

論文内容要旨

Aurora-A controls pre-replicative complex assembly and
DNA replication by stabilizing geminin in mitosis
(Aurora-A は細胞分裂期において geminin を安定化すること
で複製前複合体形成や DNA 複製を制御する)

基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学

(主指導教員：高田 隆 教授)

応用生命科学部門口腔外科学

(副指導教員：武知 正晃 准教授)

基礎生命科学部門口腔顎顔面病理病態学

(副指導教員：宮内 睦美 准教授)

常松 貴明

論文内容要旨

論文題目 Aurora-A controls pre-replicative complex assembly and DNA replication by stabilizing geminin in mitosis

(Aurora-A は細胞分裂期において geminin を安定化することで複製前複合体形成や DNA 複製を制御する)

学位申請者 常松 貴明

DNA 複製は生物にとって根源的な現象であるため、厳密に制御されている。しかし、無秩序な自律性増殖を特徴とする癌では、DNA 複製機構の破綻を来し、染色体異常が生じると考えられている。したがって、DNA 複製機構を明らかにすることは、癌の発生・進展を理解するためにも非常に重要な課題である。真核生物では膨大な量の DNA を効率よく複製するため、複数の複製開始点を染色体上に形成するが、過剰な複製を抑制するため、DNA 複製期 (S 期) より前の G1 期に複製開始点を形成し、S 期以降での形成はなく、再複製を抑制している。この DNA 再複製の抑制に中心的な役割を果たす分子として geminin が知られている。複製開始点の形成はライセンス化と呼ばれ、ライセンス化因子である Cdt1, ORC, MCMs などからなる pre-RC (複製前複合体: pre-replicative complex) が DNA 上に形成されることによる。geminin は S 期以降、Cdt1 に直接結合することで、ライセンス化を抑制し、細胞分裂終了まで複製を阻害する。geminin は、細胞周期依存的にユビキチン分解によりタンパク量が制御されている。すなわち、geminin は、G1 期に Anaphase Promoting Complex/Cyclosome ユビキチンリガーゼ複合体である APC/C^{Cdh1}によりユビキチン化され、分解されるが、S-G2 期においては、APC/C の抑制分子である Emi1 (early mitotic inhibitor 1) により APC/C 活性が抑制されるため、安定化することが報告されている。しかしながら、Emi1 は SCF^{βTRCP} ユビキチンリガーゼ複合体により、細胞分裂期初期に分解されることから、細胞分裂期では APC/C が活性化し、種々の基質タンパクを分解する。しかし、geminin は、APC/C が活性化している細胞分裂期でも発現しており、特殊なタンパク安定化機構を有すると考えられるが、その詳細は明らかにされていない。そこで本研究では、細胞分裂期における geminin のユビキチン分解制御機構とその意義に関して、詳細な検討を行った。

まず、Cyclin A などの APC/C の一般的な基質タンパクとは異なり、細胞分裂期においても Geminin タンパクが安定化していることを確認し、この時期特異的に 25 番目のスレオニン残基がリン酸化されていることを見出した。また、そのリン酸化は、geminin と APC/C^{Cdh1} との結合を阻害することでユビキチン化を抑制することを明らかにした。加えて、geminin は、分裂期初期に活性化する APC/C^{Cde20} によってもユビキチン化されることを見だし、25 番目のスレオニン残基のリン酸化は、分裂期後期に活性化する APC/C^{Cdh1} のみならず、APC/C^{Cde20} によるユビキチン化も阻害することを明らかにした。興味深いことに、分裂期に geminin タンパクを安定化する 25 番目のスレオニン残基のリン酸化は、分裂期キナーゼである Aurora-A によって生じることを証明した。

次に、細胞分裂期における geminin のリン酸化による安定化の意義を調べるため、Aurora-A の siRNA

による発現抑制や阻害剤を用いて、分裂期における geminin の動態および pre-RC 形成への影響を検討した。細胞分裂期における siRNA の導入あるいは阻害剤による Aurora-A の抑制は、geminin タンパクを不安定化させるとともに、Cdt1 も不安定化させ、次の G1 期における pre-RC 形成を阻害した。詳細な検討の結果、分裂期において geminin は Cdt1 に結合し、再複製を抑制するとともに、そのタンパク安定化を介して、次の G1 期における pre-RC 形成に関与することを明らかにした。さらに、細胞分裂期における Cdt1 の安定化は、geminin の結合により SCF^{Skp2} ユビキチンリガーゼ複合体によるユビキチン化を阻害することによってもたらされることも明らかにした。

以上の結果より、細胞分裂期において、geminin は Aurora-A により 25 番目のスレオニンがリン酸化され、そのリン酸化が APC/C^{Cdc20} および APC/C^{Cdh1} ユビキチンリガーゼ複合体による geminin のユビキチン化を阻害し、再複製を抑制するとともに、Cdt1 の安定化を介して、次の G1 期での適切な pre-RC 形成に関わることを明らかにした。以上より、細胞分裂期における geminin のリン酸化による安定化は、適切な DNA 複製に必須の機構であることを証明した。Aurora-A、geminin および Cdt1 はいずれも多くの癌で過剰発現が報告されていることから、本研究で明らかにした geminin を中心とする DNA 複製調節機構の破綻が癌の発生や進展に深く関わる可能性が示唆される。