

36. ユビキチン分解による DNA 複製ライセンス化機構の解明

工藤 保誠

*徳島大学 大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔分子病態学

Key words : 細胞周期, ユビキチン分解, がん, DNA 複製, DNA 複製ライセンス化

緒言

細胞は、「細胞周期」と呼ばれる増殖サイクルを通じて分裂し、その間に遺伝情報を正確に複製し、新しく細胞が生まれ出される。遺伝情報を正確に複製することは、種の保存や個体形成の基本となり、そのためには染色体は一度だけ正確に複製される必要がある。ヒト細胞では、DNA を正確に複製するために、極めて精巧なメカニズムを持っており、その破綻が発がんの原因となる。ヒト細胞では、複数の染色体上の膨大な DNA を効率よく複製するために、多くの複製開始点から同時に複製が起こる。この複製開始点の形成が DNA 複製ライセンス化であり、そのためには細胞周期において複製前複合体 (pre-replication complex; pre-RC) が、周期的に形成・崩壊を繰り返すことが必要である¹⁾。Pre-RC 形成は、ORC1-6 から成る ORC (複製開始点認識複合体) と Cdc6、Cdt1 による DNA 二本鎖開裂のための酵素である MCM2-7 複合体のクロマチンへの結合反応である (図1)¹⁾。

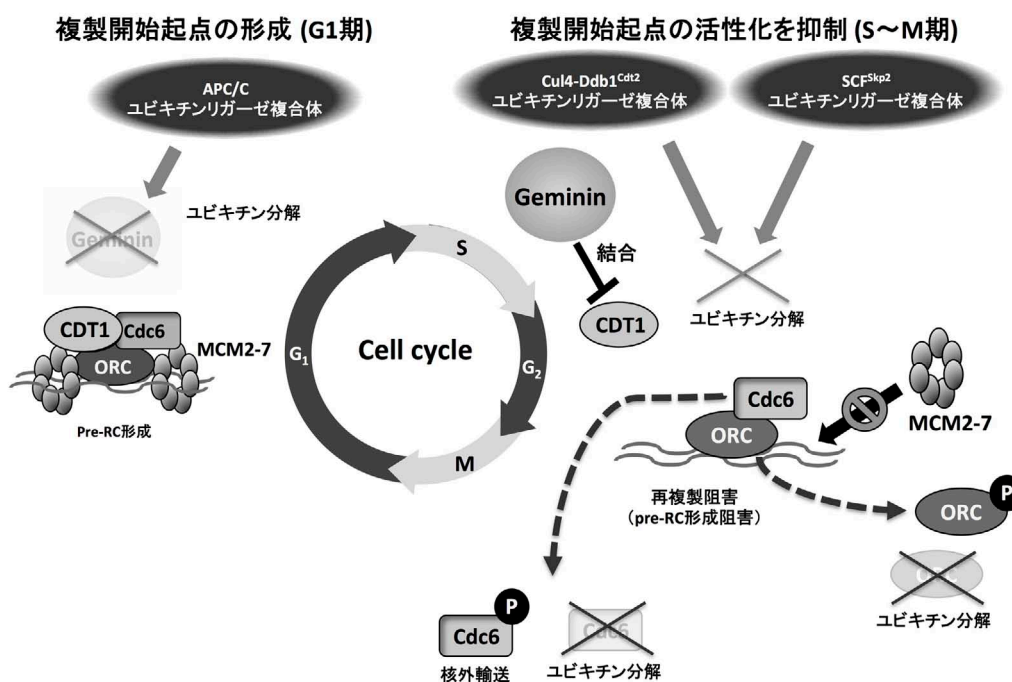


図1. pre-RC 形成と細胞周期

Pre-RC は、G1 期において、Cdc6 が Orc に結合した後、CDT1 がリクルートされ、MCM 複合体がクロマチンへローディングされることにより形成され、DNA 複製の準備が整う。S-G2 期では、Geminin が Cdt1 に結合してクロマチン上に載って再複製がおこらないように抑制している。

pre-RC 形成の詳細なメカニズムは未だ明らかになっていないが、Cdc6 が ORC に結合した後、Cdt1 がリクルートされ、MCM 複合体がクロマチンへローディングされ、pre-RC が形成される。複数の複製単位において、一細胞周期に正確に一度だけ複製反応が起こるようにしておく必要があり、Geminin は、S-G₂ 期において CDT1 に直接結合し、そのゲノムへの結合を阻害することで DNA 複製を一度に規定する (図 1) ²⁾。その後、Geminin は、G₁ 期に APC/C^{Cdh1} ユビキチンリガーゼ複合体によりユビキチン分解される ³⁾。よって、APC/C 活性の高い M 期終期から G₁ 期にかけてのみ pre-RC 形成は起こる。最近、我々は、細胞分裂期において Geminin タンパクが Aurora-A によって Thr25 がリン酸化され、APC/C によるユビキチン分解から免れ、安定化することを見いだした ^{4,5)}。さらに、安定化した Geminin は SCF^{Skp2} を介した CDT1 のユビキチン分解を抑制し、CDT1 を安定化させることで、G₁ 期での pre-RC 形成を適切に誘導し、次の S 期での DNA 複製を保証することを明らかにした (図 2) ^{4,5)}。

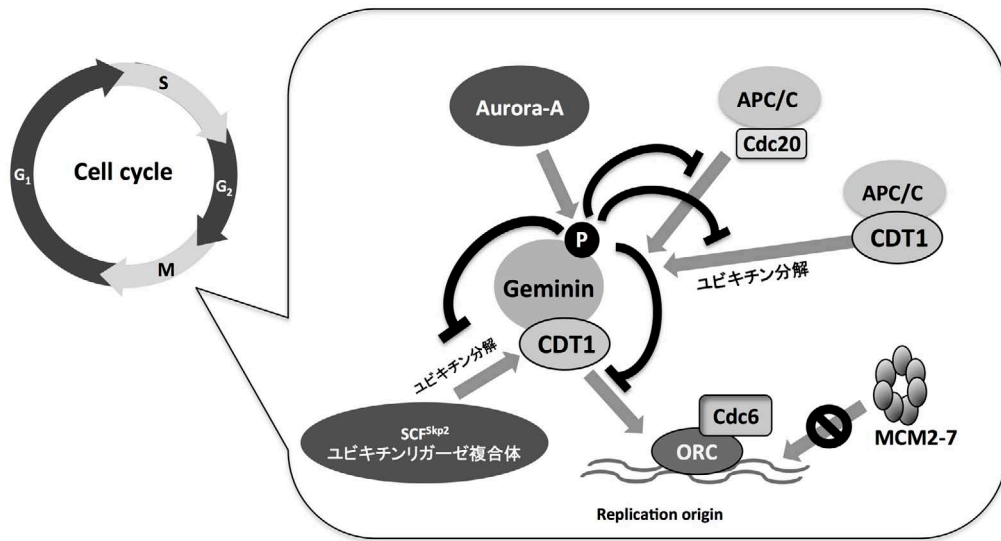


図 2. Aurora-A による Geminin の安定化がもたらす pre-RC 形成機構

分裂期において Aurora-A は Geminin の Thr25 をリン酸化し、APC/C^{Cdc20} および APC/C^{Cdh1} によるユビキチン分解を抑制する。安定化した Geminin は CDT1 に結合することで、DNA ライセンス化を抑制するとともに、CDT1 の SCF^{Skp2} によるユビキチン分解を阻害する。この機構は次の G₁ 期まで DNA ライセンス化を抑制することに加え、CDT1 のタンパク発現量を保ち、G₁ 期において適切に DNA ライセンス化 (pre-RC 形成) をおこなうために必須である。

ヒト細胞では、DNA 複製を一度に規定するには、Geminin と CDT1 の結合に加えて、SCF^{Skp2} ユビキチンリガーゼ複合体および Cul4-Ddb1^{Cdt2} ユビキチンリガーゼ複合体による CDT1 のユビキチン分解、Cdc6 のリン酸化による核外移行あるいはユビキチン分解、Orc1 のリン酸化あるいはユビキチン分解などが関連していると考えられている (図 1)。しかし、そのメカニズムの詳細はヒトでみられるユビキチン分解制御がマウス、酵母、カエル、ハエなどの他の種では異なることやユビキチン分解制御を包括的に研究されていないことから、未だ明らかにされていない。特に、DNA 複製ライセンス化因子のユビキチン分解機構の詳細に関して、分解のタイミングを含めた時間的・空間的な制御や個々の相互作用が未だに明らかにされていないために、その全容が明らかにされていない。また、DNA 複製ライセンス化機構の破綻は、DNA の再複製を引き起こし、染色体数の増加を介して遺伝子不安定性が誘導され、癌化へつながることが予想される。

方法および結果

細胞周期における DNA 複製に関わる因子の発現動態の詳細を解析し、細胞静止期である G₀ 期では、CDT1 のタンパク量が減少し、G₀ から G₁ 期に移行する際にタンパク量が増加することを見出した (図 3)。

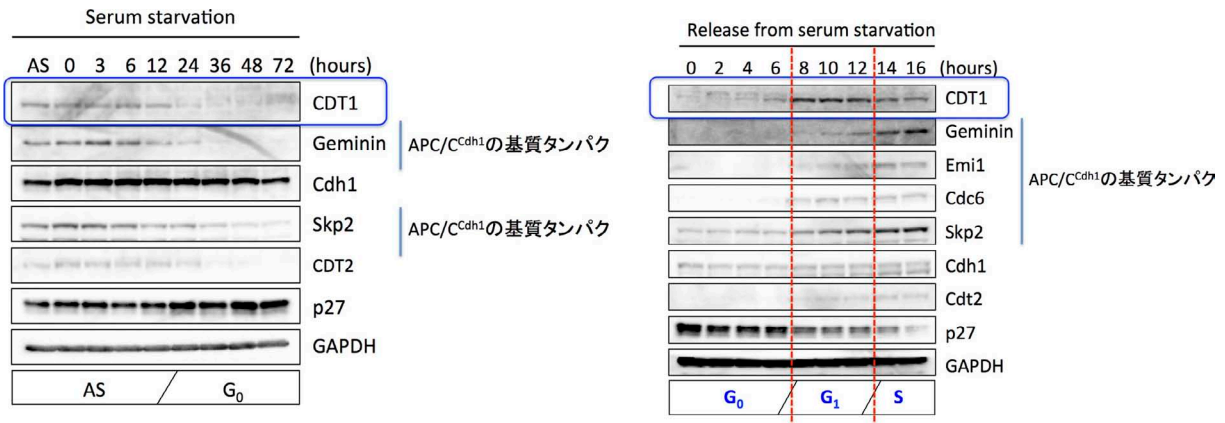


図3. G₀期における CDT1 の発現

T98G 細胞を 72 時間、血清飢餓させ、G₀ 期へ進行させた際の CDT1、Geminin の発現を検討したところ、G₀ 期に CDT1 の発現低下が認められた。また、72 時間、血清飢餓させた T98G 細胞に血清を添加し、G₀ 期から G₁ 期へ移行させたところ、G₁ 期に発現が増加した。

G₀ 期における CDT1 タンパク質の発現低下は、プロテアソーム阻害剤である MG132 の投与により増加したことから、ユビキチン分解により発現が低下することが明らかとなった (図4)。

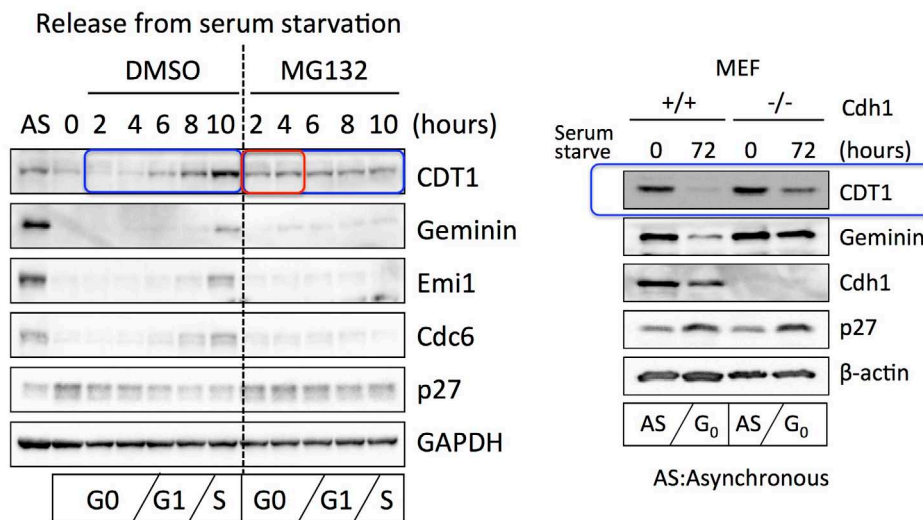


図4. G₀期における CDT1 のユビキチン分解

T98G 細胞を 72 時間、血清飢餓により G₀ 期に同調させ、血清を添加し、G₀ 期から G₁ 期へ移行させる際に、プロテアソーム阻害剤である MG132 を投与したところ、G₀ 期で発現低下する CDT1 の発現が MG132 の投与により増加した。さらに、*Cdh1* ノックアウトマウスから採取した胎児線維芽細胞に 72 時間、血清飢餓させ、G₀ 期に同調させたところ、CDT1 の発現低下が抑制されていた。

さらに、G₀ 期に APC/C^{Cdh1} ユビキチンリガーゼ複合体の活性があることが知られていることから、*Cdh1* ノックアウトマウスから採取した胎児線維芽細胞を用いて G₀ 期における CDT1 の発現を検討したところ、G₀ 期において、CDT1 の分解が認められなかった (図4)。すなわち、G₀ 期における CDT1 タンパク質の発現低下は、APC/C^{Cdh1} によるユビキチン分解により引き起こされることが明らかになった。G₁ 期においても APC/C^{Cdh1} の活性があることが知られていることから、G₁ 期における CDT1 のタンパク質量の増加は、APC/C^{Cdh1} によるユビキチン分解の抑制によると考

えられた。そこで、G1 期における CDT1 のユビキチン分解阻害に分解を阻害するリン酸化を含めたタンパク修飾が関与すると考え、種々の阻害剤を用いて、CDT1 のタンパク発現への影響を検討したところ、Cyclin-dependent kinase (Cdk) 阻害剤である roscovitine の投与により、G1 期における CDT1 タンパクの発現量の増加がみられなかったことから、Cyclin/Cdk による CDT1 のリン酸化が APC/C^{dh1} によるユビキチン分解を阻害することが明らかとなった (図 5)。

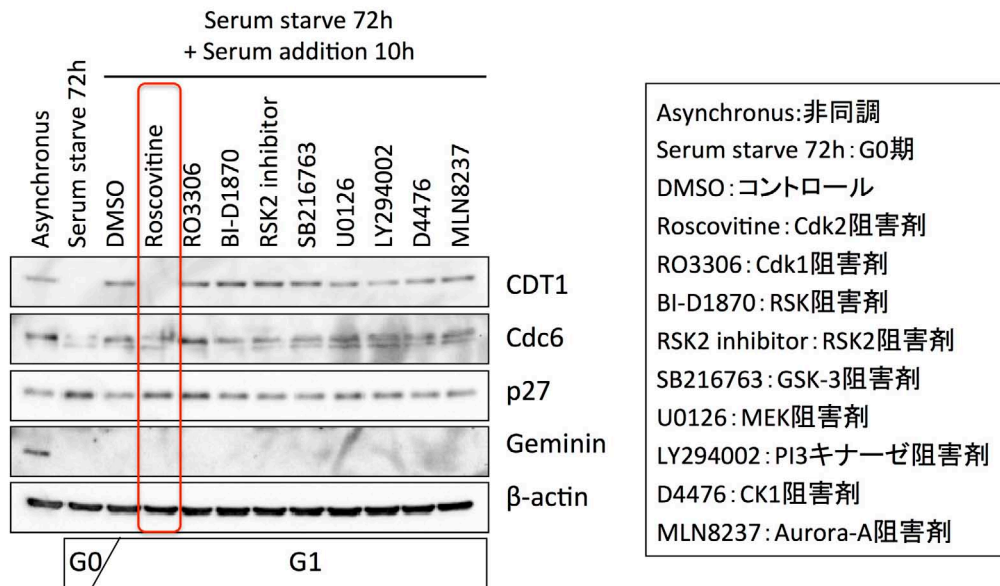


図 5. G1 期における各種阻害剤による CDT1 タンパクの安定性阻害

T98G 細胞を 72 時間、血清飢餓により G0 期に同調させ、血清を 10 時間添加し、G1 期へ移行させる際に、種々のリン酸化阻害剤を投与したところ、Cyclin-dependent kinase (Cdk) 阻害剤である roscovitine の投与により、G1 期における CDT1 タンパクの発現量の増加がみられなかった。

G0 期から G1 期に活性がある Cyclin/Cdk として、Cyclin C/Cdk3 や Cyclin E/Cdk2、Cyclin D/Cdk4 が知られている。Roscovitine は、Cdk4 に対する阻害効果が低いことが知られていることから、Cyclin C あるいは Cyclin E と CDT1 の結合を検討したところ、G1 期初期において、Cyclin C および Cyclin E とともに CDT1 との結合が認められた。これは、CDT1 の G1 期におけるリン酸化に Cyclin C/Cdk3 あるいは Cyclin E/Cdk2 が関与することが示唆された。

考 察

本研究では、CDT1 タンパクが G0 期において、APC/C^{dh1} によるユビキチン分解され、G1 期へ移行する際に Cyclin C/Cdk3 あるいは Cyclin E/Cdk2 によりリン酸化されることにより、APC/C^{dh1} によるユビキチン分解から免れ、安定化し、タンパク量が増加することにより、DNA 複製準備のための複合前複合体が形成されることが明らかとなった。もっとも研究が進んでいる造血幹細胞は細胞周期が長く、とくに分化前の細胞静止期である G0 期にニッチで長期間過ごした後、前駆細胞や成熟細胞に変化していくことが知られている。がん幹細胞においても G0 期に長く過ごした後、分化・増殖し、再発するのではないかと考えられている。しかしながら、G0 期の制御機構は未だその詳細はよくわかっておらず、CDT1 のユビキチン分解制御による pre-RC 形成制御が G0/G1 期の移行にどのような役割を果たしているかの詳細を調べることは興味深い。細胞周期の進行をリアルタイムに観察できる蛍光プローブとして広く知られている Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) では、CDT1 が G1 期において発現が高く、S/G2/M 期に発現が低いことから、CDT1 の分解に関わる領域、アミノ酸 30 番から 120 番までを、蛍光タンパク質と融合して、G1 期の細胞の蛍光プローブとして用いられている。我々は、Fucci を導入した細胞が、G0 期において CDT1 の発現を示すことから、アミノ酸 30 番から 120 番以外の部位に APC/C^{dh1} による分解ドメインが存在すると考えている。さら

に、その分解ドメイン近傍に Cyclin /Cdk によるリン酸化部位があると推測している。CDT1 には、Cyclin/Cdk によりリン酸化予測部位 (TP あるいは SP) が 17 箇所あり、そのうちアミノ酸 30 番から 120 番以外では 13 箇所存在する。今後は、質量分析を用いたリン酸化部位の特定を行い、リン酸化による分解抑制機構を明らかにしたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、徳島大学大学院医歯薬学研究部の常松貴明、石丸直澄である、本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただいた上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Dutta A, Bell SP. Initiation of DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1997;13:293-332. Review. PubMed PMID: 9442876.
- 2) Wohlschlegel JA, Dwyer BT, Dhar SK, Cvetic C, Walter JC, Dutta A. Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science.* 2000 Dec 22;290(5500):2309-12. PubMed PMID: 11125146.
- 3) McGarry TJ, Kirschner MW. Geminin, an inhibitor of DNA replication, is degraded during mitosis. *Cell.* 1998 Jun 12;93(6):1043-53. PubMed PMID: 9635433.
- 4) Tsunematsu T, Arakaki R, Yamada A, Ishimaru N, Kudo Y. The Non-Canonical Role of Aurora-A in DNA Replication. *Front Oncol.* 2015 Aug 25;5:187. doi:10.3389/fonc.2015.00187. eCollection 2015. Review. PubMed PMID: 26380219; PubMed Central PMCID: PMC4548192.
- 5) Tsunematsu T, Takihara Y, Ishimaru N, Pagano M, Takata T, Kudo Y. Aurora-A controls pre-replicative complex assembly and DNA replication by stabilizing geminin in mitosis. *Nat Commun.* 2013;4:1885. doi: 10.1038/ncomms2859. PubMed PMID: 23695679; PubMed Central PMCID: PMC3675325.