

博士論文審査報告書

氏名	貫名 康平
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	博理第107号
学位授与報告番号	甲第325号
学位授与年月日	平成30年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条1項該当
論文題目	CRL4-Cdt2 ubiquitin ligase is regulated through the phosphorylation of Cdt2 in the cell cycle 「Cdt2 のリン酸化による CRL4-Cdt2 ユビキチンリガーゼの活性制御の解析」
論文審査委員	(主査) 教授 水島 恒裕 (副査) 教授 吉田 秀郎 (副査) 教授 西谷 秀男 (副査) 教授 藤田 雅俊 (九州大学薬学研究院) (副査) 教授 Zoi Lygerou (パトラス大学医学部)

※ Lygerou 委員の審査結果については別紙（英文）として添付する。

1. 論文内容の要旨

ユビキチンリガーゼ CRL4^{Cdt2} は、DNA の複製開始後にライセンス化因子 Cdt1、ヒストン H4K20 メチル基転移酵素 Set8、チミン DNA グリコシダーゼ(TDG)等の基質を DNA 上にロードされた PCNA 依存的に分解する。CRL4^{Cdt2} によるこれら基質のタンパク質量の制御は、適切な細胞周期進行、DNA 複製に重要である。CRL4^{Cdt2} の基質認識サブユニット Cdt2 は、S 期の開始から有糸分裂の終わりまでリン酸化される。Cdt2 のリン酸化はサイクリン依存キナーゼ(CDK)の活性の変動をよく反映している。また、Cdk1 阻害剤が Cdt2 のクロマチン集積を促進するので、Cdt2 のリン酸化が CRL4^{Cdt2} の活性を制御することが示唆されている。しかし、CDK が Cdt2 をリン酸化するか、さらにそのリン酸化が CRL4^{Cdt2} にどのように関わるかについてはよくわかっていない。

この報告では、cyclin A/Cdk2 と cyclin B/Cdk1 により Cdt2 が *in vitro* でリン酸化されることを示した。さらに、Cdt2 の C 末端側に存在するすべての CDK コンセンサス配列に変異を加え(Cdt2-18A)、この変異が *in vitro* における CDK によるリン酸化、細胞周期進行に伴う Cdt2 のリン酸化を抑制することを示した。さらに、この変異体は野生型 Cdt2

に比べ DNA 上の PCNA に対する高い親和性を示し、それにより CRL4^{Cdt2} による Cdt1 に対するポリユビキチン化活性が亢進していた。そして、他の基質である Set8、TDG は S 期後期から G2 期に蓄積し始めるが、Cdt2-18A を過剰発現した細胞ではこれらの蓄積が妨げられることを明らかにした。

これらの結果は、CDK を介した Cdt2 のリン酸化が PCNA への親和性を低下させることで CRL4^{Cdt2} 活性を抑制することを示している。このように細胞周期における基質のタンパク量を制御することで、適切な細胞周期進行、および DNA 複製を維持すると考えられる。

2. 論文審査結果

細胞周期の正確な進行において、タンパク質分解系が重要な働きをしている。CRL4^{Cdt2} ユビキチンリガーゼは、S 期開始後 Cdt1、Set8、TDG などの基質をポリユビキチン化して分解を行ない、一回だけの DNA 複製をはじめとしたゲノム維持に関わっている。この時、CRL4^{Cdt2} はクロマチンにロードされた PCNA に依存して機能する。申請者は、S 期以降 M 期にかけて起こる Cdt2 のリン酸化が活性制御に関わるのではないかと考え解析を進めた。細胞周期の進行に関わるキナーゼ CDK に着目し、まず、*in vitro* 系にて Cdt2 が CDK によってリン酸化されることを示した。Cdt2 の C 末領域には、CDK のリン酸化コンセンサス配列が 18 箇所存在する。これらのリン酸化部位をアラニン(A)に置換した Cdt2-18A を作製した。Cdt2-18A では、CDK による *in vitro* でのリン酸化、および細胞周期でのリン酸化がほぼ抑制されていた。Cdt2-18A は、野生型 Cdt2 に比べて、S 期を通してクロマチンにロードされた PCNA に強く結合しており、基質 Cdt1 のポリユビキチン化を促進することを見出した。そして、Cdt2-18A を高発現した細胞では、S 期後期から見られる Set8 や TDG の蓄積が抑制されることを明らかにした。本研究は、CDK による Cdt2 のリン酸化が PCNA との結合を抑制することにより CRL4^{Cdt2} のユビキチン化活性を負に制御していることを示した知見であり、CRL4^{Cdt2} が細胞周期の特定の時期に機能する新たな制御機構を提起している。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文として価値のあるものと認める。

また、平成30年1月25日、論文内容およびこれに関連する事項について試問を行った結果、合格と判断した。

January 23, 2018

PhD Thesis Evaluation

PhD candidate: Kohei Nukina

Title: CRL4Cdt2 ubiquitin-ligase is regulated through the phosphorylation of Cdt2 in the cell cycle

The PhD Thesis of Kohei Nukina concerns the regulation of Cdt2 through the cell cycle of human cells in culture. Cdt2 regulation is important for the maintenance of genome integrity, as it has been shown to direct the proteolysis of central cell cycle regulators such as Cdt1, Set8, p21 and thymine DNA glycosidase, as part of the CRL4^{Cdt2} ubiquitin ligase complex. How Cdt2 is regulated through the cell cycle however, to ensure that substrates are targeted only at the correct point in time, remains poorly characterized. Substrate recognition by CRL4^{Cdt2} requires direct binding of substrates to DNA-loaded PCNA, and is therefore limited to when DNA replication or repair are active. Kohei Nukina now shows that Cdt2 is additionally regulated through direct phosphorylation by the cyclin dependent kinases Cdk2/cyclin A and Cdk1/cyclin B through the cell cycle. Experiments in vitro showed that Cdt2 is a substrate for phosphorylation by CDKs. Functional analysis in human cells in culture showed that phosphorylation of the C-terminal half of Cdt2 inhibits binding of Cdt2 to PCNA, thereby diminishing substrate recognition and ubiquitination. This appears to be important when cells are irradiated during mitosis: CRL4^{Cdt2} substrates are protected from proteolysis, due to phosphorylation of Cdt2. This study therefore highlights an important pathway which links CRL4^{Cdt2} activity to CDK activity, ensuring that CRL4^{Cdt2} targets its substrates only in specific phases of the cell cycle.

This work offers important novel insight into a pathway central for the maintenance of genome integrity across evolution. The study is well executed and controlled and properly presented. It constitutes a significant advance in our understanding of important cell cycle events.

Sincerely,



Zoi Lygerou, PhD
Professor of Biology