

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07252

研究課題名(和文) 定量的プロテオミクスによる複製フォーク安定化メカニズムの網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of mechanisms for stalled replication fork stabilization by quantitative proteomics

研究代表者

山田 正之 (Yamada, Masayuki)

京都大学・医学研究科・講師

研究者番号：40398798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Cdc7タンパク質はゲノムDNA複製を制御する重要なタンパク質リン酸化酵素(キナーゼ)であり、現在、その活性を阻害する低分子化合物が新規抗がん剤候補として期待されている。Cdc7のキナーゼ活性はASKタンパク質との結合により正に制御されているが、ASKタンパク質の安定化/不安定化の制御機構は不明である。本研究で脱ユビキチン化酵素USP7がASKの安定化(Cdc7キナーゼの活性化につながる)に寄与していることを見出した。さらに、Cdc7のキナーゼ活性の阻害によりDNA複製を安定的に進行させるために必要なタンパク質群がDNA複製装置に結合できなくなることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

数多くの国内外の研究グループによる最近の研究により、がん遺伝子の活性化やがん抑制遺伝子の不活性化による無秩序な増殖シグナルがもたらす制御を逸脱したDNA複製が複製ストレスを引き起こし、それがゲノムの不安定性につながると考えられるようになってきた。本研究は、複製ストレス下では複製フォーク近傍でどのようなことが起こっているかの一端を明らかにした。さらに、多くの抗がん剤はDNA複製を阻害する作用があることから、抗がん剤によるDNA複製阻害時に複製フォーク上で何が起こっているのかを明らかにする端緒となり、現在開発が進んでいるCdc7阻害剤を用いた新たな化学療法の開発に向けた貴重な基礎データとなる。

研究成果の概要(英文)：Cdc7 protein functions as a protein kinase which plays an important role in DNA replication. Small-molecule inhibitors of Cdc7 kinase are currently expected as novel anticancer drugs. Cdc7 kinase activity is positively regulated by binding to ASK protein. The molecular mechanism by which ASK protein is stabilized/destabilized is still unknown. In this research project, I found that a deubiquitinase USP7 stabilizes ASK protein, which leads to activation of Cdc7 kinase. In addition, I also found that Cdc7 kinase inhibition induces replication fork collapses caused by dissociation of some proteins of DNA replication machinery.

研究分野：DNA複製、DNA損傷応答、細胞周期、ゲノム安定性

キーワード：Cdc7 ユビキチン化 脱ユビキチン化 replisome 複製ストレス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞周期制御の研究はサイクリン依存性キナーゼの発見とその機能解析により急速に進み、以降、多くの細胞周期制御キナーゼが同定され、細胞周期の進行がタンパク質のリン酸化/脱リン酸化と密接に関連することが明らかになった。本研究では S 期に DNA 複製を制御する Cdc7 キナーゼと Chk1 キナーゼに着目した。

Cdc7 は酵母からヒトまで保存されたセリン/スレオニンキナーゼであり、その活性は活性制御因子である ASK/Dbf4 タンパク質(以下 ASK と略す)との結合によって正に制御されている。主に酵母を用いた研究により Cdc7 は、DNA 複製の開始に必須であることが明らかとなり、Cdc7 の機能解析は DNA 複製の開始における役割の解明に重点が置かれているのが現状である。申請者はこれまでに、以下のヒト Cdc7-ASK キナーゼの機能解析に携わってきた。

- (1) ヒト ASK 遺伝子のクローニングと機能解析
- (2) ヒト ASK 遺伝子の転写制御機構の解明
- (3) ヒト Cdc7 キナーゼによる複製チェックポイント制御機構の解明

さらに最近、ヒト Cdc7-ASK キナーゼの以下に述べる新機能に関する知見を発表した。

(1) Cdc7-ASK は hydroxyurea や cisplatin などの DNA 複製を阻害する薬剤による複製フォークの停止に応答して、クロマチンに強く結合、安定化(量的増加)する。その安定化には、ATR キナーゼと Chk1 キナーゼが中心的役割を果たす複製チェックポイント経路による APC/C<sup>Cdh1</sup> ユビキチン・プロテアソーム系の不活性化と Cdc7-ASK の自己リン酸化が必要である。

(2) ASK タンパク質は、損傷乗り越え DNA 複製 (Translesion DNA synthesis; TLS) に必須な RAD18 ユビキチンリガーゼと結合し、この結合が RAD18 のクロマチンへの結合を促進し、TLS を正に制御している。

TLS とは DNA 損傷部位で複製フォークを安定化し、その崩壊を防ぎ損傷部位を乗り越えて DNA 合成を継続するしくみであり、TLS 機能欠損細胞では DNA 損傷部位でのフォークの停止、崩壊が起こることが知られている。申請者の研究により、ATR-Chk1 経路による Cdc7-ASK の制御と Cdc7-ASK による TLS 制御という(DNA 複製開始制御ではなくフォークの維持、進行)新たな機能が明らかとなった。

申請者はこれまでの研究により、ヒト Cdc7-ASK キナーゼのタンパク質量が

- (1) 転写因子 E2F による ASK 遺伝子の転写量の増加
- (2) APC/C<sup>Cdh1</sup> ユビキチン化酵素複合体による ASK タンパク質のユビキチン化による分解促進

によって制御されていることを見出した。タンパク質の安定性はユビキチン・プロテアソーム系によるポリユビキチン化を介した分解の促進と、それに拮抗する脱ユビキチン化酵素 (deubiquitinase: DUB) による脱ユビキチン化のバランスによって制御されることが多い。ASK タンパク質のポリユビキチン化に拮抗する DUB は未同定であるが、申請者は USP7 が ASK タンパク質の安定性を制御する DUB である可能性を示唆する予備データを得た。

さらに、申請者は hydroxyurea (HU) で複製フォークを停止させた状態で Cdc7 阻害剤によって、そのキナーゼ活性を阻害すると DNA ポリメラーゼがクロマチンから脱落することを見出した。これは、Cdc7 が何らかのタンパク質をリン酸化することによって、複製ストレス下で複製フォークの崩壊を防ぎ、保護していることを示唆する。

同様に、Chk1 キナーゼも他の多くの研究者により、複製ストレス下で活性化し、複製フォークの保護に関与していることが示唆されている。前述の通り、Chk1 は Cdc7-ASK の安定性を制御しているので、Chk1 による複製フォークの安定化は Cdc7-ASK を介したものである可能性があるが、複製フォークを構成するタンパク質を直接リン酸化することによる可能性も考えられ、Chk1 による複製フォーク安定化の分子機構は明らかではない。

### 2. 研究の目的

上記の背景および申請者のこれまでの研究成果・予備的データをもとに、本研究では 4 年間の研究期間内に以下のことを明らかにしようと考えた。

- (1) USP7 による Cdc7-ASK のクロマチン上での安定化の分子機構。
- (2) Cdc7-ASK が複製フォークに集積するか否かを明らかにし、さらに複製フォークに集まる分子メカニズムを解明する。
- (3) Cdc7 並びに Chk1 の新規基質を同定し、機能解析を行う。さらにこれらのキナーゼの阻害によりクロマチンから脱落もしくは集積するタンパク質を同定し、複製ストレス下で複製フォークの崩壊を防ぐ分子機構の全体像を明らかにする。

### 3. 研究の方法

本研究では、USP7 による Cdc7 キナーゼ活性制御因子 ASK タンパク質の安定化の分子機構の解明、Cdc7 キナーゼとその上流に位置する Chk1 キナーゼの基質を同定・機能解析し、複製ストレス下でフォークの崩壊を防ぎ、安定化する分子機構の全貌を明らかにする。この目的を達成するために、

- (1) siRNA や過剰発現株・ノックアウト細胞株などを用いて、USP7 の ASK タンパク質の安定化に

おける機能を調べる。また、USP7の活性制御タンパク質であるGMPS(GMP synthetase)のノックダウンによるASKタンパク質の安定性への影響も調べる。

(2) iPOND(isolation of proteins on nascent DNA)法を用い、ASKタンパク質などの複製フォークへの集積を調べる。

(3) オーキシシン(植物ホルモン)の添加によって短時間でタンパク質分解を制御できるAID-Cdc7細胞株、AID-Chk1細胞株を樹立する。

(4) 上記細胞株を用いた定量的プロテオミクス解析(SILAC法)により、タンパク質リン酸化が複製フォークの安定化に果たす役割を網羅的に解明する。

#### 4. 研究成果

(1) 脱ユビキチン化酵素USP7によるASKタンパク質安定化の分子メカニズムの解明。

U2OS細胞にpcDNA6/TR vectorとpcDNA4/TO-USP7(WT) vectorを安定的に発現させた細胞株を樹立した。この細胞株を用いて、野生型USP7の過剰発現によってASKタンパク質が安定化することを確認した。また、不活性変異型USP7(C223S)を過剰発現させても上記の効果は認められないことも確認した。

さらに、ユビキチン化酵素複合体APC/C(Anaphase promoting complex/cyclosome)の活性制御サブユニットの1つであるCdh1タンパク質の過剰発現によるASKタンパク質の減少(すでに発表済み)が野生型USP7の過剰発現によって抑えられることも見出した。

免疫沈降法によって、ASK-USP7、Cdc7-USP7の結合を確認した。

USP7をsiRNAによってノックダウンするとASKタンパク質の減少が認められた。また、USP7ノックアウト細胞でもASKタンパク質の著しい減少を確認した。

USP7の活性制御タンパク質であるGMPSのノックダウンによりUSP7の酵素活性を低下させると、ASKタンパク質の減少が認められた。

複製ストレス下ではUSP7依存性にGMPSがクロマチンに結合(おそらくUSP7-GMPS複合体として)することをWestern blotで確認した。また、細胞染色により複製ストレス下でGMPSが核内移行することを見出した。

ドキシサイクリン依存性にUSP7をノックダウンできる細胞株を樹立し、この細胞がDNA複製を阻害するHU(hydroxyurea)に高感受性を示す(死にやすくなる)ことを見出した。

これらの結果からUSP7による脱ユビキチン化がAPC/C-Cdh1によるユビキチン化に拮抗してASKタンパク質を安定化することが強く示唆された。

(2) ASKタンパク質の複製フォークへの集積については、はっきりとした結果は得られなかった。

(3) AID(Auxin-induced degron)-Cdc7細胞株、AID-Chk1細胞株の樹立。

AID-tagを付加したCdc7またはChk1を発現するベクター(pAID-Cdc7, pAID-Chk1)を作成した。これらの発現ベクターを、293T細胞に一過性に導入(transient transfection)して、AID-Cdc7タンパク質、AID-Chk1タンパク質の発現を確認した。しかし、これらのベクターを各々、Cdc7ノックダウン細胞、Chk1ノックダウン細胞に安定的に導入した細胞株を樹立しようと何度か試みたが、目的の細胞株は得られなかった。

(4) Cdc7キナーゼによるReplisome安定化のメカニズム。

申請者はhydroxyurea(HU)でDNA複製を停止させた状態で、低分子Cdc7キナーゼ阻害剤(PHA-767491)によって、そのキナーゼ活性を阻害すると多くのreplisome構成タンパク質がクロマチンから脱落することを見出した。Cdc7キナーゼ活性阻害によってクロマチンから脱落するタンパク質として、DNAポリメラーゼ、RPA32、MCM10、Cdc45、Slc5、Psf3を同定した。一方、興味深いことにMCM2、MCM4、Topbp1、PCNAはCdc7キナーゼ阻害によるクロマチンからの脱落は認められなかった。これは、Cdc7が何らかのタンパク質をリン酸化することによって、複製ストレス下でreplisomeの崩壊を防ぎ、保護していることを強く示唆する。

今回、このリン酸化基質の同定には至らなかったが、Cdc7キナーゼは複製フォークが停止したときに(複製ストレス下で)、replisomeを安定化する、という新しい機能が明らかとなった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Morichika Takita, Fujiko Tsukahara, Taishi Mishima, Katsuaki Ieguchi, Masayuki Yamada, Hiroaki Honda, and Yoshiro Maru	4. 巻 9(60)
2. 論文標題 Paradoxical counteraction by imatinib against cell death in myeloid progenitor 32D cells expressing p210BCR-ABL	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 31682-31696
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.25849.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takeshi Tomita, Katsuaki Ieguchi, Morichika Takita, Fujiko Tsukahara, Masayuki Yamada, Jean-Marc Egly, and Yoshiro Maru	4. 巻 164(6)
2. 論文標題 C1D is not directly involved in the repair of UV-damaged DNA but protects cells from oxidative stress by regulating gene expressions in human cell lines	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 415-426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy069.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Beresova L, Vesela E, Chamrad I, Voller J, Yamada M, Furst T, Lenobel R, Chroma K, Gursky J, Krizova K, Mistrik M, Bartek J.	4. 巻 15
2. 論文標題 Role of DNA repair factor XPC in response to replication stress, revealed by DNA fragile site affinity chromatography and quantitative proteomics	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Proteome Research	6. 最初と最後の頁 4505-4517
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jproteome.6b00622	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Sayuri Ito, Hidemasa Goto, Kinue Kuniyasu, Mayumi Shindo, Masayuki Yamada, Kozo Tanaka, Gaik-Theng Toh, Masaaki Sawa, Masaki Inagaki, Jiri Bartek & Hisao Masai	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Cdc7 kinase stimulates Aurora B kinase in M-phase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54738-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----