

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24506

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430171

研究課題名(和文) 新規なPCNAアンロード機構による細胞周期制御とゲノム維持

研究課題名(英文) cell cycle regulation and genome integrity by novel PCNA unloading mechanism

研究代表者

塩見 泰史 (SHIOMI, Yasushi)

兵庫県立大学・生命理学研究科・准教授

研究者番号：80380567

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：PCNAはローダーとして機能するRFC複合体によりDNAにロードされ、ゲノム制御因子のDNA集合と反応の中心となる。したがって、RFC1-RFCやCtf18-RFCによるPCNAロードはゲノム維持に必須である。本研究では、機能未知のもう1つのRFC複合体、Elg1-RFCについて解析を行った。

Elg1欠失細胞ではDNA結合PCNAが過剰になり、S期の進行は遅延した。また、クロマチン構成因子のDNA結合量は低下し、M期では壊れた染色体が多く観察された。以上より、Elg1-RFCはPCNAアンローダーとしてDNA結合PCNA量を制御し、周期進行とゲノム維持に寄与することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：PCNA is loaded on chromatin by PCNA loading RFC complex upon initiation of S phase and acts as a platform for a large number of proteins involved not only in DNA replication, but also in replication-linked various processes. To date, three RFC complexes related with PCNA were identified. RFC1-RFC and Ctf18-RFC, function as a PCNA loader, loads PCNA onto DNA. Elg1-RFC also relates with PCNA, but its physiological role in PCNA regulation on chromatin remained unclear.

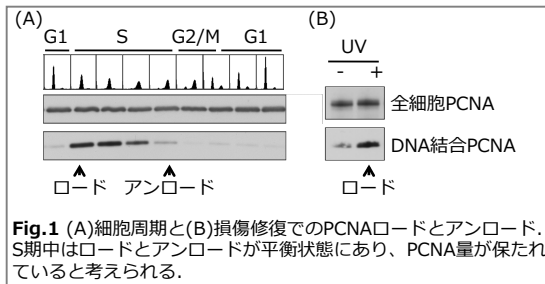
In this study, PCNA levels on chromatin were increased in Elg1-depleted cells. Various chromatin-associated protein levels on chromatin were affected, and in mitosis, cells with aberrant and lagging chromosomes were frequently detected. These findings suggest that Elg1-RFC has an important role in maintaining chromosome integrity by regulating PCNA levels on chromatin, thereby acting as a PCNA unloader. Our findings demonstrate that Elg1-RFC have unique roles for genome integrity by controlling PCNA on chromatin.

研究分野：分子生物学

キーワード：PCNA RFC複合体 PCNAローディング PCNAアンローディング 細胞周期制御 ゲノム維持

1. 研究開始当初の背景

ヒト PCNA (増殖細胞核抗原) は、リング構造を持つホモ 3 量体タンパク質で、その中央に二本鎖を通す様式で DNA にロード (結合) する。ゲノム維持において、複製 (S 期) の開始と共に DNA 結合する PCNA は複製ポリメラーゼ、DNA やタンパク質の修飾酵素など様々な因子の DNA 集合と反応の中心的役割を担っている。S 期の間、DNA 結合した PCNA 量は一定に保たれることで安定な複製フォーク進行に寄与している。複製完了後の G2/M 期では、PCNA は DNA からアンロード (解離) して、ゲノムは娘細胞に分配され次の細胞周期をむかえる (Fig. 1A)。また、複製前 (G1 期) の PCNA は DNA 結合していないが、紫外線などで DNA 損傷が起こった場合には、修復の過程で DNA 結合して機能する (Fig. 1B)。



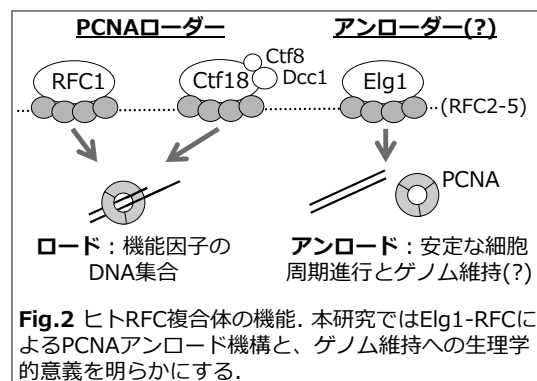
しかし、PCNA それ自体には DNA への結合能はなく、リングを一時的に開環して結合を仲介するのが PCNA ロードとして機能する RFC (複製因子 C) 複合体で、ヒトでは 3 種存在する (Fig. 2)。DNA ポリメラーゼの補助因子として PCNA と共に複製や修復で機能する RFC1-RFC、コヒージョンへの関与が酵母で示された Ctf18-RFC、同じく酵母でゲノム維持への寄与が示唆された Elg1-RFC である。これらは各複合体の特性を決めている 1 つの特異的大サブユニット (RFC1、Ctf18、Elg1) と、4 つの共通小サブユニット (RFC2, 3, 4, 5) で構成される。Ctf18-RFC はさらに特異的なサブユニット、Ctf8 と Dcc1 を含む。精製複合体の電子顕微鏡観察や生化学的解析からは、RFC1-RFC と Ctf18-RFC が同等の分子構造、PCNA や DNA との結合、ATPase 活性、PCNA ロード活性等の生化学的機能を持つことが分かった (Shiomi *et al*, 2000, *PNAS* および 2004, *Genes Cells*, Ohta, Shiomi *et al*, 2002, *JBC*)。

私は、これらの RFC 複合体が細胞中でどのような特異性を示し役割分担をしているの

か、また機能連係しているのかに興味を持ち解析を行ってきた。精製複合体を用いた解析では、Ctf18-RFC をヒト細胞抽出液の分画に添加し、特異的に促進される DNA 合成活性を指標にした精製と質量分析による同定を行った。その結果、Ctf18-RFC が S 期での損傷乗り越え DNA 合成で機能するポリメラーゼ  $\eta$  と直接結合してその活性を促進することが分かり、複製中の損傷に応答した制御にも関与することを示した (Shiomi *et al*, 2007, *JBC*)。また、複製や損傷修復過程で PCNA 依存的に機能するユビキチンリガーゼ、CRL4<sup>Cdt2</sup> による基質分解と RFC 複合体との細胞内機能連係について解析を行った。その結果、複製では Ctf18-RFC が、損傷応答時には RFC1-RFC が CRL4<sup>Cdt2</sup> によるユビキチン修飾反応に関与すること、さらに Ctf18 と RFC1 自身の CRL4<sup>Cdt2</sup> への結合がユビキチン化活性を制御する可能性が得られた。特に Ctf18 の機能欠損は、複製のライセンス化因子 Cdt1 の分解を阻害する結果、過剰な再複製が誘起されゲノム維持が破綻することが分かった。

この解析過程では予期せずに、Elg1 をノックダウンした非同調細胞内で DNA 結合した PCNA 量が対照 (siRNA 未導入、または siRFC1、siCtf18) と比較して過剰になることがウエスタンと免疫染色から、S 期の進行が遅延することがフローサイトメーターの解析で示された。

以上から、Elg1-RFC は RFC1-RFC や Ctf18-RFC とは異なり、PCNA を DNA から外す “PCNA アンローダー” として DNA 結合した PCNA 量を制御し、DNA 複製や染色体分配など安定な細胞周期進行とゲノム維持に機能していることが強く示唆された (Fig. 2)。また Elg1-RFC は、DNA 損傷修復後の PCNA アンロードにも機能することが考えられた。



## 2. 研究の目的

そこで本研究では、(1)細胞周期と損傷修復過程での Elg1-RFC の細胞内動態と、(2)RNAi による Elg1 ノックダウン細胞でのゲノム維持への影響を、複製や修復における因子の DNA 集合、細胞周期進行、クロマチン高次構造形成、DNA 変異導入率等から解析し、(3)精製 Elg1-RFC を用いた PCNA アンロードの分子機構を解析して、Elg1-RFC による細胞周期制御とゲノム維持機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Elg1-RFC 解析の基礎となる①抗 Elg1 抗体と、②Elg1 の組換えタンパク質発現系を作製する。これと平行して、(2) RNAi による Elg1 ノックダウンと PCNA の過剰な DNA 結合がゲノム維持に与える影響を、①複製や修復における因子の DNA 集合、細胞周期進行、クロマチン高次構造形成、細胞生存率、DNA 損傷修復、DNA 変異導入等から解析する。さらに、(3)細胞周期過程での Elg1-RFC の細胞内動態を特に複製、修復でのクロマチン集合や、PCNA との局在から解析する。そして、(4)精製タンパク質を用いた *in vitro* 反応系で、Elg1-RFC による PCNA アンロードの分子機構を解析する。(1)から(4)の解析結果を統合して、Elg1-RFC による細胞周期制御とゲノム維持機構を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1)①抗 Elg1 抗体の作成。これまでに、市販の抗 Elg1 抗体では細胞内在の Elg1 をウエスタン、免疫染色で検出することはできなかったが、当該研究で作成した抗 Elg1 ポリクローナル抗体で、細胞内在性 Elg1 のウエスタンでの検出が可能になり、解析の進捗があった。しかし、この抗体は免疫染色ではバックグラウンドが高く使用できないので、今後、異なる抗原部位による抗体の作成も検討している。

②これまでから RFC1、Ctf18、および、RFC 複合体を形成する他のサブユニットの組換えタンパク質の昆虫発現系を所有していたので、Elg1 についても当初の予定どおり同じ発現系の作成を行った。しかし、組換え Elg1 は他の RFC 複合体とは異なり、昆虫細胞内では非常に分解されやすいことが分かった。そこで、ヒト細胞発現系 (Uno et al., Methods,

2012) からの精製に切り替え、発現コンストラクトの構築と、ヒト細胞内での発現チェックをおこなった。その結果、昆虫細胞に比べ Elg1 の安定性が格段に改善された。そして、パイロット実験としてスモールスケールで精製を行い、複合体を得ることができる精製条件を確立した。

(2) Elg1-RFC の細胞内における基本機能を明らかにするため、RNAi 法による Elg1 ノックダウン細胞の解析を行い、以下の結果を得た。①対照細胞と比較して、複製(S)期におけるクロマチン結合した PCNA 量が過剰になることがウエスタン法、免疫染色法で明らかになった。DNA 合成のマーカとなる BrdU の取り込みと PCNA の共染色では、DNA 合成が行われている部位以外でも PCNA がクロマチン結合していることが示された。

②S 期の進行が遅延するがチェックポイント機構は応答しておらず、クロマチン結合した過剰な PCNA が安定な細胞周期進行を阻害することが示唆された。また、通常は S 期後の G2 期では PCNA はクロマチンから除去されるが、ノックダウン細胞では PCNA はクロマチンに結合したままであることが示された。

③過剰にクロマチン結合した PCNA が他のクロマチン結合因子に与える影響を解析した結果、ヒストン H3 やセントロメアタンパク質 CENPA などクロマチンの基本構造形成に関わる因子には影響がなかったが、コヒーシサブユニット SMC3、クロマチンリモデリング因子 SNF2H、ヘテロクロマチン形成因子 HP1 $\alpha$  など、高次の染色体構造形成に関わる因子のクロマチン集合が阻害されることが示された。

④間期におけるクロマチン構造を核 Halo 標本、分裂期での染色体構造を M 期核標本を作製して解析した。その結果、ノックダウン細胞では間期核におけるクロマチン構造が緩んだ状態になっており、M 期核標本では断裂や崩壊していることを示す染色体が多数見られた。

(3) 成果(1)①で作成した抗 Elg1 抗体を用いて、細胞周期進行過程における Elg1 の発現と分解について解析を行った。その結果、Elg1 は RFC1 や Ctf18 と同様に周期を通して一定量が存在しており、このことから、Elg1

の修飾や未知の活性化因子の存在が示唆された。また、ヒト細胞からクロマチン結合画分を回収して、RFC 複合体と DNA との結合を解析した。その結果、RFC1-RFC、Ctf18-RFC よりも DNA との強固な結合を Elg1-RFC は示した。これは、Elg1-RFC が PCNA アンローダーとして機能するための特性の 1 つであると考へ、解析を進めている。

(4) 成果(1)②で精製した Elg1-RFC 複合体を用いてこれまでに、ヒト細胞から回収した PCNA 結合クロマチン画分から ATP 加水分解依存的に PCNA をアンロードする、という生化学的活性を直接に示すことができた。また、PCNA との結合解析では、他の RFC 複合体とは異なり、Elg1-RFC は PCNA との結合が弱いという結果を得た。これから、PCNA アンローダーである Elg1-RFC は他の RFC 複合体が行う PCNA ローディングの単なる逆反応とは異なる機能特性を持っていることが示唆される。そこで、精製タンパク質による再構築系で詳細な PCNA アンローディング機構の解明を現在も続けている。

以上より、Elg1-RFC は S 期においてクロマチン結合した PCNA を DNA 複製終了後に特異的にアンロードして、複製と連係した安定な細胞周期の進行や高次染色体構造の形成とゲノム維持に寄与していることが明らかになった。

(5) 成果(2)の過程において、Elg1 を RNAi すると、ヒストンタンパク質の修飾が全ゲノムレベルで大きく変化するという現象を見出した。当初の研究計画にはなかったが、この点についても解析を進めるため、CRISPR/Cas9 法による Elg1 のノックアウト細胞を作成し、現在 Elg1-RFC のヒストン修飾への寄与についての解析を進めている。

## 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 7 件)

① Masayuki Morino, Kohei Nukina, Hiroki Sakaguchi, Takeshi Maeda, Miyuki Takahara, Yasushi Shiomi, Hideo Nishitani. (2015) Mitotic UV irradiation induces a DNA

replication-licensing defect that potentiates G1 arrest response. *PLoS One*. 10(3):e0120553. (査読あり)  
doi: 10.1371/journal.pone.0120553.

② Yasushi Shiomi, Naohiro Suenaga, Miyuki Tanaka, Akiyo Hayashi, Hideo Nishitani. (2014) Imaging Analysis of Cell Cycle-Dependent Degradation of Cdt1 in Mammalian Cells. *Methods in molecular biology*. 1170:357-365. (査読あり)  
doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2\_18.

③ Hideo Nishitani, Masayuki Morino, Yusuke Murakami, Takeshi Maeda, Yasushi Shiomi. (2014) Chromatin Fractionation Analysis of Licensing Factors in Mammalian Cells. *Methods in molecular biology*. 1170:517-527. (査読あり)  
doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2\_28.

④ Akiyo Hayashi, Naohiro Suenaga, Yasushi Shiomi, Hideo Nishitani. (2014) PCNA-Dependent Ubiquitination of Cdt1 and p21 in Mammalian Cells. *Methods in molecular biology*. 1170:367-382. (査読あり)  
doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2\_19.

⑤ Masayuki Morino, Miyuki Tanaka, Yasushi Shiomi, Hideo Nishitani. (2014) Imaging Analysis to Determine Chromatin Binding of the Licensing Factor MCM2-7 in Mammalian Cells. *Methods in molecular biology*. 1170:529-537. (査読あり)  
doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2\_29.

⑥ Yasushi Shiomi, Hideo Nishitani. (2013) Alternative replication factor C protein, Elg1, maintains chromosome stability by regulating PCNA levels on chromatin. *Genes Cells*. 18(11):946-59. (査読あり)  
doi: 10.1111/gtc.12087.

⑦ 西谷 秀男、塩見 泰史. (2013) タンパク質分解系による染色体の再複製抑制機構。“ヒトと医学のステージへ拡大する細胞周期 2013” *実験医学増刊*. 31(2):39-44. (査

読なし)

〔学会発表〕(計 11 件)

① 塩見泰史、西谷秀男. PCNA アンローダー、Elg1-RFC の細胞内および生化学的機能の解析. 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会 合同大会. 2015 年 12 月 1 日～2015 年 12 月 4 日. 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市.

② 北詰麻衣、熊田(岸)ちひろ、村上裕輔、前田武志、塩見泰史、西谷秀男. DNA 複製ライセンス化因子 Cdt1 のリン酸化による M 期安定化機構の解析. 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会 合同大会. 2015 年 12 月 1 日～2015 年 12 月 4 日. 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市.

③ 見谷駿治、貫名康平、森野公之、塩見泰史、西谷秀男. DNA 複製時に機能する PCNA 依存性ユビキチンリガーゼ CRL4-Cdt2 の細胞周期制御. 第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会 合同大会. 2015 年 12 月 1 日～2015 年 12 月 4 日. 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市.

④ Akiyo Hayashi, Yasushi Shiomi, Tatsuro S Takahashi, Hideo Nishitani. IN VITRO ANALYSIS OF DNA-BOUND PCNA DEPENDENT UBIQUITIN LIGASE CRL4-CDT2. EUKARIOTIC DNA REPLICATION & GENOME MAINTENANCE. 2015 年 9 月 1 日～2015 年 9 月 5 日. CSHL, Cold Spring Harbor, NY, USA.

⑤ 塩見泰史、西谷秀男. PCNA アンローダー、Elg1-RFC の機能解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25 日～2014 年 11 月 27 日. パシフィコ横浜、神奈川県横浜市.

⑥ 林晃世、塩見泰史、高橋達郎、末永尚弘、西谷秀男. S 期クロマチン特異的なタンパク質分解酵素 CRL4-Cdt2 の制御機構. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25 日～2014 年 11 月 27 日. パシフィコ横浜、神奈川県横浜市.

⑦ 田中美如、高原教代、塩見泰史、西谷秀男. 紫外線 DNA 損傷時における Cdt1 分解の解析. 第 37 回日本分子生物学会年会. 2014 年 11 月 25 日～2014 年 11 月 27 日. パシフィコ横浜、神奈川県横浜市.

⑧ 塩見泰史、西谷秀男. Regulation of DNA replication and genome integrity by controlling PCNA on chromatin. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3 日～2013 年 12 月 6 日. 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市.

⑨ 末永尚弘、石井健士、塩見泰史、西谷秀

男. ゲノム維持に関わる酵素 CRL4-Cdt2 の機能解析. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3 日～2013 年 12 月 6 日. 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市.

⑩ 田中美如、石井健士、塩見泰史、西谷秀男. UV 照射時における DNA 修復過程と共役した Cdt1 分解. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3 日～2013 年 12 月 6 日. 神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市.

⑪ 林晃世、石井健士、塩見泰史、末永尚弘、西谷秀男. クロマチン上の PCNA に依存した CRL4Cdt2 のユビキチン化機構. 第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ. 2013 年 11 月 20 日～2013 年 11 月 22 日. ホテルニュー水戸屋、宮城県仙台市.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.u-hyogo.ac.jp/life/biosig/japanese/Top.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

塩見泰史 (SHIOMI, Yasushi)

兵庫県立大学・大学院生命理学研究科・准教授

研究者番号：80380567