

令和 1 年 12 月 1 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30 年度

受付番号 201860090

氏 名 Tsukushi Izumida

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：バージニア州シャーロッツビル（国名：アメリカ合衆国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
脱ユビキチン化酵素による過剰な DNA 複製を引き起こす新たな仕組みの解明
3. 派遣期間：平成 30 年 8 月 19 日 ～ 令和 1 年 9 月 24 日（402日間）
4. 受入機関名及び部局名
Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Virginia
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可）**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

【本研究の背景・目的】

DNA 複製は最も基本的な生命現象の一つであり、その厳密な制御は染色体数を一定に保ち、染色体異常を防ぐために必須の気候である。染色体数を一定に保つためには、一回の細胞周期あたり一度だけ DNA 複製が生じるように規定されなければならない。もし、DNA の過剰な複製である再複製が生じると、多倍体や DNA 損傷などの染色体異常が誘導されてしまう。染色体数の増加は多くの悪性腫瘍で共通の特徴であり、再複製を防ぐ機構は極めて重要な癌抑制機構と考えられているが、未だその膳坊は明らかとなっていない。

再複製を防ぐためには、“ライセンス化”と呼ばれる機構により、複製開始点が一回の細胞周期当たり一度だけに活性化するように制御されている。具体的には CDT1、Cdc6、ORC1、MCM2-7 よりなる複製前複合体(Pre-replicative complex: Pre-RC)のクロマチンへの結合反応であり、G1 期で形成され、実際に DNA を複製する S 期以降は形成が抑制されることで、DNA 複製が重複しないように制御されている。その重要性ゆえに複数の分子機構で制御されており、1)DNA 複製抑制因子である geminin が S 期以降に蓄積し、CDT1 に直接結合することで、クロマチンへの結合を阻害する。2)活性化した Cyclin A/CDK1 が CDT1 をユビキチン分解へ導く。3)Set8 が G1 期にヒストン H4 をメチル化することが pre-RC 形成に必須であり、メチル化を引き起こすと直ちにタンパク分解され、pre-RC 形成を一度だけに規定することが報告されている。実際に Emi1、geminin や Cyclin A の knockdown 及び CDT1、Cdc6、Set8 の過剰発現は再複製を誘導し、核の大型化や DNA 量の異常な増加を生じる。

上述のように、pre-RC 構成因子やその関連分子の厳密なタンパク量の調節が、再複製を抑制するのに重要であり、これにはユビキチンプロテアソーム系による細胞周期依存的なタンパク分解（ユビキチン分解）が必須の役割を果たすことが明らかとなってきた。ユビキチン分解は、ユビキチンリガーゼにより基質タンパクがポリユビキチン化され、26S プロテアソームにより分解される基質特異的なタンパク分解機構である。再複製の抑制には geminin、Cyclin A や Cdc6 が APC/C ユビキチンリガーゼにより、CDT1 や Set8 が SCFSKP2 及び CUL4Cdt2 ユビキチンリガーゼに

より分解される必要があることが報告されている。

興味深いことに、近年、脱ユビキチン化酵素と呼ばれる新規の酵素群が発見され、ユビキチンプロテアソーム系により制御を受ける様々な生命現象で必須の役割を果たすことが明らかとなりつつある。脱ユビキチン化酵素はヒトで約 90 種類存在するプロテアーゼで、ユビキチン鎖を解動的に切断し、ユビキチン分解に拮抗し、基質タンパクを安定化する。前述のように再複製の抑制には、ユビキチン分解が必須の役割を果たしていることから、再複製の制御に脱ユビキチン化酵素が関わる可能性が高いにも関わらず、これまでに全く報告がない。従って、本研究ではヒトで存在する約 90 種類すべてに対する siRNA ライブラリを作製し、これを用いた網羅的な遺伝子機能解析により再複製を制御する脱ユビキチン化酵素を新たに同定することを目的とする。本研究で同定する脱ユビキチン化酵素は再複製の制御を介して、染色体数を一定に保つ仕組みや発癌機構の理解につながる可能性を有している。

【研究成果】

1) 脱ユビキチン化酵素に対する siRNA ライブラリを用いた再複製に關与する脱ユビキチン化酵素のスクリーニング

前述のように、ヒトで存在する約 90 種類すべてに対する siRNA ライブラリを構築した。具体的には過去の論文を参考に偽遺伝子を除く、ヒトで存在するすべての脱ユビキチン化酵素をリストアップした。次にリストを参考に Dharmacon 社の pre-design siRNA よりリストアップした脱ユビキチン化酵素それぞれに対する siRNA を購入し、96well プレートに分注した。選択した単一の siRNA の効果が低い可能性を排除するため、1 つの遺伝子に対して 4 つの設計の異なる siRNA の mixture を購入した。

スクリーニングに用いる細胞株は、前述の Em1 (Fbxo5)、geminin の knockdown によって強く再複製が誘導されることが報告されている大腸癌細胞株 HCT116 を使用した。再複製の評価方法としては、再複製が誘導されると 4 倍体以上に DNA を有する細胞が出現することを利用し、培養細胞を 70%EtOH で固定後、Propidium iodide (PI) 染色で DNA を染色し、フローサイトメトリーによって 1 細胞当たりの DNA 含有量を評価した。Positive control として前述の Em1 (Fbxo5) siRNA を使用した。

結果は図 1 の通りである (図 1 参照)。多くの遺伝子で細胞周期プロファイルの軽度の変化がみられ、一部の遺伝子で大きな変化がみられた。

PRPF8、PSMD7、PSMD14 で明らかな G2/M arrest を認めたが、knockdown によって再複製が誘導される脱ユビキチン化酵素は存在しないことが明らか



図1: 再複製を制御する脱ユビキチン化酵素のスクリーニング

となった (図 2)。しかしながら、脱ユビキチン化酵素にはそのアミノ酸配列の類似性から paralog や ortholog がいくつか存在しているものもあり、1 つの脱ユビキチン化酵素を siRNA によりノックダウンしてもその機能が paralog や ortholog によって保証される可能性も否定はできないため、配列の類似性を認める複数の分子を同時にノックダウンすることで DNA 再複製を誘導できる可能性は排除できない。

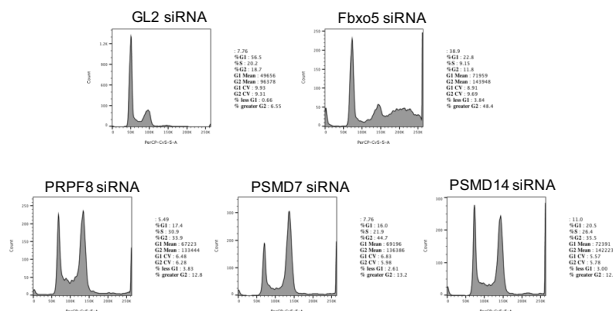


図2: 脱ユビキチン化酵素のノックダウンでは再複製は誘導されない

2) MLN4924 (NEDD 化阻害薬)を用いた再複製誘導条件下での再複製を制御する脱ユビキ

チン化酵素のスクリーニング

1)のスクリーニングを実施したが、脱ユビキチン化酵素の siRNA による Loss of function によって再複製は誘導されないことが分かった。そこで、研究計画当初の実験計画を変更し、逆に再複製誘導条件下で再複製を阻害する siRNA を探索し、再複製を制御する脱ユビキチン化酵素を同定することを考えた。NEDD 化阻害剤である再複製を誘導することができることが知られている。Cullin を構成要素とするユビキチンリガーゼ全体の活性化を抑制するため、特に CDT1 の蓄積させることが再複製の誘導に重要と考えられている。そこで抑制の陽性コントロールとして CDT1 siRNA を用いて条件検討を行なった。過去の報告に一致して、MLN4924 処理によって明らかな DNA 含有量の増加がみられ、再複製が誘導された。加えて CDT1 の siRNA によって、G2/M arrest の細胞周期プロファイルを示し、再複製を抑制すること

できた(図 3)。
そこで、上記の予備検討に従い、HCT116 細胞株に siRNA を導入後、24 時間後に 0.3 μ M の MLN4924 処理を 20 時間行い、PI 染色を行い、Flowcytometry にて解析を行なった(図 4)。DNA 再複製を促進した遺伝子は陽性コントロールである Emil のみであったが、興味深いことに 3 つの脱ユビキチン化酵素に対する siRNA が CDT1 siRNA に類似した G2/M arrest を引き起こし、再複製を抑制した。3 つのうち、1 つは NEDD 化を取り除く分子である CSN5 であり、この分子をノックダウンすると NEDD 化が蓄積し、MLN4924 の作用に拮抗するため、再複製を抑制したと考えられ、実施したスクリーニング系が正しく働いていると考えられた(図 5)。

3) MLN4924 による再複製誘導を阻害する脱ユビキチン化酵素に対する siRNA の検証

2)の研究成果より、USP20 及び USP26 が再複製を制御する脱ユビキチン化酵素の候補として同定したため、それぞれの設計の異なる siRNA を二つずつ購入し、検証実験を行ったところ、USP20 に関しては 2 つのうち、一つが同様の抑制効果を示したが、もう一方は効果を示さなかった。USP26 に関してはいずれの siRNA も同様の抑制効果を示したため、USP26 を最終的な候補遺伝子として絞りこんだ。

次に、DNA 複製時に取り込まれる BrdU で細胞を処理し、FITC 標識抗 BrdU 抗体と PI 染色を併せて行い、厳密な DNA 再複製を計測した。興味深いことに USP26 の knockdown により、実際に再複製が抑制されることが証明された(図 6)。Western blot 法により、再複製に関わる既知の分子群のタンパク発現を解析した。興味深いことに、再複製が誘導されると DNA 損傷が生じ、Chk1 のリン酸化が生じることが知られているが、USP26 の knockdown は Chk1 のリン酸化を抑制した(図 7)。しかしながら、CDT1 などの再複製に直接関与する分子群には有意な差は見られなかった(図 7)。従って、これまでに知られていない新規の経路によって再複製が抑制

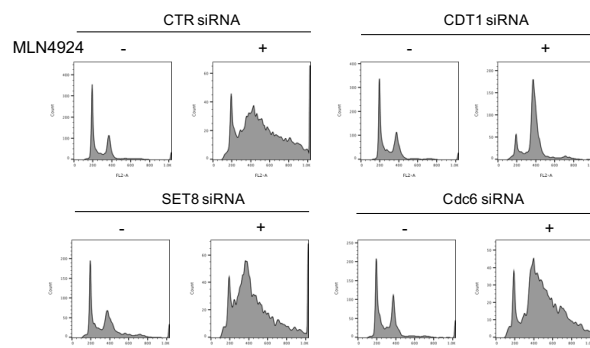


図3: MLN4924は再複製を誘導し、これはCDT1のノックダウンにより抑制される

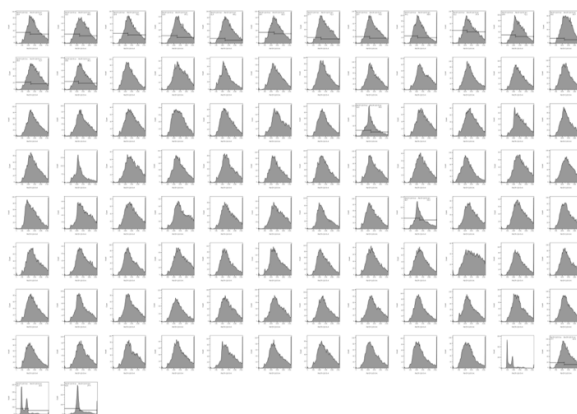


図4: MLN4924による再複製誘導条件下での再複製を制御する脱ユビキチン化酵素のスクリーニング

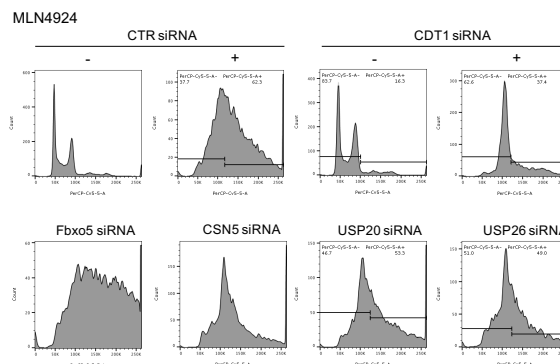


図5: 脱ユビキチン化酵素のノックダウンはMLN4924により誘導されるDNA再複製を抑制する

されている可能性が示唆された。さらに MLN4924 非投与で細胞周期を G1/S 期に同調させ、S 期から分裂期までの DNA 複製を観察したところ、DNA 複製の完了までの時間がコントロールに比べて延長していること、USP26 がクロマチン結合因子と複合体を形成していることを見出した。また、USP26 は相同組み換え修復に関与することが報告されており、検証実験を行なったところ、実際に USP26 の knockdown によって相同組み換え修復効率の低下がみられた(図 8)。従って、これまでに全く報告はないが、相同組み換え修復の不全が再複製の誘導を阻害する可能性があり、その詳細を現在、引き続き解析中である。本研究費の研究期間は終了し、日本に帰国したが、今後も派遣先であるバージニア大学の Anindya Dutta 教授との共同研究として、本研究を継続し、研究成果を論文としてまとめ、国際誌に発表したいと考えている。

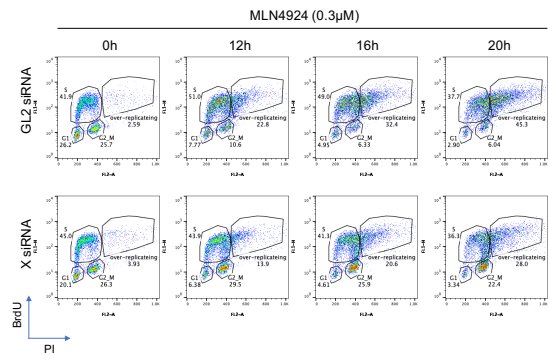


図6: USP26のknockdownはMLN4924により誘導される再複製を抑制する

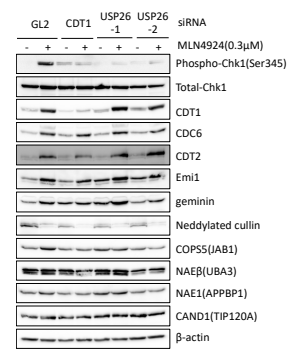


図7: USP26のknockdownの再複製制御分子への影響

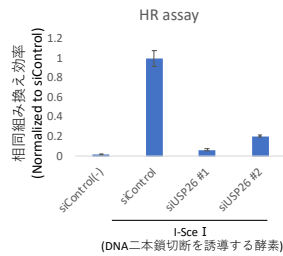


図8: USP26のknockdownは相同組み換え修復効率を低下させる