



チェックポイントタンパク質 Rad9 はリン酸化により DNA 損傷クロマチンから解離する

要旨

私達の細胞のゲノム DNA は放射線等により常に損傷の危険に曝されている。細胞は DNA 損傷を速やかに検出すると共に修復するが、検出・修復の二つの作業が DNA 損傷上でどの様に連携されているかは全く分かっていない。私達は、DNA 損傷の検出機構であるチェックポイント機構に注目し、鍵となる因子、Rad9 タンパク質のリン酸化修飾による制御機構を解析して来た。その過程で、Rad9 の活性がオン (DNA 損傷への結合) になると自動的にオフ (DNA 損傷からの解離) の回路が発動するフィードバック機構が起こる事を見出した^{1,2)}。このフィードバック制御は Rad9 タンパク質自身が受ける段階的なリン酸化により担われており、チェックポイントの発動と同時に修復機構への切り換えを促進するために必要であると考えている。このフィードバック機構は、DNA 損傷の上で検出・修復といった異なる機能を持つ複数のタンパク質複合体がスムーズに入れ替わるための制御機構であると考えている。

はじめに

さて、本稿で述べさせて頂く DNA 損傷部位上での検出機構 (チェックポイントタンパク質複合体) と修復機構 (本研究では二重 DNA 切断の修復タンパク質複合体) の機能連携とはどのようなものであるだろうか。私達は最も重要な機能連携は検出機構と修復機構の際の複合体の“切り換え”と考えている。異なる機能を持つ両複合体は、機能の遂行のために DNA 損傷部位へ直接結合する必要がある。しかしながら、一方の複合体が結合したままだと機能を果たす事が出来ないと予想出来る³⁾。本稿では、リン酸化によるフィードバック機構により、両機構の切り換えがなされて

いるというモデルをたてさせて頂いた。DNA 損傷検出機構は、細胞内に DNA 損傷シグナルを伝えると同時に損傷部位から解離する。この解離により次の修復機構がアクセス可能となる。著者は、リン酸化フィードバック制御は機能の完遂と次の機能への受け渡しを共役する事で検出機構から修復機構への切り換えをスムーズに行い、それがゲノム情報の安定維持に貢献している、と考えている。そこでまずは DNA チェックポイント機構の簡単な定義から分子制御までを紹介し、最後に私達の最近の結果を述べさせて頂きたい。

DNA チェックポイント機構とは？

細胞は、DNA 複製を経た後に姉妹染色分体を娘細胞へと均等に分配、そして細胞分裂を行う事で増殖する。この DNA 複製・細胞分裂のサイクルを、細胞周期と呼ぶ。DNA 損傷ストレスを受けた細胞は、細胞周期の特定の時期でその進行を一旦停止し、障害が回復するのを待つ (図 1)。この停止時期を細胞周期のチェックポイントと呼び、停止システム全体を DNA チェックポイント機構と呼ぶ。DNA チェックポイント機構に欠損をきたすと、複製や修復が完了しないまま分裂期に入るので、不均等分配や遺伝情報の欠失が起こる。従ってチェックポイント機構の異常は、ゲノム不安定性の原因となる。高等生物においては、この機構の欠損は発がんを引き起こすだけではなく、幾つかのヒトの遺伝病の原因遺伝子がチェックポイント機構に含まれる事が分かっており、発生異常や老化を引き起こす事が報告されている⁴⁾。

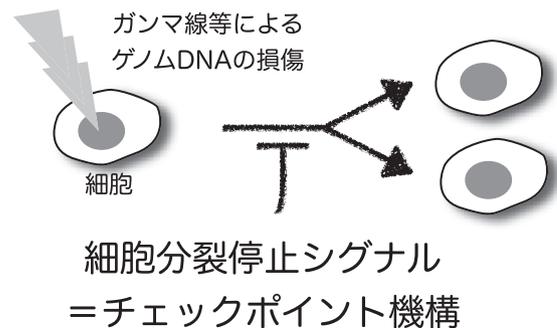


図 1 ガンマ線等によるゲノム DNA の損傷を受けた細胞はチェックポイント機構を活性化させ、細胞分裂を一旦停止する。DNA 損傷の修復が起これないまま分裂が開始 (=染色体分配) する事を未然に防ぐ。

DNA チェックポイント機構は未修復の DNA 損傷を検出する機構である

すなわち、このチェックポイント機構は染色体 DNA 上の“乱れ”を検出する機構であると言う事ができる。染色体上の“乱れ”としてチェックポイント機構に認識される DNA 構造は、DNA 複製中のトラブルによるものと DNA 複製中以外に直される損傷の二つに分けられる。これら二つの“乱れ”を検出する機構は異なり、前者の異常を検出する機構を DNA 複製チェックポイントと呼び、後者の異常を検出する機構を DNA 損傷チェックポイントと呼ぶ。本稿では DNA 損傷チェックポイントについて重点的に記述するが、大部分は因子を共有しているため、特に必要の無い限り DNA チェックポイントと本稿では総称する。

DNA チェックポイント機構は単鎖 DNA を検出する

DNA チェックポイント機構は、複数のタンパク質複合体からなるリン酸化を介したシグナル経路であり、コアとなる DNA チェックポイントタンパク質のほとんどが酵母からヒトまで、種を越えて保存されている (表 1, 図 2)。中でも、センサー複合体と呼ばれる二つの複合体は DNA

表 1 チェックポイント遺伝子は主に酵母のチェックポイント停止が起こらない変異株の遺伝解析により同定された。上記のコアのチェックポイント因子は高等生物にも保存されており、一部の遺伝子欠損はヒトの遺伝病の原因遺伝子としても同定されている。A-T:がんの多発・進行性中枢神経変性, Seckel:小頭症のひとつ。

Fission Yeast Orthologues	Vertebrate Orthologues	Gene Products	KO Mice -/-	Human Genetic Disorders
Tel1	ATM	PI3-like kinase	viable	A-T
Rad3	ATR	PI3-like kinase	lethal	Seckel
Rad26	ATRIP			
Chk1	Chk1	kinase	lethal	
Cds1	Chk2	FHA-domain kinase	viable	
Rad9	Rad9	PCNA-like; 9-1-1 complex	lethal	
Rad1	Rad1	PCNA-like; 9-1-1 complex	lethal	
Hus1	Hus1	PCNA-like; 9-1-1 complex	lethal	
Rad17	Rad17	RFC-like	lethal	
Mrc1	Claspin			
Crb2	53BP1	Tudor, BRCT	viable	

損傷に直接結合し、検出する重要な役割を果たす。DNA チェックポイント機構のセンサー複合体が検出するのは単鎖 DNA である事が、近年の分子生物学的解析から分かってきた⁵⁾。DNA チェックポイント機構が単鎖 DNA を指標に DNA 損傷を検出するという事実は、DNA 損傷の修復機構の様式を考えると、非常に効果的である事が分かる。

私達の細胞のゲノム DNA は、様々な形の損傷を受ける。紫外線はピリミジン・ダイマーを、放射線などは直接、あるいは間接的に DNA 鎖の切断を引き起こす。切断が二重鎖 DNA の両方の鎖に起こると致命的であり、相同組み換え機構でもって元の通りにつなぎ合わせる必要がある。これらの様々な DNA 損傷は、異なる酵素群によって異なる過程を経て修復される。しかしながら、あらゆる DNA 損傷の修復過程に共通して出現する構造体があり、興味深い事にそれは単鎖 DNA なのである。

DNA チェックポイントは単鎖 DNA 上に結合する RPA を標的とする

細胞内の二本鎖 DNA 切断は、すぐにヌクレアーゼ等によりプロセス (resection) され、単鎖 DNA となる。すると、単鎖 DNA は単鎖 DNA 結合タンパク質 (RPA) によって直ちに覆われる。この RPA は三つのサブユニットからなる複合体であり、大サブユニットである RPA1 タンパク質のアミノ末端部分には塩基性の“裂け目”構造がある。それを標的としてチェックポイント機構のセンサータンパク質、Rad9 と ATRIP タンパク質がリクルートされ、DNA 損傷として検出する。これらの RPA タンパク質の検出に働くチェックポイントタンパク質側のモチーフも同定されており (図 3)、Rad9 と ATRIP タンパク質はそれぞれ酸性アミノ酸に富んだモチーフを有している⁶⁾。

しかしながら RPA1 を標的とするタンパク質は、チェックポイント機構のタンパク質だけではない。Rad52 タンパク質などの相同組み換え修復と呼ばれる修復機構に関わるタンパク質なども RPA1 タンパク質のアミノ末端を標的としている事が知られており、同様の酸性アミノ酸の並んだモチーフを有している事が分かっている。従って、チェックポイント、DNA 損傷修復に関わるこれらのタンパク質が RPA タンパク質上でうまく機能するための協調機構がある事が提唱されていた³⁾。

Rad9 はリン酸化タンパク質である

私達は、センサータンパク質である Rad9 が最も重要な制御を受けるタンパク質であると考えていた。その理

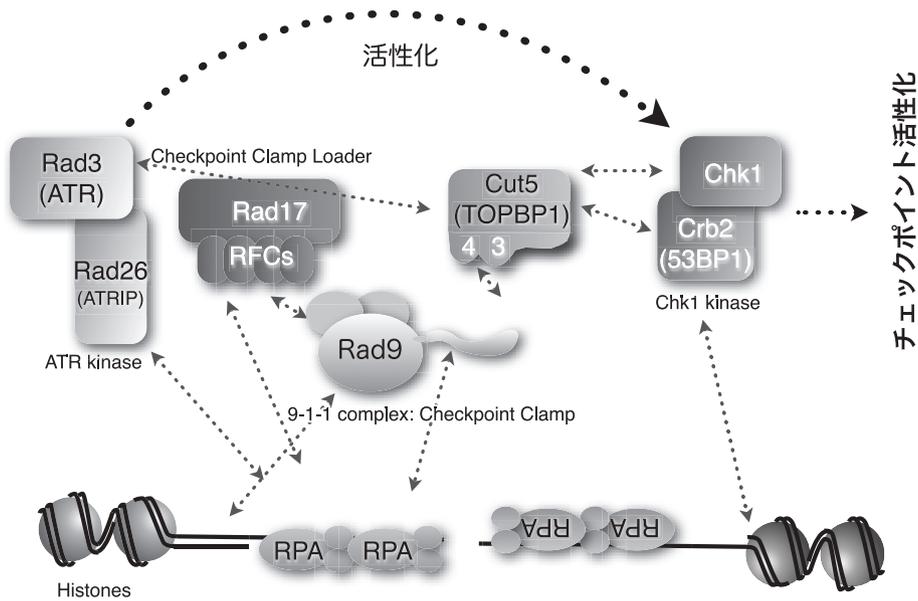


図2 チェックポイントタンパク質のネットワーク。様々なタンパク質間相互作用によりチェックポイント機構の活性化が引き起こされるが、最も重要なのは単鎖DNA結合タンパク質（RPA）との結合を担うATRIPとRad9タンパク質である。Rad9タンパク質はアミノ末端側がPCNA様の環状構造を持つヘテロ三量体を構築し、二重鎖DNAに抱きかかえるような形で結合する。また、Crb2タンパク質はヒストンのH2Aのリン酸化、H4のメチル化を認識して損傷部位へと結合する事も知られている。

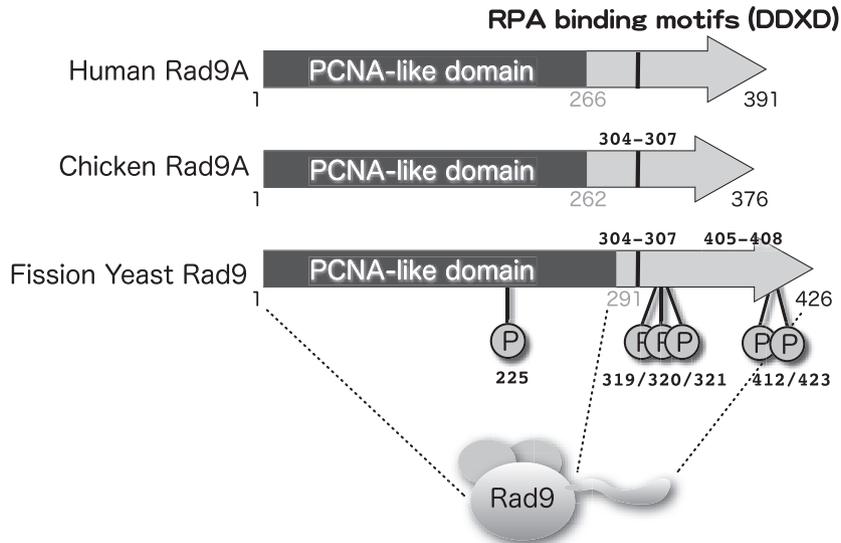


図3 Rad9タンパク質の一次構造。Rad9タンパク質はアミノ末端側がPCNA様の環状構造を持つヘテロ三量体を構築し、二重鎖DNAに抱きかかえるような形で結合する。またカルボキシル末端側は制御モチーフと思われる、リン酸化部位やRPA結合モチーフ等が見られる。私達が分裂酵母で同定したリン酸化部位を提示してある。

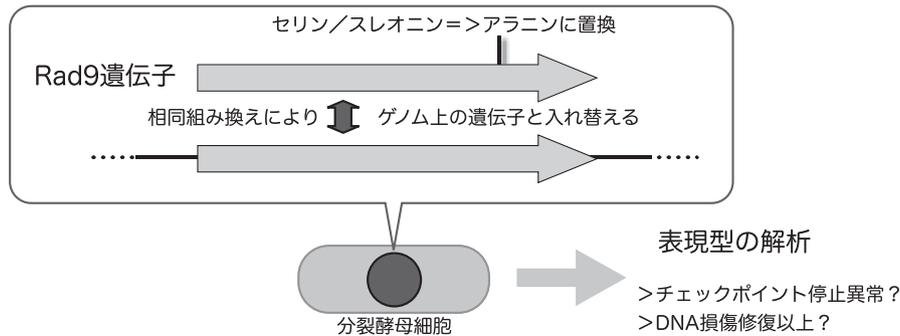


図4 リン酸化の機能の同定分裂酵母は遺伝学が容易である。簡単にゲノム上の遺伝子に変異を導入可能であり、変異遺伝子の細胞増殖、DNA 損傷応答への効果を観察する事が出来る。

由は、Rad9 タンパク質の特徴的な構造である。Rad9 は、アミノ末端が PCNA 様構造を持ち DNA に非常に強く結合する事が予想されていた他、C 末端がフレキシブルな尻尾様の構造を取る。また、私達は分裂酵母をモデルとして扱う事で、Rad9 の C 末端が制御ドメインであり、リン酸化を受ける事を示して来た¹⁾(図3)。ただ、その一方でリン酸化修飾は、その一カ所だけでなく、Rad9 タンパク質上の他の部位にも起こる事にも私達は気づいていた。

リン酸化は負電荷を帯する事から、リン酸化修飾を受けたタンパク質は構造変化を伴う事がある。また、リン酸化されたタンパク質はある種のタンパク質との結合能を獲得する場合もある。従ってそれぞれのリン酸化修飾は Rad9 タンパク質に異なる機能変化をもたらすと考えられる。また、私達は研究の初期段階から、Rad9 タンパク質は最大限にリン酸化を受けると損傷した染色体 DNA 上から消失する事に気付いていた。それが、これら全てのリン酸化修飾の分子意義を見出そうと考えた理由である。

Rad9 タンパク質は段階的なリン酸化による制御を受ける

まず、Rad9 タンパク質に網羅的に変異部位を導入し、細胞内で発現させ、解析する事でリン酸化部位、そしてその機能を同定した(図4)。一連の解析から、先の研究で同定した T412, S423, T225 に加え、S319, S320 および T321 がリン酸化部位である事を突き止めた。分裂酵母は遺伝学の行きやすい生物である。Rad9 に作用する種々の変異株を用いる事で、リン酸化が三段階の制御を受ける事を見出した。

Rad9 タンパク質の最初の二段階のリン酸化では、ATR あるいは ATM といったチェックポイント機構での中心的キナーゼが Rad9 をリン酸化していた。先ず C 末端の

Thr412 がリン酸化を受ける事で Cut5 タンパク質と結合する事が可能となり、チェックポイントシグナルを下流因子へと伝える。従って Thr412 がリン酸化を受けないと DNA 損傷チェックポイント経路は活性化しない。ちなみにこの相互作用はヒトでも報告されているが、リン酸化を担う酵素は異なることが分かっている⁷⁾。さらに DNA 損傷部位に結合した Rad9 の Thr225 を ATR キナーゼが標的とし、リン酸化する。この Thr225 のリン酸化の意義は今のところは分かっておらず、今後の課題である。

Rad9 の最終ステップのリン酸化は DDK に依る

最後のステップのリン酸化 (Ser319, Ser320, Thr321) は、DDK (Dbf4-dependent kinase) と呼ばれるキナーゼにより担われていた(図5)。DDK は染色体 DNA 上の様々なタンパク質を標的としてリン酸化するキナーゼである。

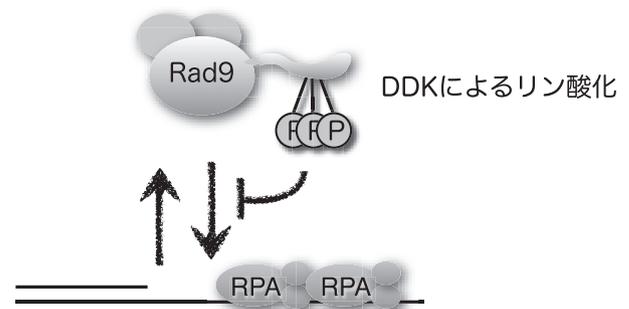


図5 DDKによるリン酸化の意義。Rad9 タンパク質は三段階のリン酸化を受ける。最終段階のリン酸化は驚いた事に DNA 複製に関与するキナーゼであった。DDK にリン酸化を受けた Rad9 は DNA 損傷部位から排除されていると考えており、おそらく RPA との結合が弱くなるからではないかと予想している。

有名な基質としてはDNA複製装置のヘリカーゼであるMCMがあり、リン酸化によりその機能を促進する。チェックポイントタンパク質をリン酸化する知見も得られているがその機能的な意義は未解明な部分が多い。

前述の様に、最終段階までリン酸化されたRad9は染色体DNA上から排除されていた。そこで、私達はDDKに依るリン酸化がRad9をDNA損傷から外すのを促進する、というモデルを立てた。その分子機構としてRPAとの相互作用を弱めるのではないかと、この仮説を立てた。Rad9上のRPA結合領域(304-307)は、DDKによるリン酸化部位(319-321)の近傍にある。実際にDDKを大量発現するとRad9の最終リン酸化を誘導出来るが、それと同時にRPAとの結合も抑える事が出来た。また、私達は試験管内でRad9のカルボキシル末端とRPAとの結合を検出する系を持っていた。DDKによるリン酸化部位(319-321)を、リン酸化を模擬する酸性アミノ酸(アスパラギン酸)へと置換するとRPAとの結合が弱くなる事も見出した。一連の結果は、Rad9とRPAとの結合をDDKに依るリン酸化が弱めるという事をサポートしている。

Rad9の最終ステップのリン酸化はDNA損傷修復の完了に必要である

それではRad9のリン酸化が最後まで起こらないと、細胞にはどのような問題が生じるのであろうか？リン酸化されないアミノ酸置換変異を導入した細胞の挙動を観察する事でその手がかりが得られた。一般にチェックポイント機構に欠損があると細胞はDNA損傷を受けても細胞周期の進行を停止する事が出来ない。従って染色体DNAが未修復のまま分裂期に入り、染色体分配がうまく起こらない。また、野生型よりも低度のDNA損傷に曝されただけで致死となる。Rad9の遺伝子破壊株や、Rad9の第一段階のリン酸化が起こらなくなった変異株ではこれらの“チェックポイント欠損”の表現型が見られる。

最終段階のDDKに依るリン酸化が起こらないRad9のみを発現する細胞は、他の変異株と同じ様に低度のDNA損傷下で生育出来なくなっていた。しかしながら、細胞周期の進行を停止する能力は保持していた。そのかわり、DNA損傷の修復が滞っている事が細胞生物学的に検出できた他、修復が最後まで完了しないままの事がパルスフィールド電気泳動法などを用いる事で明らかとなった。これらの表現型は非常に興味深く、私達は、Rad9タンパク質は最後までリン酸化されないと損傷DNA上に一旦結合すると離れなくなるのでは、とのモデルを提唱し、ま

た、Rad9が離れない事で次にRPAにリクルートされるはずのRad52などのタンパク質がうまく機能しないのではと考えた。

Rad9の段階的リン酸化はフィードバック制御の一環である

興味深いのは、DDKに依るリン酸化は段階的に起こる点である。Rad9複合体が一旦DNA損傷へ結合し、チェックポイント機構を活性化しない限り、DDKはRad9をリン酸化しない。例えば、Rad9をDNA損傷へとロードするRad17複合体(クランプ・ローダーとも呼ばれる)の遺伝子破壊株や、DNA損傷チェックポイント経路の最下流に位置するChk1の遺伝子破壊株では、DNA損傷を引き起こすカンプトテシンで細胞を処理しても、DDK依存的なRad9のリン酸化は起こらなかった。おそらく、DDKに依るリン酸化はフィードバック制御の一環であり、Rad9複合体が未修復のDNA損傷を検出し、チェックポイント経路を活性化して始めて発動すると考えられる。もちろんDNA損傷を検出する前にRad9がDNA損傷への結合能力を失っては機能出来ない。そこでフィードバック制御という仕組みを作り上げる事で、DNA損傷を検出し、細胞が認識した後にRad9がDNA損傷部位から外れて行くのを保証しているのだろう。また、一連のリン酸化が速やかに進む事で、DNA損傷の検出から修復へと円滑にシフトしていると考えられる。

Rad9のDDKによるリン酸化が起こらない際の影響は、細胞外からDNA損傷を受けない細胞においても見られている。一般にチェックポイント遺伝子は必須遺伝子ではない。Rad9遺伝子も通常の生育には必須ではなく、DNA損傷を人工的に与えない限りは野生型細胞と同じ様に生育する。しかしながら、リン酸化されない変異Rad9を発現する細胞は、生育が著しく遅い事が分かった(古谷、未発表)。おそらくDNA損傷様の構造体は通常の生育時にも出現するのであろう。実際、染色体DNAの複製の際には二本鎖DNAの解裂を行うため、RPAタンパク質が露出する単鎖DNAを保護する他、染色体末端(テロメア)等も二本鎖DNA切断部位とよく似たDNA構造を取る。私達が提唱するフィードバック制御は、複製中のDNAやテロメア領域などの潜在的なDNA損傷様の構造体をRad9複合体が誤って検出した際に取り除く役割も担っているのかもしれない。

今後の展望

Rad9 のリン酸化フィードバック制御の分子構造基盤を解明することは今後の課題である。段階的なリン酸化を保証する分子構造基盤だけでなく、Rad9 のフィードバック制御は単一タンパク質内でおこる異なる部位のリン酸化により引き起こされている珍しい例である。個々のリン酸化がどの様に Rad9 の分子構造に作用するのか、また、その作用がどういう仕組みで DNA 損傷への脱着を制御しうるのかを理解することは重要である。これらの知見は他の分子生物学分野にも応用可能である。転写、翻訳など、核酸・タンパク質の相互作用が基盤となる経路では複数の複合体が順次作用する事で一つの高次な生命現象の実現を可能としている。Rad9 で見られる制御基盤と共通する部分は多いと予想しており、本研究の成果から普遍的な分子基盤が見出せると信じている。

Rad9 タンパク質だけがチェックポイント機構のフィードバック制御を担っている訳ではないと私達は考えている。前述したように (図2), DNA チェックポイント機構には Rad9 以外にも RPA と結合するセンサー・複合体, ATRIP-ATR がある。そのサブユニットである ATRIP タンパク質にも, Rad9 で見られるような RPA 結合モチーフが存在する。また, 興味深い事に ATRIP も DDK により段階的なリン酸化を受ける事を私達は見出している (古谷, 未発表)。ATRIP の段階的なリン酸化もフィードバック制御である可能性が高く, それぞれのチェックポイントタンパク質が持つフィードバック制御が協調して起こる事で, チェックポイントシグナルは厳密にオン・オフの制御を行っているのかも知れない。

終わりに

本研究は分裂酵母のタンパク質を用いた解析から私達が見出した知見である。分裂酵母は遺伝学の非常に容易なモデル生物である。様々なリン酸化部位置換変異遺伝子を構築し, それらを逐次, ゲノム上の野生型遺伝子と入れ替える事で解析が可能である。また, 培養が簡単であり, チェックポイント活性化だけでなく, DNA 損傷修復などの微妙な DNA 損傷応答活性の差も検出可能である。確かに高等生物にしかないチェックポイント因子は存在し, 私達もヒト遺伝子・培養細胞を用いた解析に着手している。その一方で少ない制御因子で成り立つ分裂酵母のチェックポイント制御は, 比較的詳しい部分まで分かっており, 普遍的な分子構造基盤を明らかにするには強力なモデルシ

ステムと言えると考えている。

- 1) Furuya, K., Poitelea, M., Guo, L., Caspari, T., & Carr, A.M. (2004) *Genes Dev.*, **18**, 1154-1164.
- 2) Furuya, K., Miyabe, I., Tsutsui, Y., Paderi, F., Kakusho, N., Masai, H., Niki, H., & Carr, A.M. (2010) *Molecular Cell*, **40**, 606-618.
Kai, M., Furuya, K., Paderi, F., Carr, A.M., & Wang, T.S. (2007) *Nat. Cell Biol.*, **9**, 691-697.
- 3) Bochkareva, E., Kaustov, L., Ayed, A., Yi, G.S., Lu, Y., Pineda-Lucena, A., Liao, J.C., Okorokov, A.L., Milner, J., & Arrowsmith, C.H., et al. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15412-15417.
- 4) O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A., & Goodship, J.A. (2003) *Nature Genetics*, **33**, 497-501.
- 5) Zou, L. & Elledge, S.J. (2003) *Science*, **300**, 1542-1548.
- 6) Xu, X., Vaithiyalingam, S., Glick, G.G., Mordes, D.A., Chazin, W.J., & Cortez, D. (2008) *Mol. Cell Biol.*, **28**, 7345-7353.
- 7) Takeishi, Y., Ohashi, E., Ogawa, K., Masai, H., Obuse, C., & Tsurimoto, T. (2010) *Genes Cells*, **15**, 761-771.

古谷 寛治

(京都大学放射線生物研究センター
突然変異機構研究部門 細胞周期応答研究分野)

Phosphorylated Rad9 is released from damaged chromatin
Kanji Furuya (Division of Cell Cycle Response, Department of Mutagenesis, Radiation Biology Center, Kyoto University, Yoshida-Konoe-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

分子シャペロン HSP90 による複製ストレス応答機構の制御

1. はじめに

多細胞生物のゲノムは, 紫外線, 化学物質などの外的要因や, 細胞内代謝に伴う活性酸素, 副産物などの内的要因により, 常に損傷を受けている¹⁾。これらの損傷は複製 DNA ポリメラーゼによるゲノム複製の阻害, すなわち「複製ストレス」を引き起こす。細胞は複製ストレスに応答して, 様々な生化学経路を介して, 損傷の除去や複製の再開をおこなう。しかし, この応答機構がうまく働かないと, ゲノムに損傷や変異が蓄積し, 細胞死, 細胞老化, 細胞のがん化が誘導される。また, 複製ストレス応答機構は, がん細胞の抗がん剤耐性や悪性化にも関与することが強く示唆されている¹⁾。このような重要性にもかかわらず, 複製ストレス応答の分子機構は未だ不明な点が多く, 様々な生