

様式3

神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 31 年 4 月 4 日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 兵庫県立大学大学院・生命理学研究科
 職 名 助教
 研究代表者名 林 晃世

下記のとおり平成30年度の共同利用研究成果を報告します。

記

(課題番号:302001)

1. 共同利用研究 課題名	ゲノム維持に関わる CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの作動メカニズムの解明			
2. 共同利用研究 目的	CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼは、DNA 複製あるいは修復時に PCNA に結合した特定のタンパク質の分解に関わり、ゲノムの維持に重要な働きをしている。本研究では、局所 UV 照射後のライブイメージングにより、CRL4-Cdt2 が迅速に基質のユビキチン化を行う分子機構の解明を目指す。			
3. 共同利用研究 期間	平成 30 年 4 月 1 日 ～ 平成 31 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役 割 分 担	
(研究代表者) 林 晃世	生命理学研究科	助教	研究総括	
(分担研究者)				
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル統合経路研究 部門・ゲノム機能制御研 究分野	氏 名	菅澤 薫

※ 次の6～9の項目は、枠幅を自由に変更できます。但し、6～9の項目全体では1頁に収めて下さい。

6. 共同利用研究計画

CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼは、DNA 複製時に PCNA に依存して機能し、基質の分解を通して、細胞周期進行の調節や、ゲノムの安定性維持に働く。ライセンス化因子 Cdt1 を始めとする基質タンパク質は、PCNA 結合モチーフ”PIP ボックス”を介して PCNA に結合し、分解標的化配列”PIP デグロン”を Cdt2 に認識されることで、選択的に分解される。CRL4-Cdt2 は、DNA 複製だけでなく、UV 照射などの DNA 損傷時にも基質の分解を行うことがわかっているものの、その機構の詳細は明らかではない。我々は、基質だけでなく、ユビキチンリガーゼ Cdt2 の C 末にも PIP ボックスを発見した(Hayashi et al., 2019)*。そこで本共同研究では、DNA 損傷時の Cdt2 の PIP ボックスの役割を明らかにするため、蛍光タンパク質で標識した Cdt1-EGFP を発現する細胞を用いて、核内に局所的に UV を照射して、Cdt1 の UV 損傷部位へのリクルートと分解速度がどう変化するかを解析する。

* **Direct binding of Cdt2 to PCNA is important for targeting the CRL4Cdt2 E3 ligase activity to Cdt1**
Hayashi A et al., Life Science Alliance, 2018 年 12 月

7. 共同利用研究の成果

(1) 共同利用研究先の共焦点レーザー顕微鏡を用いて、Cdt1-EGFP 細胞に三光子吸収法にて局所 UV 照射を行い、ライブイメージングを行った。照射 5 分後には Cdt1 が損傷部位へ集積し、30分後には核内の Cdt1 が分解されていく様子を捉えた(図 1)。

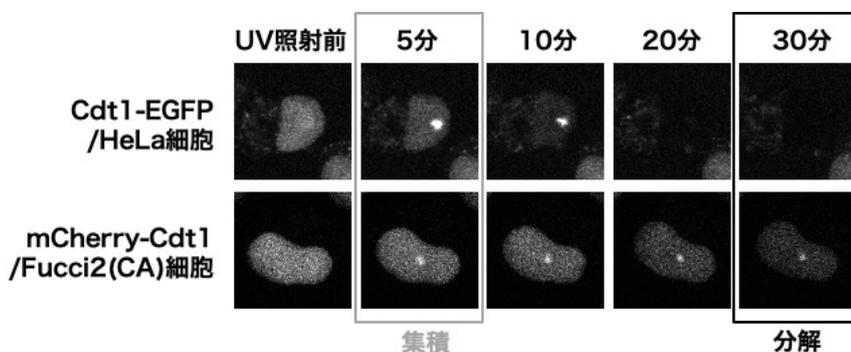


図1. 局所UV照射部位へのCdt1の集積と分解

(2) 次にユビキチンリガーゼ Cdt2 が損傷部位へ集合するか確かめた。Cdt2 の PIP ボックス変異体を発現する細胞では、Cdt2 野生型を発現する細胞と比べて、損傷部位へ Cdt2 の集合が遅れ、基質 Cdt1 の分解が抑制されることがわかった(Hayashi et al., 2019)*。今後、(1)の系を用いて、Cdt2 の PIP 変異体発現細胞での基質 Cdt1 の集合と分解過程を解析する予定である。

(3) (1)で UV を照射した細胞は、Cdt1 を発現しているので主に G1 期と考えられる。DNA 損傷によって Cdt1 が分解されたあと、どのように細胞周期が進行するのか、長時間タイムラプスを行って観察した。その結果、G1 期の DNA 損傷のあと、細胞は S 期に入るものの、その進行が遅延するという新たな結果が得られた。以上、本共同研究によって、DNA 損傷後に基質 Cdt1 の集合と分解が迅速に行われることを検出する方法を確立し、リガーゼ Cdt2 のもつ PIP ボックスの重要性を示した。

8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくと記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

未発表

9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

競争的資金の獲得

DNA 再複製に伴う細胞内応答の解析

兵庫県立大学: 平成 30 年度特別研究助成金(若手研究者支援用)

研究期間: 2018 年 4 月 - 2019 年 3 月 代表者: 林 晃世