresponds to part of human Cdt1 or Geminin used for FUCCI. However, we could not achieve high expression levels in wild type DT40 cells. We have created a cell line rendered conditionally deficient in the Treslin gene, which is a yeast Sld3 homolog essential for initiation of DNA replication. This cell line would be useful to study Treslin function.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA 修復、DNA 損傷チェックポイント、Treslin、Geminin、Cdt1、細胞周期特異的デグロン

## 1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷修復、複製、チェックポイントなどの分子機構は、細胞周期の制御と密接に関連しており、細胞周期ごとに特定の分子機構を発動させる。これらの分子の機能の全容解明には、細胞周期ごとの機能を別々に解析することが必要である。

この目的では、従来二つの方法が主に使用されてきた。第一の方法は、細胞周期の同調培養である。G1/S 期の境界で細胞周期を止める Double thymidine block 法や、M 期での微小管重合阻害を行う nocodazol 処理、細胞のサイズで分離する counter flow elutriation 法などがあげられるが、いずれも手間がかかり、また薬剤処理に伴う二次的な影響の可能性もある。二つ目の方法は、細胞周期特異的に発現する分子をマーカーに、細胞集団中から特定の細胞周期の細胞を同定し、解析するものである。たとえば、S 期のマーカーとしてサイクリン A の発現が用いられている。しかし、こういった方法の応用は、主に免疫組織化学を用いた発現や局在の解析に限られ、薬剤感受性などの細胞集団として機能を直接測定するアッセイには応用が難しい。

最近、蛍光蛋白質を利用した細胞周期インジケーターFUCCI (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator)が開発され、細胞の増殖と細胞周期進行を追跡するマーカーとして大きな成果をあげている (Cell 132:487, 2008)。FUCCI は複製ライセンスに関与する Cdt1 と Geminin 蛋白質の分解シグナル配列 (デグロン配列) をそれぞれ異なる蛍光蛋白質と融合させたもので、Cdt1 はユビキチン E3 リガーゼ SCF<sup>skp2</sup> によって、Geminin は APC/C<sup>Cdh1</sup> により細胞周期依存的にポリユビキチン化後、迅速に分解される性質を利用している。2 種類の FUCCI を発現した細胞は、前者は G1 期から S 期早期に、後者では S 期から G2 期にかけて、それぞれ発現 (緑色と赤色の発光) が特異的に観察される。したがって、特定の細胞周期にある細胞を集団内で同定する目的で FUCCI も使用可能である。

本研究では、FUCCI の原理を応用して、細胞周期特異的に蛋白質発現を制御し、細胞周期により変化する蛋白質機能を解明することを試みた。

近年の複製メカニズム理解の進展にもかかわらず、複製開始の必須因子、酵母 Sld3 の高等真核生物ホモログは未同定であった。しかし、最近の研究により、Sld3 ホモログの候補として Treslin が同定された。また、魚類モデル生物のゼブラフィッシュにおける変異体スクリーニングにより、チェックポイントに関わると考えられる ticrr 分子が同定されたが、これは実は、Treslin と同一分子であった。これらの発見をうけて、Treslin/ticrr 分子が、DNA 複製とチェックポイント応答にどのように関与するのか、解明することは重要な問題と考えられる。

## 2. 研究の目的

ニワトリ Cdt1 と Geminin のデグロン配列を GFP 蛋白質との融合型として発現させ、細胞周期ごとの発現制御法を確立する。その後、Treslin/Ticrr 遺伝子をデグロン融合型として発現させ、その細胞周期特異的機能解析における有用性を検討することとした。

## 3. 研究の方法

以前ヒト配列にもとづいた FUCCI と同じ Cdt1 と Geminin のデグロン配列を用いて、GFP との融合蛋白質を DT40 に発現させたが、細胞周期特異的な発現分解を認めることができなかった (島根大学医学部、浦野研究室との共同研究、未発表)。これは、Cdt1 も Geminin も、ヒトとニワトリの配列の保存性が、特にデグロンを含む部分においてそれほど高くないためと考えられる。そこで、ニワトリ Cdt1 と、Geminin をクローニングし、デグロン配列の候補を同定した。ニワトリ Cdt1 アミノ酸配列 51-166 は、CDK/cyclin との会合に必要な Cy モチーフに該当する部分 (大文字、KRL) と CDK によるリン酸化サイト候補 (TPTR) を含んでいる。一方、ニワトリ Geminin アミノ酸配列 10-116 は、APC/C による分解配列 D-box (PRTLKMIQP) を含む。これらの Cdt1 と Geminin の配列を DT40 由来の cDNA から PCR で増幅し、GFP の C 末に融合させる発現コンストラクトを作成した。これらを DT40 細胞に導入し、発現細胞を単離した。

ゲノム配列からデザインしたプライマーを用いて Treslin 遺伝子の一部を増幅し、ターゲティングベクターを作成した。このベクターを、DT40 細胞に導入し、片方アレルが破壊されたヘテロノックアウト細胞を得た。親

株にはイネ由来の OsTIR1 遺伝子をあらかじめ発現しているものを用いている。オーキシンドグロンのシステムでは、植物ホルモンであるオーキシシン (3-Indoleacetic acid, IAA) を培地に添加すると、すみやかにユビキチン E3 リガーゼである OsTIR1 と AID(auxin-inducible degron)が結合し、タンパク質破壊シグナルであるポリユビキチン化により、発現している AID と融合させたダウンレギュレーションさせたい目的蛋白質が分解される。Treslin の全長 cDNA を DT40 cDNA から増幅し、AID 配列と FLAG タグ配列をそれぞれ 5'末端と 3'末端に融合させて、発現ベクターにクローニングした。この cDNA を前述のヘテロノックアウト細胞にトランスフェクションし、発現させた。最終的に、異なるマーカー遺伝子を用いたターゲットベクターの導入により、両方のアレルが破壊された細胞を単離した。

#### 4. 研究成果

ニワトリ Cdt1 と Geminin 配列からデグロン配列候補の同定を行い、ニワトリ Cdt1 (アミノ酸配列 1-499)、Cdt1 (150-499)、Geminin (1-110) をそれぞれクローニングし、GFP 融合型デグロン発現ベクターを作成した。作成した GFP 融合型デグロン発現ベクターを野生型 DT40 に stable に導入し、発現細胞の単離を行ったが、発現量が少なく、残念ながら細胞周期を確実に同定するに至らなかった。

Treslin/ticrr 遺伝子を、オーキシシン誘導性デグロン (AID) の系を用いたコンディショナル細胞として作成することができた。オーキシシン添加後わずか 15 分程度のうち、発現が完全に失われる細胞が作成できた。この細胞は予想どおり lethal であったが、様々な薬剤には特に感受性を示さなかった。この細胞は Treslin の機能解明にきわめて有用と考えられる。今後、チェックポイントの欠損について解析を進める予定である。

#### 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 16 件)

(1) Sato K, Toda K, Ishiai M, Takata M, Kurumizaka H. DNA robustly stimulates FANCD2 monoubiquitylation in the complex with FANCI. *Nucleic Acids Res.* 2012 May 1;40(10):4553-61.

DOI: 10.1093/nar/gks053.

(2) Histone chaperone activity of Fanconi anemia proteins, FANCD2 and FANCI, is required for DNA crosslink repair. Sato K, Ishiai M, Toda K, Furukoshi S, Osakabe A, Tachiwana H, Takizawa Y, Kagawa W, Kitao H, Dohmae N, Obuse C, Kimura H, Takata M, Kurumizaka H. *EMBO J.* 2012 Jul 24;31(17):3524-36.  
DOI: 10.1038/emboj.2012.197.

(3) Mcm8 and Mcm9 Form a Complex that Functions in Homologous Recombination Repair Induced by DNA Interstrand Crosslinks. Nishimura K, Ishiai M, Horikawa K, Fukagawa T, Takata M, Takisawa H, Kanemaki MT. *Mol Cell.* 2012 Aug 24;47(4):511-22.  
DOI: 10.1016/j.molcel.2012.05.047.

(4) A ubiquitin-binding protein, FAAP20, links RNF8-mediated ubiquitination to the Fanconi anemia DNA repair network. Yan Z, Guo R, Paramasivam M, Shen W, Ling C, Fox D 3rd, Wang Y, Oostra AB, Kuehl J, Lee DY, Takata M, Hoatlin ME, Schindler D, Joenje H, de Winter JP, Li L, Seidman MM, Wang W. *Mol Cell.* 2012 Jul 13;47(1):61-75.  
DOI: 10.1016/j.molcel.2012.05.026.

(5) NBS1 directly activates ATR independently of MRE11 and TOPBP1. Kobayashi M, Hayashi N, Takata M, Yamamoto K. *Genes Cells.* 2013 Mar;18(3):238-46.  
DOI: 10.1111/gtc.12031.

(6) Ishiai M, Uchida E, and Takata M. Establishment of the DNA repair-defective mutants in DT40 cells. *Methods Mol Biol.* 2012;920:39-49.  
DOI: 10.1007/978-1-61779-998-3\_4.

(7) Kitao H, Nanda I, Sugino RP, Kinomura A, Yamazoe M, Arakawa H, Schmid M, Innan H, Hiom K, Takata M. FancJ/Brip1 helicase protects against genomic losses and gains in vertebrate cells. *Genes to Cells* 2011 Jun;16(6):714-27.  
DOI: 10.1111/j.1365-2443.2011.01523.x.

(8) Yamamoto KY, Kobayashi S, Kurumizaka H, Takata M, Kono K, Jiricny J, Takeda S, Hirota K. The involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011 Apr 19;108(16):6492-6.  
DOI: 10.1073/pnas.1018487108

(9) Guervilly JH, Renaud E, Takata M, Rosselli F. USP1 deubiquitinase maintains phosphorylated CHK1 by limiting its DDB1-dependent degradation. *Hum Mol Genet.* 2011 Jun

1;20(11):2171-81.

DOI: 10.1093/hmg/ddr103

(10) Predisposition to cancer caused by genetic and functional defects of Mammalian atad5. Bell DW, Sikdar N, Lee KY, Price JC, Chatterjee R, Park HD, Fox J, Ishiai M, Rudd ML, Pollock LM, Fogoros SK, Mohamed H, Hanigan CL; NISC Comparative Sequencing Program, Zhang S, Cruz P, Renaud G, Hansen NF, Cherukuri PF, Borate B, McManus KJ, Stoepel J, Sipahimalani P, Godwin AK, Sgroi DC, Merino MJ, Elliot G, Elkahoun A, Vinson C, Takata M, Mullikin JC, Wolfsberg TG, Hieter P, Lim DS, Myung K. *PLoS Genet.* 2011 Aug;7(8):e1002245.

DOI: 10.1371/journal.pgen.1002245

(11) Direct Inhibition of TNF- $\alpha$  Promoter Activity by Fanconi Anemia Protein FANCD2. Matsushita N, Endo Y, Sato K, Kurumizaka H, Yamashita T, Takata M, Yanagi S. *PLoS One.* 2011;6(8):e23324.

DOI: 10.1371/journal.pone.0023324

(12) Formaldehyde catabolism is essential in cells deficient for the Fanconi anemia DNA-repair pathway. Rosado IV, Langevin F, Crossan GP, Takata M, Patel KJ. *Nat Struct Mol Biol.* 2011 Nov 13;18(12):1432-4.

DOI: 10.1038/nsmb.2173.

(13) ATR-Chk1 signaling pathway and homologous recombinational repair protect cells from 5-fluorouracil cytotoxicity. Fujinaka Y, Matsuoka K, Iimori M, Tuul M, Sakasai R, Yoshinaga K, Saeki H, Morita M, Kakeji Y, Gillespie DA, Yamamoto KI, Takata M, Kitao H, Maehara Y. *DNA Repair (Amst).* 2012 Mar 1;11(3):247-58.

DOI: 10.1016/j.dnarep.2011.11.005

(14) Shigechi T, Tomida J, Sato K, Kobayashi M, Eykelenboom JK, Pessina F, Zhang Y, Uchida E, Ishiai M, Lowndes NF, Yamamoto K, Kurumizaka H, Maehara Y, Takata M. ATR-ATRIP kinase complex triggers activation of the Fanconi anemia DNA repair pathway. *Cancer Res.* 2012 Mar 1;72(5):1149-1156.

DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-11-2904

(15) Kitao H, Takata M. Fanconi anemia: a disorder defective in the DNA damage response. *Int J Hematol.* 2011 Apr;93(4):417-24.

DOI: 10.1007/s12185-011-0777-z

(16) Takata M. Guest editorial: fanconi anemia and the DNA damage response. *Int J Hematol.* 2011 Apr;93(4):415-6.

DOI: 10.1007/s12185-011-0832-9

[学会発表] (計 6 件)

(1) 高田 穰:「DNA 損傷シグナルとファンコニ貧血経路」生体調節研究所セミナー講演 2012 年 11 月 15 日 (招待講演)

(2) Minoru Takata, Asuka Hira, Naoya Suzuki, Akira Niwa, Tatsutoshi Nakahata, Hiromasa Yabe, Megumu K. Saito, Keitaro Matsuo, Miهارu Yabe: “Genetic interplay between the Fanconi anemia pathway and aldehyde metabolism in humans” The 8<sup>th</sup> 3R Symposium Nov 2012 淡路市

(3) Minoru Takata, Asuka Hira, Naoya Suzuki, Akira Niwa, Tatsutoshi Nakahata, Hiromasa Yabe, Megumu K. Saito, Keitaro Matsuo, Miهارu Yabe: “Genetic interplay between the Fanconi anemia pathway and aldehyde metabolism in humans” 28th RBC-NIRS INTERNATIONAL SYMPOSIUM Nov 2012, 京都市

(4) Minoru Takata: “Molecular pathogenesis of Fanconi anemia” 第 54 回日本小児血液・がん学会学術集会 2012 年 11 月 横浜

(5) 高田穰、富田純也、板谷 (内田) 亜希子、茂地智子、海野純也、前原善彦、石合正道:「ファンコニ貧血コア複合体による ATR-ATRIP キナーゼのクロマチン動態制御」第 70 回日本癌学会学術総会 シンポジウム “Molecular basis of genome instability in cancer” 2011 年 10 月 名古屋市

(6) Takata, M: 「ファンコニ貧血と DNA 損傷シグナリング」シンポジウム「International session for DNA repair and related subjects」日本放射線影響学会第 54 回大会 招待講演 2011 年 11 月 神戸市

[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.rbc.kyoto-u.ac.jp/Late\\_Effect/Site\\_1/Welcome.html](http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/Late_Effect/Site_1/Welcome.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

高田 穰 (TAKATA MINORU)  
京都大学・放射線生物研究センター・教授  
研究者番号：30281728