

# S 期チェックポイントメディエーターによる複製フォーク進行制御

実験医学 Vol. 25 No. 5 (増刊) 2007

## 要旨

細胞が何らかの異常を検知すると、チェックポイント機構が働き、細胞周期を特定の位置で停止させる。S 期チェックポイントは、染色体 DNA 上の障害等により複製フォークの進行が阻害された際に、細胞周期を停止させ、効率的に DNA 複製・修復・組換えを制御する機構である。最近、S 期チェックポイントメディエーターが、チェックポイントの活性化における機能とは独立に、複製フォーク複合体とともに複製フォーク上を移動し、複製フォークを保護し安定化する機能を持つことがわかった。本稿では、S 期チェックポイントメディエーターによる複製フォーク進行制御を中心に、最新の知見を紹介する。

## はじめに

真核細胞がゲノムを安定に維持するためには、細胞分裂の度に正確な DNA 複製や染色体分配を行なう必要がある。しかし細胞は、放射線や化学物質など細胞内外に存在する DNA 損傷因子により常に危険な状態に曝されている。DNA 複製装置であるレプリソームは、S 期において染色体 DNA を複製しながら移動するが、損傷を受けた DNA 領域に到達するとその運動を停止し、しかるべき修復を待つ。このとき、S 期チェックポイントと呼ばれるシグナル伝達が活性化し、別の複製起点での新たなレプリソームの形成や細胞周期の進行を抑制する。同時に、S 期チェックポイントは、複製フォークの停止とその安定化に寄与する。このチェックポイントが正常に働かない場合、染色体 DNA に変異が蓄積し、がん化が誘発される。しかし、S 期チェックポイントがどのような分子機構で活性化され、複製フォークの安定化を実現しているのか解明すべき謎は多い。

本稿では、最初に S 期チェックポイント経路におけるメディエーターの機能について概説する。そして、近年急速に解明されつつあるメディエーターを介した複製フォーク進行制御について最新の知見を紹介する。

なお、基本的にヒトでの遺伝子・タンパク質名を使用し、分裂酵母や出芽酵母等の遺伝子・タンパク質の場合には、その右肩にヒトホモログ名を付した (表)。

表 DNA複製および損傷チェックポイント因子の対応表

ヒト	分裂酵母	出芽酵母	特徴
ATR	Rad3	Mec1	PI3キナーゼファミリー
ATRIP	Rad26	Ddc2	ATR制御サブユニット
ATM	Tel1	Tel1	PI3キナーゼファミリー
Rad17	Rad17	Rad24	RFC様複合体(チェックポイントクランプローダー)
Rad1	Rad1	Rad17	
Rad9	Rad9	Ddc1	PCNA様複合体
Hus1	Hus1	Mec3	(チェックポイントクランプ)
Tim1	Swi1	Tof1	FPC(フォーク保護複合体)
Tipin	Swi3	Csm3	
53BP1	Crb2	Rad9	メディエーター, BRCTドメイン
Claspin	Mrc1	Mrc1	メディエーター, coiled-coilドメイン
Chk1	Chk1	Chk1	セリン/スレオニンキナーゼ
Chk2	Cds1	Rad53	セリン/スレオニンキナーゼ, FHAドメイン

表の中で、主に複製チェックポイントで働く因子群を網掛けで示した。

## 1. S 期チェックポイントシグナル伝達経路<sup>1)</sup>

S 期チェックポイントシグナル伝達経路は、大きく分けて次の 4 つの素過程、1) DNA 複製障害や DNA 損傷などの異常を検知するセンサー(sensor)、2) 検出された異常をターゲットに伝えるトランスデューサー(transducer)、3) チェックポイントへの作用を直接行うエフェクター(effector)、4) チェックポイントシグナルが最終的に作用するターゲット(target)、から構成されている(表)。これらの因子の多くは、放射線や DNA 損傷を引き起こす薬剤に高感受性を示す変異体の解析から発見された。以下に各過程についてごく簡単に述べる。

### 1) センサー

ヌクレオチドプールの枯渇や DNA 損傷による DNA 複製障害が起こると、PI3 キナーゼファミリーに属する ATM や ATR が活性化される。ATR は ATRIP とヘテロ二量体を形成する。ATRIP は ssDNA(一本鎖 DNA)-RPA(replication protein A)複合体に結合し、ATR を DNA 複製フォークの停止部位に導き、ATR-ATRIP キナーゼの活性化を引き起こす。しかし、ATR-ATRIP キナーゼの活性化だけでは、下流のキナーゼにシグナルを伝達できず、Rad17 チェックポイントクランプローダー複合体(Rad17-Rfc2-5)が、PCNA 様構造をとる 9-1-1(Rad9-Hus1-Rad1)チェックポイントクランプ複合体を DNA 上にロードする必要がある。この ATR-ATRIP の活性化と 9-1-1 複合体の DNA へのローディングは独立的に起こる。両者が S 期チェックポイントのセンサーとしてどのように協調し合っているのかはまだ不明な点が多いが、ごく最近、DNA 上にロードされた Rad17 が ATR によりリン酸化を受け、後述するメディエーター分子 Claspin と相互作用すること、そしてその結果 ATR が Claspin をリン酸化し、Chk1 の活性化が起こると報告された<sup>2)</sup>。

### 2) トランスデューサー

トランスデューサーとして Chk1, Chk2 の 2 つのセリン/スレオニンキナーゼが挙げられる。Chk1, Chk2 は活性化された ATM や ATR により直接リン酸化・活性化され、その下流の細胞周期制御因子であるエフェクターの働きを調節する。S 期チェックポイント経路において、哺乳類では Chk1、分裂酵母では Cds1<sup>Chk2</sup>、出芽酵母では Rad53<sup>Chk2</sup> が中心的な役割を果たしている。

### 3) エフェクター

細胞核内全体に存在する Cdc25A や Wee1 などがエフェクター分子として働く。活性化されたトランスデューサーによってリン酸化制御を受けたエフェクターは、DNA 複製障害や DNA 損傷などの異常のシグナルをターゲットに伝達する。

### 4) ターゲット

最終的に、S 期チェックポイントシグナルは CDK の活性を抑制することで細胞周期の進行を遅延させる。それ以外に、後期複製開始点のファイリングの抑制、DNA 修復酵素の転写応答の活性化、そして複製フォークの安定化と停止した複製フォークの進行の再開に関わる因子群を制御する。

## 2. S 期チェックポイントメディエーターの同定とその機能

### 1) S 期チェックポイントメディエーターの同定

ATM, ATR がいかにかして発生したシグナルの種類を識別し、Chk1, Chk2 キナーゼを区別してシグナルを伝達しているかについては謎であった。分裂酵母では Rad3<sup>ATR</sup> が G2 期における DNA 損傷に应答して Chk1 を、一方 S 期での DNA 損傷や複製フォーク障害に対しては Cds1<sup>Chk2</sup> をそれぞれリン酸化・活性化することで細胞周期の停止を行う。筆者らは、Cds1<sup>Chk2</sup> の活性化に特異的に必要な因子 Mrc1<sup>Claspin</sup> (mediator of the replication checkpoint 1) を遺伝学的手法により発見した<sup>3)</sup>。Mrc1<sup>Claspin</sup> は S 期特異的に発現し、DNA 複製障害に应答した Cds1<sup>Chk2</sup> のリン酸化・活性化に必要な因子である。出芽酵母でもほぼ同時期に、S 期チェックポイントにおいて Rad53<sup>Chk2</sup> の活性化に必要な因子として Mrc1<sup>Claspin</sup> が見いだされた<sup>4)</sup>。両酵母の Mrc1<sup>Claspin</sup> はタンパク質レベルでの相同性は比較的低いものの、機能的ホモログであるといえる。一方、アフリカツメガエルの系で、リン酸化型 Chk1 と結合する分子として Claspin が同定された<sup>5)</sup>。Claspin は広く脊椎動物間で保存されており、DNA 複製フォークの停止による ATR 依存的な Chk1 の活性化に必要であり、酵母 Mrc1<sup>Claspin</sup> と同様に S 期チェックポイントのメディエーターとして機能する。

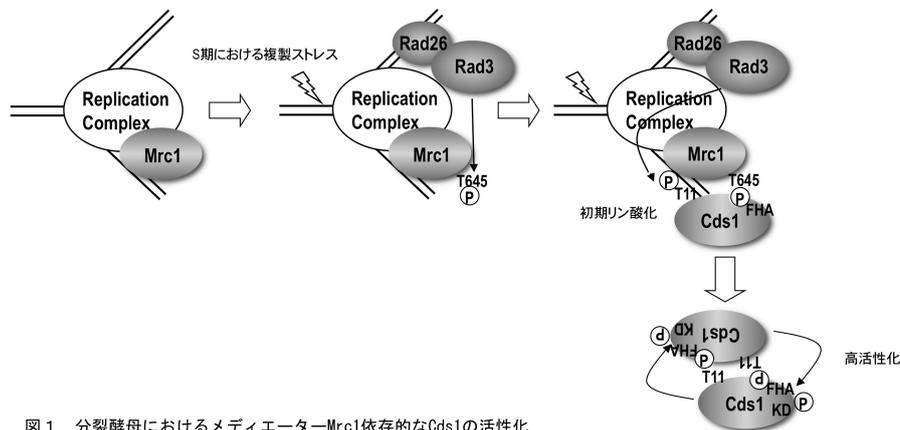


図1 分裂酵母におけるメディエーターMrc1依存的なCds1の活性化モデル<sup>8,9)</sup>

S期における複製ストレスに应答して、Rad3がMrc1のThr645をリン酸化し、Mrc1とCds1のFHAドメインとの間に相互作用が生じる。その結果、Rad3がCds1を基質として認識し、Cds1のThr11をリン酸化(初期リン酸化)する。この初期リン酸化により、もう1分子のCds1のFHAドメインがリン酸化Thr11領域と結合してホモ二量体を形成し、Cds1のキナーゼドメイン内に自己リン酸化を誘発して、Cds1キナーゼは高活性化状態となる。KD:キナーゼドメイン、FHA:FHAドメイン

## 2) S 期チェックポイントにおけるメディエーターの機能<sup>6)</sup>

それでは、S 期チェックポイントシグナル伝達経路において、どのような分子機構でメディエーターが機能しているのでしょうか。筆者らは分裂酵母のシステムでこの問題に取り組み、次のようなモデルを提唱した(図1)<sup>7,8,9)</sup>。S 期での DNA 損傷や複製フォーク進行障害に应答して、Mrc1<sup>Claspin</sup> の Thr645 が Rad3<sup>ATR</sup> によってリン酸化され、Mrc1<sup>Claspin</sup> と Cds1<sup>Chk2</sup> の FHA ドメインとの間に相互作用が生じる。その結果、Rad3<sup>ATR</sup> が Cds1<sup>Chk2</sup> を特異的な基質として認識できるようになり、Cds1<sup>Chk2</sup> の Thr11 をリン酸化(初期リン酸化)する。この初期リン酸化により、もう1分子の Cds1<sup>Chk2</sup> の FHA ドメインがリン酸化 Thr11 領域と結合してホモ二量体を形成し、Cds1<sup>Chk2</sup> のキナーゼドメイン内に自己リン酸化を誘発して、Cds1<sup>Chk2</sup> キナーゼは高活性化状態となる。出芽酵母でも同様の機構が働いていると考えられている。しかし、脊椎動物の S 期チェックポイントでは、ATR による Claspin のリン酸化が直接的でないこと、さらに FHA ドメインを持たない Chk1 がエフェクターキナーゼとして働くことから、その分子機構は異な

っていると考えられる。

### 3. メディエーターの分解によるチェックポイント停止からの回復

S期チェックポイント関連因子のうちで、分裂酵母  $Mrc1^{Claspin}$  をはじめとするメディエーターはS期特異的な発現パターンを示す唯一の因子であり、メディエーターは複製フォークの進行とS期チェックポイントを連動させる極めて重要な因子であるといえる。

ClaspinのS期特異的な発現は、転写時および翻訳後の両方の制御によるものだと考えられていた。Claspin 遺伝子は、S期移行制御を司る転写因子 E2F により転写レベルで制御を受ける。一方、ごく最近、翻訳後レベルの制御に関して報告が相次いだ<sup>10, 11, 12)</sup>。それらをまとめると次のようになる(図2)。

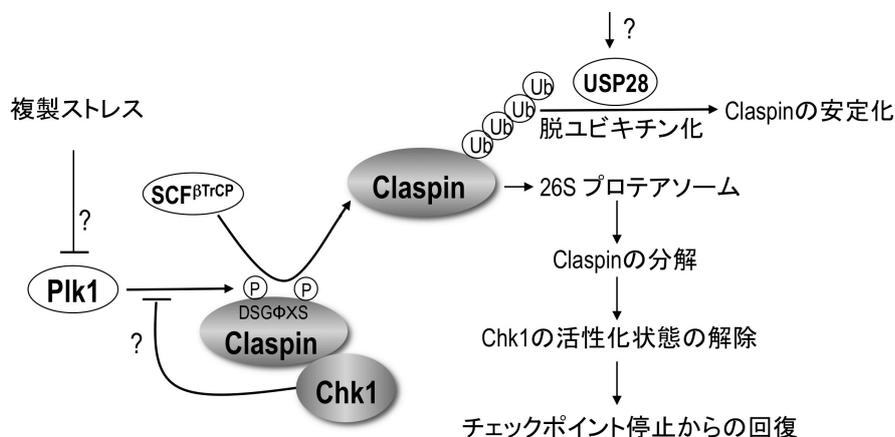


図2 SCF依存的なClaspinの分解によるチェックポイント停止からの回復

Plk1はClaspinと結合し、ClaspinのN末端側に存在するDSGΦXS配列からなるβ-TrCP phosphodegronの2つのセリンをリン酸化する。Plk1によりリン酸化を受けたClaspinは、SCF<sup>β-TrCP</sup>複合体に認識されユビキチン依存的に分解される。その結果、Chk1の活性化状態が解かれ、S期チェックポイント停止が解除される。Chk1によるClaspinの安定化の報告もあり、Chk1による分解抑制機構の存在も示唆されている。また、脱ユビキチン化酵素USP28によるClaspinの脱ユビキチン化も報告されている。

哺乳類 Claspin は、SCF 複合体をユビキチン E3 リガーゼとするユビキチン化によりM期開始時にタンパク質分解制御を受ける。この過程は、Fbw1/β-TrCPをF-box認識サブユニットとするSCF<sup>β-TrCP</sup>複合体とPlk1(Polo-like kinase-1)キナーゼに依存する。まず、Plk1はClaspinと結合し、ClaspinのN末端側に存在するDSGΦXS(Φ:疎水性アミノ酸、X:任意のアミノ酸)配列からなるβ-TrCP phosphodegronと呼ばれる認識モチーフの2つのセリンをリン酸化する。Plk1によりリン酸化を受けたClaspinは、SCF<sup>β-TrCP</sup>複合体に認識されユビキチン依存的に分解される。phosphodegronに変異を導入すると、ClaspinはSCF<sup>β-TrCP</sup>複合体に認識されず、タンパク質分解による制御を受けず安定化する。その結果、Chk1の活性化状態が長く維持され、S期チェックポイント応答からの回復が遅延し、M期への進行が遅れる。よって、SCF<sup>β-TrCP</sup>複合体依存的なClaspinの分解が、S期チェックポイント応答からの回復のタイミングを制御しているということになる。

一方、アフリカツメガエルの系では、Plk1によりリン酸化を受けたClaspinはクロマチンから解離することでS期チェックポイント適応(adaptation)反応を成立させていると報告された<sup>14)</sup>。アフリカツメガエルClaspinにもβ-TrCP phosphodegronは保

存されており、クロマチンから解離した Claspin が同様の分解制御を受けるのかどうか、今後の進展が待たれる。これらの制御において、キーとなる Plk1 自体の制御および Plk1 が Claspin を標的とする機構などは今後明らかにされるべき問題である。

また、Chk1 は S 期における Claspin の安定化に関与しており、Chk1 による Claspin の分解抑制の機構の存在も示唆されている。さらに、DNA 損傷応答制御において、ユビキチン化された Claspin が脱ユビキチン化酵素 USP28 により脱ユビキチン化されるという報告<sup>13)</sup>もあり、Claspin はユビキチン化と脱ユビキチン化の両方の制御を受け、厳密にそのタンパク質量が制御されていると考えられる。

通常の複製フォークの進行時でも、複製障害は多少なりとも生じているので、これらの機構が通常の S 期の進行中にも働いていると考えるのが自然であろう。筆者らも、分裂酵母において Mrc1<sup>Claspin</sup> が SCF 依存的なタンパク質分解制御を受けることを見いだしており（未発表データ）、この制御は S 期チェックポイントメディエーターに共通する制御機構であると思われる。

#### 4. メディエーターによる複製フォーク制御

複製フォークには、その進行をモニターし、緊急時に複製フォークを保護する因子が付随していることが最近明らかになってきた。それらは、出芽酵母 Mrc1<sup>Claspin</sup> が複製フォーク複合体とともに複製フォーク上を移動することが示されたことに端を発する<sup>15)</sup>。脊椎動物の Claspin についても同様の報告があり<sup>16)</sup>、生物種に関わらずメディエーターに普遍的な機構と推察される。さらに、出芽酵母で Mrc1<sup>Claspin</sup> の機能が欠損すると複製フォークの進行速度が低下することから、Mrc1<sup>Claspin</sup> が通常の複製フォークの進行にも関与していることが示唆され<sup>15, 17, 18)</sup>、アフリカツメガエル Claspin においても同様の傾向が報告されている<sup>16)</sup>。驚いたことに、これらには 2-2) で示したようなチェックポイント活性化における Mrc1<sup>Claspin</sup> のメディエーター機能を必要としない<sup>15, 17, 18)</sup>。複製フォークの進行速度の低下は、Mrc1<sup>Claspin</sup> の機能欠損により生じた DNA 損傷が、損傷チェックポイントを活性化することによる間接的なものである可能性も排除できない。実際、筆者らは分裂酵母 Mrc1<sup>Claspin</sup> の機能欠損により、HU で処理していない通常の細胞において、DNA 二本鎖切断部位に集まる Rad22（出芽酵母 Rad52 ホモログ）により認識される DNA 障害が生じていることを見いだしている（図 3: 未発表データ）。このことは、Mrc1<sup>Claspin</sup> 欠損により複製フォークの不安定化が生じていることを示唆する。現時点では、Mrc1<sup>Claspin</sup> が複製フォークの進行にどのように貢献しているのか、その分子機構は謎である。

さらに、白髭らは ChIP-on-chip 法による HU 添加時の複製領域と複製伸長因子の相対的な位置についての詳細な解析により、出芽酵母 Mrc1<sup>Claspin</sup> が Tof1<sup>Tim1</sup> とともに複製伸長複合体の統合性の保持に必要であることを明らかにした（図 4）<sup>19)</sup>。S 期チェックポイントのシグナルの発生には、複製フォーク停止の際に DNA ヘリカーゼと DNA ポリメラーゼが脱共役することにより生じるある程度の長さの ssDNA-RPA 複合体領域が必要であることが報告されている<sup>20)</sup>。しかし、Mrc1<sup>Claspin</sup> や Tof1<sup>Tim1</sup> の機能を欠損させると、新鎖 DNA 合成を伴わず DNA ポリメラーゼと DNA ヘリカーゼが先行し、複製領域より 2~3 kb 離れた位置で停止する。つまり、Mrc1<sup>Claspin</sup> や Tof1<sup>Tim1</sup> は、複製フォーク停止時に DNA ヘリカーゼと DNA ポリメラーゼの脱共役を安定に成立させる働きを持つと考えられる。Tof1<sup>Tim1</sup> は Csm3<sup>Tipin</sup> とのヘテロ二量体を構成し、FPC（フォーク保護複合体）として機能する（表）。以上のことより、Mrc1<sup>Claspin</sup> と FPC は複製開始時に複製

フォークにロードされ、MCM や Cdc45 と相互作用しつつ複製フォークの進行をモニタリングし、複製フォークの進行に問題が生じたときには、複製フォークを保護し安定化するという役割を持つと考えられた (図 4)。この安定化作用が、S 期チェックポイントの活性化に必要とされる。また、複製後の姉妹染色分体が分配されるための接着 (cohesion) の確立にも、これらの複製フォーク保護因子が関与することが示唆されている<sup>21)</sup>。

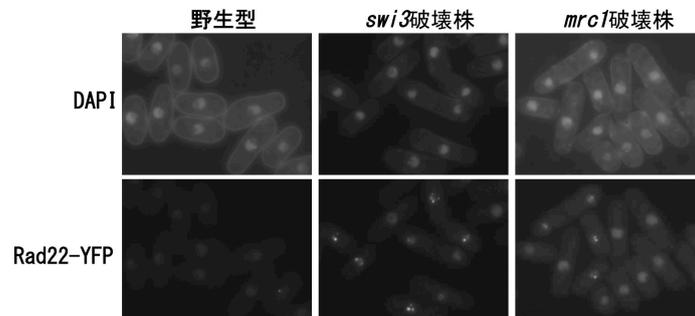


図3 分裂酵母S期チェックポイントメディエーター*mrc1*遺伝子破壊株でのRad22の核内fociの増加

DNA二本鎖切断部位を集まるRad22 (出芽酵母Rad52ホモログ) をRad22にYFPを融合させて観察した。野生型のコントロールに比べて、メディエーターMrc1の機能を欠損させた分裂酵母では顕著にRad22-YFP fociの増加が見られた。FPC複合体構成因子Swi3の機能欠損では、Rad22-YFP fociの増加がより顕著であった。

上述のように、FPCはMrc1<sup>Claspin</sup>とともに、複製フォークを保護し安定化する役割を果たしている。その一方で、出芽酵母および分裂酵母FPCは、複製阻害点(RFB)における複製フォーク進行阻害活性にも必要とされる<sup>22,23)</sup>。興味深いことに、RFBにおける複製フォーク進行阻害にはMrc1<sup>Claspin</sup>は必要とされない<sup>24)</sup>。これらは、複製フォークの進行阻害の様式の違いで説明されている<sup>24,25)</sup>。通常、複製フォーク進行中、Mrc1<sup>Claspin</sup>とFPCの機能により、DNAヘリカーゼとDNAポリメラーゼの共役が維持され、複製フォークは保護され安定に維持される。ヌクレオチドプールの枯渇やS期の損傷などによって、複製フォークが停止した場合、DNAヘリカーゼとDNAポリメラーゼの脱共役が起こり、S期チェックポイントの活性化を引き起こす。一方、Fob1(fork blocking function)タンパク質に依存したRFBにおける複製フォーク進行阻害の場合、複製フォークは崩壊し、それに伴いDNAヘリカーゼやDNAポリメラーゼはDNAから解離してしまう。RFBでの複製フォーク阻害を成立させるために、FPCはRrm3ヘリカーゼの働きを抑制し、Fob1をその場に維持する働きを持つと考えられている<sup>24)</sup>。出芽酵母での解析では、HU処理による複製フォークの停止の際には、約300塩基のssDNA領域が生じるが、Fob1に依存したRFBによる複製フォーク停止の場合には、たった数塩基のssDNAしか発生しない<sup>25)</sup>。このことは、RFBによる複製フォーク停止はS期チェックポイントの活性化を引き起こさないという結果とよく一致する。

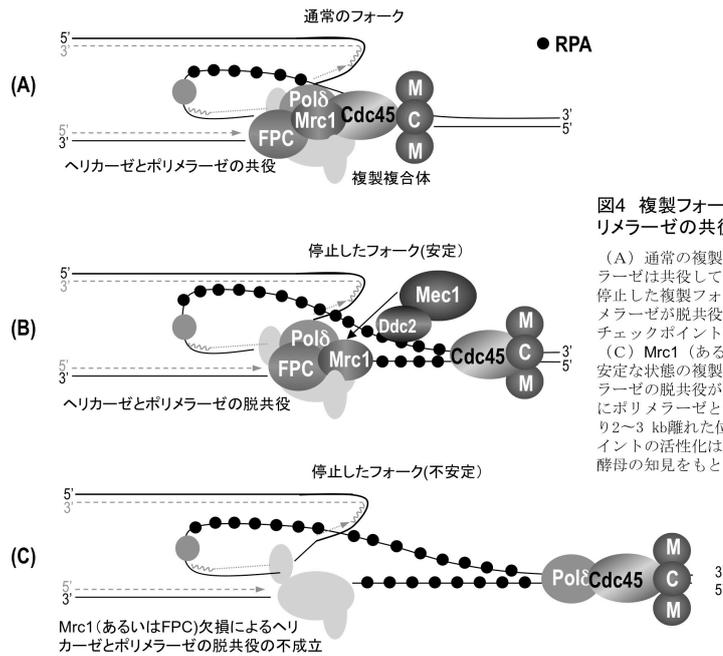


図4 複製フォーク進行におけるヘリカーゼとポリメラーゼの共役と脱共役を示すモデル<sup>19)</sup>

(A) 通常の複製フォーク：ヘリカーゼとポリメラーゼは共役している。(B) 複製ストレスにより停止した複製フォーク(安定)：ヘリカーゼとポリメラーゼが脱共役し、ssDNA-RPA領域が広がり、チェックポイントの活性化が可能となる。(C) Mrc1(あるいはFPC)の機能損失により、不安定な状態の複製フォーク：ヘリカーゼとポリメラーゼの脱共役が成立せず、新鎖DNA合成を伴わずにポリメラーゼとヘリカーゼが先行し、複製領域より2~3 kb離れた位置で停止している。チェックポイントの活性化は不可能。なお、このモデルは出芽酵母の知見をもとに描いている。

## おわりに

S期チェックポイントは、複製フォークの停止と、停止した複製フォークの安定化に寄与する。このチェックポイントが正常に働かない場合、染色体DNAに変異が蓄積し、がん化を誘発する。今後、これらの因子による複製フォークの構築、進行における生化学的機能の解明が、重要な課題である。

## 文献

- 1) Abraham, R. T.: Genes Dev., 15: 2177-2196, 2001
- 2) Wang, X. et al.: Mol. Cell, 23: 331-341, 2006
- 3) Tanaka, K. & Russell, P.: Nat. Cell Biol., 3: 966-972, 2001
- 4) Alcasabas, A. A. et al.: Nat. Cell Biol., 3: 958-965, 2001
- 5) Kumagai, A. & Dunphy, W. G.: Mol. Cell, 6: 839-849, 2000
- 6) Traven, A. & Heierhorst, J.: BioEssays, 27: 397-407
- 7) Zhao, H. et al.: Mol. Cell Biol., 23: 8395-8403, 2003
- 8) Tanaka, K. & Russell, P.: J. Biol.Chem., 279: 32079-32086, 2004
- 9) Xu, Y. et al.: Genes Dev., 20: 990-1003, 2006
- 10) Mailand, N. et al.: Mol. Cell, 23: 307-318, 2006
- 11) Peschiaroli, A. et al.: Mol. Cell, 23: 319-329, 2006
- 12) Mamely, I. et al.: Curr. Biol., 16: 1-6, 2006
- 13) Zhang, D. et al.: Cell, 126: 529-542, 2006
- 14) Yoo, H. Y. et al.: Cell, 117: 575-588, 2004
- 15) Osborn, A. J. & Elledge, S. J.: Mol. Cell, 17: 1755-1767, 2003
- 16) Lee, J. et al.: Mol. Cell, 11: 329-340, 2003
- 17) Szyjka, S. J. et al.: Mol. Cell, 19: 691-697, 2005
- 18) Tourriere, H. et al.: Mol. Cell, 19: 699-706, 2005
- 19) Katou, Y. et al.: Nature, 424: 1078-1083, 2003

- 20) Byun, T. S. et al.: Genes Dev., 19: 1040-1052, 2005
- 21) Xu, H. et al.: Mol. Cell. Biol., 24: 7082-7090, 2004
- 22) Mohanty, B. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 897-902, 2006
- 23) Noguchi, E. et al.: Mol. Cell. Biol., 24: 8342-8355, 2004
- 24) Calzada, A. et al.: Mol. Cell, 19: 1905-1919, 2005
- 25) Lambert, S. & Carr, A. M.: Biochimie, 87: 591-602, 2005