

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

2020年 4月 15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2019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 複製時あるいは修復時に 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なう分子機構の解明を目指す。		
3. 共同利用研究 期間	2019年7月1日 ～ 2020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、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、紫外線照射などの DNA 損傷時にも同様の機構で基質の分解を行う。これまで、Cdt2 の C 末領域の解析より、DNA 結合部位を持つこと、損傷部位への集積に Cdt2 にも PIP ボックスが必要なこと、そしてリン酸化が PCNA との相互作用を調節することを明らかにしてきた (Nukina et al, 2018; Hayashi et al, 2018; Mazian et al, 2019)。これらドメインはいずれも Cdt2 の活性調節において重要な役割をもつと予想されるが、DNA 損傷部位への集積や基質分解にどのように寄与するのかわかっていない。

本共同研究では、DNA 損傷部位への Cdt2 の集積機構の詳細を明らかにするため、細胞核に局所的に紫外線を照射して、ライブイメージングにより Cdt2 の挙動を解析する。昨年度の共同利用研究では、EGFP-PCNA および Cdt1-EGFP が局所紫外線照射 5 分後に集積することを捉えた。今年度は、Cdt2 集積機構および C 末ドメインの役割を調べる。まず、蛍光タンパク質融合した野生型 Cdt2 を用いて集積速度を解析する。続いて、Cdt2 の DNA 結合部位の変異体および PIP ボックス変異体を用いて、野生型 Cdt2 と比較して、集積が遅れるか調べる。Cdt2 のリン酸化の効果を明らかにするため、G1 期 (Cdt2 は非リン酸化状態) と G2 期 (リン酸化状態) で集積に違いがあるかどうか比較する。さらに、野生型 Cdt2 と変異体で、基質 Cdt1 の分解速度に違いが生じるか調べる。以上より、Cdt2 の C 末に存在する各ドメインが DNA 損傷部位への CRL4-Cdt2 の集合を制御して、迅速に基質のユビキチン化が行われる機構を明らかにする。

7. 共同利用研究の成果

2019年度は、EGFP-Cdt2をU2OS細胞に発現させて局所紫外線照射を行い、DNA損傷部位への野生型Cdt2の集積を解析した。まず、EGFPを野生型Cdt2のN末に融合したEGFP-Cdt2 発現プラスミドを作製し、U2OS細胞に一過的に発現させた。EGFP-Cdt2は、内在性Cdt2の約4倍発現し、核に局在した。次に、ユビキチンリガーゼCRL4-Cdt2複合体として機能できるか確かめるため、CRL4の構成サブユニットであるDDB1、およびCul4Aとの結合を免疫沈降法で確認した。ユビキチン化の足場となるPCNAとCdt2との結合も確認した。ライブセルイメージングでは、紫外線照射部位のマーカーとして、mCherry-PCNAを用い、EGFP-Cdt2の集積を調べる予定である。そこで、mCherry-PCNAを安定発現するU2OS細胞株を樹立した。このmCherry-PCNA細胞に、マイクロポア紫外線照射法で核内に局所的なDNA損傷を引き起こし、DNA損傷マーカーとしてシクロブタン型ピリミジンダイマー (CPD)を用いて、免疫染色を行った。紫外線照射30分後にはCPDとmCherry-PCNAの共局在が確認できた。続いて、mCherry-PCNA安定発現株に、EGFP-Cdt2を一過的に発現させ、マイクロポア紫外線照射を行った。局所紫外線照射30分後に蛍光観察を行うと、mCherry-PCNAとEGFP-Cdt2が共局在することがわかった。以上のように、今年度はライブセルイメージング実験の基盤を整えた。続いて、野生型Cdt2および各種変異体 (DNA結合部位、PIPボックス、リン酸化部位) の安定発現細胞を用いて、紫外線照射後の基質Cdt1の分解速度を調べた。野生型Cdt2安定発現細胞では、紫外線照射後30分で80%のCdt1を分解する。この活性を1としたとき、DNA結合部位および変異体PIPボックス変異体では0.8倍、リン酸化部位変異体では1.2倍のCdt1分解が行われた。このことは、CRL4-Cdt2が迅速に基質を分解するためには、PIPボックスおよびDNA結合部位が必要であることを示している。一方で、CDKによるCdt2のリン酸化部位の18箇所のアラニン変異体では活性が亢進したことから、細胞周期だけでなく、紫外線照射後にも18箇所のリン酸化部位がCdt2の活性を負に制御することがわかった。以上より、Cdt2のC末に存在する各ドメインが、DNA損傷後のCRL4-Cdt2の活性を制御し、迅速にユビキチン化が行われることが明らかになった。今後、紫外線点照射部位への各変異体のライブイメージングを行い、Cdt2の集積速度を比較したい。

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の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。)

該当なし

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。

該当なし