

- velopment, 16(7), 784-789.
- 10) Jiang, J., Chan, Y.S., Loh, Y.H., Cai, J., Tong, G.Q., Lim, C. A., Robson, P., Zhong, S., & Ng, H.H. (2008) *Nature Cell Biology*, 10(3), 353-360.
 - 11) Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., Yagi, K., Miyazaki, J., Matoba, R., Ko, M.S., & Niwa, H. (2006) *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), 7772-7782.
 - 12) Ema, M., Mori, D., Niwa, H., Hasegawa, Y., Yamanaka, Y., Hitoshi, S., Mimura, J., Kawabe, Y., Hosoya, T., Morita, M., Shimosato, D., Uchida, K., Suzuki, N., Yanagisawa, J., Sogawa, K., Rossant, J., Yamamoto, M., Takahashi, S., & Fujii-Kuriyama, Y. (2008) *Cell Stem Cell*, 3(5), 555-567.
 - 13) Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., & Yamanaka, S. (2003) *Cell*, 113(5), 631-642.
 - 14) Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003) *Cell*, 113(5), 643-655.
 - 15) Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K.Y., Sung, K.W., Lee, C.W., Zhao, X.D., Chiu, K.P., Lipovich, L., Kuznetsov, V.A., Robson, P., Stanton, L.W., Wei, C.L., Ruan, Y., Lim, B., & Ng, H.H. (2006) *Nature Genetics*, 38(4), 431-440.
 - 16) Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., & Smith, A. (2007) *Nature*, 450(7173), 1230-1234.
 - 17) Dejosez, M., Krumenacker, J.S., Zitur, L.J., Passeri, M., Chu, L.F., Songyang, Z., Thomson, J.A., & Zwaka, T.P. (2008) *Cell*, 133(7), 1162-1174.

升井 伸治

(国立国際医療センター研究所 細胞組織再生医学研究部
形質転換ベクター開発研究室)

Transcriptional network controlling pluripotency in embryonic stem cells

Shinji Masui (Division of Molecular Biology and Cell Engineering, Department of Regenerative Medicine, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan)

Ubc13 依存的ユビキチン化によるゲノム維持機構

はじめに

染色体DNAは、酸素ラジカルや化学物質による化学修飾、放射線や複製フォークの崩壊などによるDNA鎖の切

断など、様々な損傷を受ける。生物はこれら多様なDNA損傷を常に感知し、適切に修復することで膨大なゲノム情報を維持している。例えば、細胞にγ線を照射すると、重篤なDNA損傷であるDNA二本鎖切断(DNA double strand break; DSB)が生じる。DNA DSBは、切断末端同士を単純に再結合させる非相同末端結合(non-homologous end joining; NHEJ)及び、切断されたDNAに相同な配列を持つ鎖を鋳型とした相同組換え(homologous recombination; HR)¹⁾によって修復される。相同組換えは、鋳型となる姉妹染色分体(複製によって生じた相同な配列を持つ鎖)が存在するS/G₂期で主に働くのに対し、非相同末端結合は細胞周期のG₁期で働く。また、紫外線は隣り合うチミン間で架橋されたピリミジンダイマーを形成する。これらは主にヌクレオチド除去修復(nucleotide excision repair; NER)という修復機構によって除去されるが、複製を阻害する場合は複製後修復(post-replication repair; PRR)²⁾と呼ばれる機構によってまず複製ブロックが解除される(図1A, B)。このように、細胞は損傷の種類・細胞周期などに応じてDNA修復機構を使い分けることで正確な修復を遂行している。そのため、様々なDNA損傷に対する適切な修復機構の選択・アクセスは極めて厳密な制御を受けている。近年の研究から、様々なDNA修復機構はユビキチン化により制御を受けていることが急速に明らかになってきた。特に、ユビキチン結合酵素Ubc13(E2)と共役して働く複数のユビキチンリガーゼ(E3)が相次いで同定され、それらの作用点・作用機序、機能的重複・差異の解明が活発な研究対象になっている。本稿では、脊椎動物のUbc13に焦点をあて、最近のトピックスを中心に概論する。

1. ユビキチン化による複製ブロック解除の制御

ユビキチンは、ユビキチン活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)の三つの異なる因子によって基質タンパク質に共有結合される。典型的には、基質に結合したユビキチンは、自身の48番リシン残基(K48)に次のユビキチンのC末端グリシンが共有結合することでポリマー化(K48結合型ポリユビキチン化)し、基質タンパク質をプロテアソームによる分解経路に導く。一方で、K48結合型ユビキチン化とは異なる様式のユビキチン修飾も存在し、これらは基質の機能転換や下流因子の誘導など、タンパク質分解とは異なる機能を有すると考えられている³⁾。特に、単一のユビキチンによる修飾(モノユビキチン化)や63番リシン残基(K63)を介したポ

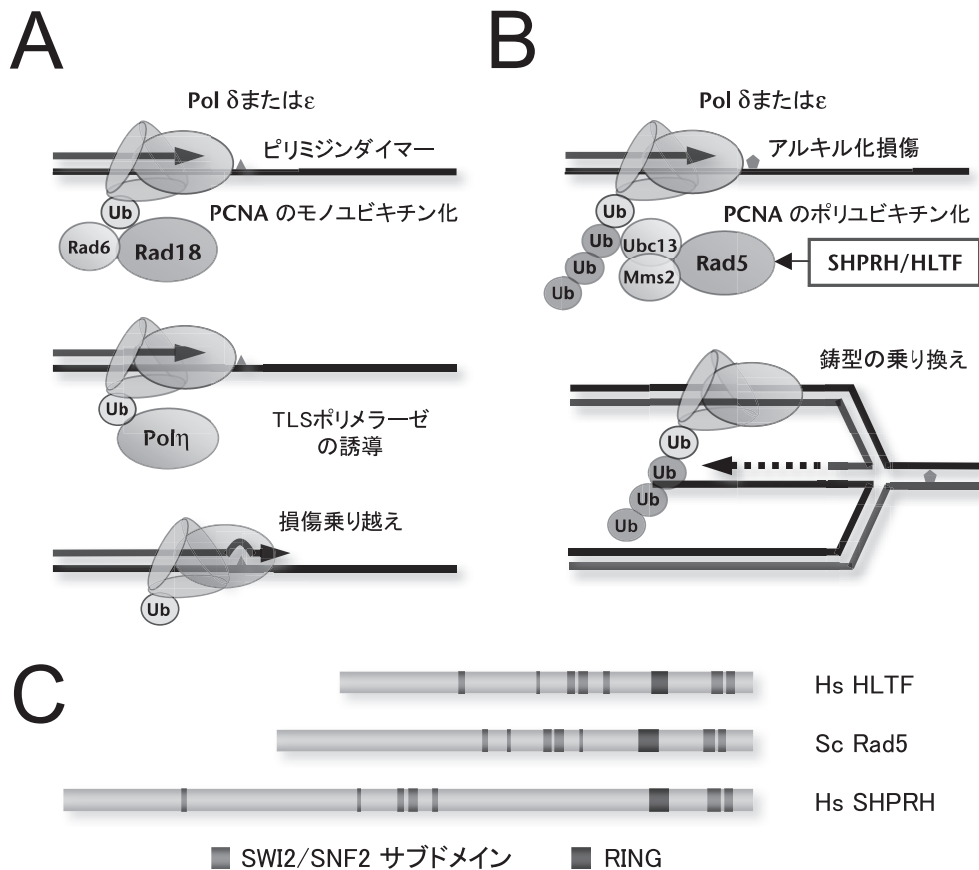


図1 ユビキチン化による複製ポリメラーゼ停止解除の制御機構 (モデル)

鋳型 DNA の損傷によって複製ポリメラーゼの進行が妨げられた場合、その損傷を残したまま複製を再開させる機構が存在し、これを複製後修復という。複製後修復は乗り越え修復 (A) および乗り換え修復 (B) に大別される。ヒト (Hs) では酵母 (Sc) Rad5 と同様のドメイン構造を持つ SHPRH/HLTF が PCNA をポリユビキチン化する (C)。

リユビキチン化が、鋳型 DNA の損傷による複製ポリメラーゼの停止を解除する際に重要な役割を果たしていることが知られている⁴⁾ (図 1A, B)。次段にその制御機構を記すが、詳細は本誌第 80 巻第 2 号 (2008) の菱田卓先生及び立石智先生の項に詳しいので、併せ参照頂きたい。

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) では、鋳型 DNA の損傷によって複製停止が起こると、ポリメラーゼに付随する複製促進因子である増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen; PCNA) の 164 番目シリン残基 (K164) が、Rad18 (E3)-Rad6 (E2) 複合体によりモノユビキチン化される。さらに、K164 に付加されたモノユビキチンは、Rad5 (E3)-Ubc13/Mms2 (E2/E2 variant) 複合体によって K63 型ポリユビキチン化を受ける。PCNA のモノユビキチン化は、ユビキチン結合ドメインを持つ特殊な DNA ポリメラーゼによる乗り越え修復 (translesion synthesis; TLS) を

誘導する。例えば、PCNA のモノユビキチン化依存的に誘導されたポリメラーゼ η や ζ は、鋳型の紫外線損傷を乗り越えて DNA 合成することによって複製停止を解除する。また、PCNA のポリユビキチン化は、新たに生成された娘鎖への乗り換え修復 (template switch; TS) を誘導すると推測されているが、詳細は全く不明である。乗り越え修復は、鋳型の損傷に対して正しい塩基を取り込めば点変異を抑制することになるが、誤った塩基を取り込むことによって複製に伴う点変異導入の主要な原因ともなっている。一方、乗り換え修復は、損傷のない姉妹染色分体の新生鎖を鋳型とするため一般に遺伝子変異を起さない (error-free) と考えられているが、修復が途中で頓挫すると、正常な相同鎖も巻き込んでしまう可能性がある。ここでは詳しくは述べないが、著者らは出芽酵母を用いた解析から、実際、乗り換え修復経路は複製に伴う自発的な染色体再編

成を抑制する主要な修復機構であることを示した⁵⁾。さらに、鋳型鎖の切断や複製フォークの崩壊などいずれの機構によっても回復できない重篤な複製の破綻は、相同組換えによって修復される。

2. ヒト SHPRH および HLTf は酵母 ユビキチンリガーゼ Rad5 の機能的ホモログである

DNA 修復機構の研究は、細胞生物学の他分野と同様に、酵母の遺伝学的解析から遺伝子を同定し、それらの高等動物ホモログを同定・機能解析を行う、という手法で進展している。前節で述べた乗り越え修復を制御する Rad6-Rad18 は、一次配列上明らかな脊椎動物ホモログが存在する。さらに、これらのホモログは、酵母と同様に PCNA をモノユビキチン化することで損傷乗り越え型ポリメラーゼを誘導することが示された⁶⁾。一方、乗り換え修復を制御する因子は Ubc13/Mms2 ホモログが存在するものの、Rad5 のホモログは永らく不明であった。また、酵母以外の種における PCNA のポリユビキチン化に関する報告もなかったことから、高等動物にも乗り換え修復様経路が存在するか否かは全くの謎であった。筆者は、乗り換え修復様経路が高等動物にも存在するという仮説を立て、“missing piece”として探索されていた Rad5 ホモログの同定を試みた。酵母 Rad5 はヘリカーゼ活性を持つ SWI2/SNF2 ドメインとユビキチンリガーゼ活性を持つ RING ドメインを併せ持つことに注目し、データベース検索によりこれと同様なドメイン構造を持つヒト遺伝子産物 SHPRH および HLTf を同定した^{7,8)}(図 1C)。そしてこれら E3 が、酵母 Rad5 と同様にヒト UBC13, RAD18, PCNA と物理的に結合すること、及び、UBC13/MMS2 との共発現により PCNA の K164 を K63 型ポリユビキチン化することを見いだした。また、RNA 干渉法によって SHPRH や HLTf の発現が抑制された細胞では、アルキル化剤である methylmethane sulfonate (MMS) による PCNA のポリユビキチン化が減弱し、MMS に対する感受性が亢進した。これらのことから SHPRH と HLTf は酵母 Rad5 の機能的ホモログであると結論した。さらに、高等動物における乗り換え修復様経路の役割を明らかにするために、PCNA のポリユビキチン化を効率よく誘導する損傷の特定を試みた。その結果、MMS のほかにポリメラーゼ阻害剤であるアフィジコリンが PCNA のポリユビキチン化を強く誘導することが分かった⁸⁾。これに対して、紫外線は主にモノユビキチン化をよく誘導した。また、DSB を引き起こす γ 線は、PCNA のポリユビキチン化を全く誘導しなかった。これら

の異なる損傷のポリユビキチン化に対する効果は、DNA 合成の抑制効果とよく相関することから、PCNA のポリユビキチン化は MMS やアフィジコリンによるポリメラーゼの進行阻害に起因するものと推測された。

3. Ubc13 依存的ユビキチン化による相同組換えの制御

酵母のホモログとして同定された動物遺伝子産物の解析が進むにつれ、それらの役割が進化の過程で大幅に変化する例が多く知られるようになった。特に DNA 修復の制御機構は、クロマチン構造の多層化に伴って、より複雑・多様化する必要があったと考えられる。この総説のトピックである Ubc13 は、酵母では複製ブロックの解除に働く Rad6 上位性群に属し、Rad1 上位性群によるヌクレオチド除去修復や Rad52 上位性群による相同組換えとは独立に機能すると考えられている。ところが、Zhao らによるニワトリ B 細胞由来の *UBC13* 欠損 DT40 細胞株の解析の結果、高等動物 Ubc13 は、複製ブロックの解除に加え、相同組換えにおいても必須な役割を持つことが明らかになった⁹⁾。図 2 に現在考えられている相同組換えによる DSB の修復過程モデルを示す。*UBC13* 欠損細胞では、一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA のリン酸化や組換え因子 Rad51 の γ 線損傷部位への集積が完全に阻害されていた。一方、損傷チェックポイントキナーゼ ATM による DSB 近傍のヒストン H2AX のリン酸化はむしろ蓄積していた。これらのことから、Ubc13 は相同組換えにおいて一本鎖 DNA 形成前後に機能すると考えられる。さらに興味深いことに、野生株では γ 線損傷部位に多量のユビキチン化がみられるのに対し、*UBC13* 欠損細胞ではユビキチン化の集積が強く抑制されていた。このことは、DSB の修復過程にユビキチン化が大きく関与すること、そしてそれらの多くは Ubc13 に直接もしくは間接的に依存していることを示唆している。Zhao らは、ユビキチン化の基質の 1 つがヒストン H2AX であることを示したが⁹⁾、H2AX 欠損細胞は *UBC13* 欠損細胞に比べ弱い表現型しか示さない¹⁰⁾ことから、H2AX 以外にも基質が存在すると考えられる。また、相同組換えにおいて Ubc13 と共役する E3 の同定が残された課題であったが、2007 年末に三つのグループからヒト ユビキチンリガーゼ RNF8 が有力候補として発表された¹¹⁻¹³⁾。

4. RNF8 は二本鎖 DNA 切断 (DSB) 修復を促進する

RNF8 は、N 末にリン酸化ペプチドに結合する FHA ドメイン、C 末に RING ドメインを持つ。2007 年末の論文

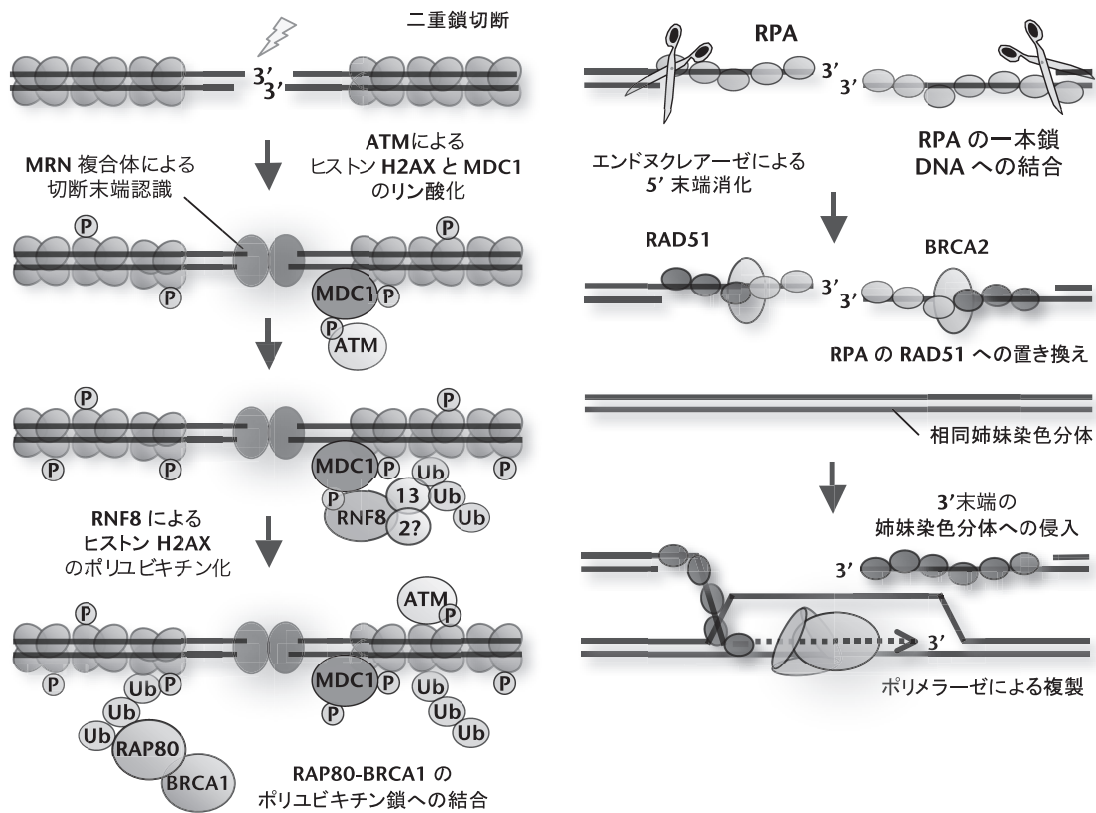


図2 UBC13によるDNA二本鎖切断修復の促進

UBC13は、RNF8と共役してヒストンH2AおよびH2AXにポリユビキチンを付加する。ポリユビキチン鎖は、ユビキチン結合ドメインを持つRAP80を介して、家族性乳がんの原因遺伝子産物BRCA1を二本鎖切断部位に誘導することで、修復を促進する。13, UBC13; 2, MMS2, P; リン酸基, Ub; ユビキチン。

から以下のことが明らかになった(図2)。① γ 線損傷部位では損傷チェックポイントタンパク質MDC1がATMによってリン酸化される。②RNF8はFHAドメインを介してリン酸化MDC1に結合することによって局所に集積する。③損傷部位に結合したRNF8はRINGドメインによってクロマチン上の基質をユビキチン化する。④このユビキチン化依存的にさらに53BP1やRAP80, BRCA1などの下流因子が局所に集積する。⑤RNF8の基質としてヒストンH2AおよびH2AXが同定されたが、これらが必須な基質の全てか否かは明らかでない。興味深いことに、RNF8は酵母two-hybrid法によってUbc13と相互作用することが報告されており¹⁴⁾、RNF8の発現抑制によってDSBへのポリユビキチン化フォーカスの形成が阻害されたことから、RNF8が直接UBC13と共役して損傷部位のポリユビキチンを形成して修復を促進している可能性が考えられる。しかし、RNF8がDSB修復においてUBC13と働く唯一のE3なのか、RNF8はどのようなDSB修復に関与するのか、

など不明な点が多い。そこで著者らは、DT40細胞を用いてRNF8欠損細胞を作製し、UBC13欠損細胞と表現型の比較を行った(未発表データ)。その結果、RNF8欠損細胞は、UBC13欠損細胞に見られる広範なDNA修復異常の一部でのみ完全に一致した表現型を示した。例えば、RNF8欠損細胞は、DNA複製依存的にDSBを形成する薬剤であるカンプトテシンに対してはUBC13欠損細胞と同程度の感受性を示すのに対して、 γ 線に対しては、UBC13欠損細胞より弱い感受性を示した。このことは、RNF8はカンプトテシンによる損傷の修復においてはUbc13と1:1の関係で共役している一方、 γ 線損傷の修復では、RNF8以外のE3もUbc13と共役していることを示唆する。興味深いことに、最近、免疫不全疾患の原因遺伝子として同定されたRIDLIN(RNF168)遺伝子産物が γ 線照射後に損傷部位に集積するユビキチンリガーゼであり、UBC13と共役することが報告された^{15,16)}。現在、RNF8との関係が解析されている。一方、著者らの発見したSHPRH/

HLTFは γ 線によって活性化されず、また相同組換えにも関与しない⁸⁾ことから、SHPRH/HLTFはRNF8とは独立した役割を持つと考えられる。今後も新たなE3や基質の同定によって、ユビキチン化によるDSB修復の制御機構がますます明らかになっていくものと期待される。

おわりに

発がん物質や放射線によって引き起こされるDNA損傷は、細胞の持つ多様な修復機構によって適切に修復される。これら修復機構に異常があるとDNA損傷が蓄積する。がんの根源的原因となる点変異や染色体転座の多くは、偶発的に生じるよりむしろ、これら蓄積したDNA損傷が“適切でない”修復機構によって不正確に修復された結果であり、その分子メカニズムが少しずつ明らかにされてきている¹⁷⁾。臨床で使われるがん治療のほとんどはDNAに損傷を与え、がん細胞をアポトーシスによって殺すことで治療効果を発揮するが、同時に二次発がんのリスクを増やす理由はここにある。従って、様々な修復機構がどのように制御され、どのように多様なDNA損傷に対処しているのかを明らかにすることは、発がんのメカニズムのみならず、がんの効率的治療を考える上で重要であろう。ユビキチンをキーワードにした研究がこれらの理解に貢献することを期待したい。

- 1) San Filippo, J., Sung, P., & Klein, H. (2008) *Annu. Rev. Biochem.*, **77**, 229–257.
- 2) Andersen, P.L., Xu, F., & Xiao, W. (2008) *Cell Res.*, **18**, 162–173.
- 3) Mukhopadhyay, D. & Riezman, H. (2007) *Science*, **315**, 201–205.
- 4) Hoege, C., Pfander, B., Moldovan, G.L., Pyrowolakis, G., & Jentsch, S. (2002) *Nature*, **419**, 135–141.
- 5) Motegi, A., Kuntz, K., Majeed, A., Smith, S., & Myung, K. (2006) *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 1424–1433.
- 6) Kannouche, P.L., Wing, J., & Lehmann, A.R. (2004) *Mol. Cell*, **14**, 491–500.
- 7) Motegi, A., Sood, R., Moinova, H., Markowitz, S.D., Liu, P.P., & Myung, K. (2006) *J. Cell Biol.*, **175**, 703–708.
- 8) Motegi, A., Liaw, H.J., Lee, K.Y., Roest, H.P., Maas, A., Wu, X., Moinova, H., Markowitz, S.D., Ding, H., Hoeijmakers, J. H., & Myung, K. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 12411–12416.
- 9) Zhao, G.Y., Sonoda, E., Barber, L.J., Oka, H., Murakawa, Y., Yamada, K., Ikura, T., Wang, X., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Boulton, S., & Takeda, S. (2007) *Mol. Cell*, **25**, 663–675.
- 10) Sonoda, E., Zhao, G.Y., Kohzaki, M., Dhar, P.K., Kikuchi, K., Redon, C., Pilch, D.R., Bonner, W.M., Nakano, A., Watanabe, M., Nakayama, T., Takeda, S., & Takami, Y. (2007) *DNA Repair (Amst.)*, **6**, 280–292.

- 11) Kolas, N.K., Chapman, J.R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F.D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T.M., Pelletier, L., Jackson, S.P., & Durocher, D. (2007) *Science*, **318**, 1637–1640.
- 12) Huen, M.S., Grant, R., Manke, I., Minn, K., Yu, X., Yaffe, M. B., & Chen, J. (2007) *Cell*, **131**, 901–914.
- 13) Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Faustrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., & Lukas, J. (2007) *Cell*, **131**, 887–900.
- 14) Plans, V., Scheper, J., Soler, M., Loukili, N., Okano, Y., & Thomson, T.M. (2006) *J. Cell. Biochem.*, **97**, 572–582.
- 15) Stewart, G.S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A.K., Kolas, N.K., Miller, E.S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M., Oldreive, C., Wildenhain, J., Tagliaferro, A., Pelletier, L., Taubenheim, N., Durandy, A., Byrd, P.J., Stankovic, T., Taylor, M.R., & Durocher, D. (2009) *Cell*, **136**, 420–434.
- 16) Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., Lukas, J., & Lukas, C. (2009) *Cell*, **136**, 435–446.
- 17) Motegi, A. & Myung, K. (2007) *Methods*, **41**, 168–176.

茂木 章

(京都大学大学院医学研究科
遺伝医学講座放射線遺伝学分野)

Maintenance of genome stability though Ubc13-dependent ubiquitination

Akira Motegi (Department of Radiation Genetics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Yoshida Konoe, Sakyo-ku, Kyoto 606–8501, Japan)

小胞体内腔における分泌タンパク質動態の制御機構

1. はじめに

小胞体は膜タンパク質および分泌系タンパク質が固有の高次構造を獲得するオルガネラであり、それらのタンパク質はシグナル配列を介して、トランスロコンを通過して小胞体内腔に運ばれる。翻訳直後の未成熟なタンパク質はN-結合型糖鎖の付加、BiPやカルネキシンなどの小胞体シャペロンによる保護、ジスルフィド結合の形成、サブユニットのアセンブリーなどを経て、機能的な高次構造を形成し、ER exit sites (ERES) を通じて小胞体から搬出されることが知られている。また、タンパク質が正しくフォールディングできなかった場合、つまりミスフォールディングした場合には、疎水性部分が分子の表面に露出するため