

博士論文審査報告書

氏名	Muadz bin Ahmad Mazian
学位の種類	博士（理学）
学位記番号	博理第 1 1 6 号
学位授与報告番号	甲第 3 5 4 号
学位授与年月日	平成 3 1 年 3 月 2 2 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 1 項該当
論文題目	A DNA-binding domain in the C-terminal region of Cdt2 enhances CRL4 ^{Cdt2} ubiquitin ligase activity for Cdt1 「Cdt2 C 末端領域内の DNA 結合ドメインは Cdt1 に対する CRL4 ^{Cdt2} のユビキチン化活性を促進する」
論文審査委員	(主査) 教授 宮澤 淳夫 (副査) 教授 吉久 徹 (副査) 教授 西谷 秀男 (副査) 教授 真木 寿治 (奈良先端科学技術大学院大学) (副査) 教授 Eishi Noguchi (Drexel University USA Principal Investigator Associate Professor)

Noguchi 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

細胞周期における正確な DNA 複製および修復によりゲノムが維持される。そのためにタンパク質分解系が重要な働きをしている。DNA の複製は、細胞周期に正確にそして一度だけ行われる。Cdt1 は、Cdc6-ORC とともにヘリカーゼ MCM2-7 をロードして複製起点をライセンス化し、DNA 複製の準備を行う。DNA の複製が開始すると、ユビキチンリガーゼ CRL4^{Cdt2} が Cdt1 をユビキチン化して分解するので、DNA の再複製が抑制される。また、UV などによる DNA 損傷時にも機能して Cdt1 の分解をもたらす。CRL4^{Cdt2} は、Cdt1 が PCNA 結合配列 (PIP ボックス) を介して PCNA に結合するとユビキチン化する。そして CRL4^{Cdt2} は、PCNA がクロマチンに結合していない G1 期においては機能せず、DNA 合成が開始して PCNA が DNA にロードされると Cdt1 の分解をもたらす。この細胞周期に依存した Cdt1 分解がゲノム維持に必須であるが、その制御機構はよくわかっていない。申請者は、このような課題を明らかにするため研究を行なった。

まず、WD40 リピートを持つ Cdt2 の N 末領域で CRL4 との複合体を形成するが、ユ

ビキチン活性が非常に低下することから、C 末側に活性化に関わる領域があると考えた。Cdt2 C 末端に見ついていた PIP ボックス以外の重要な部位を見つけるため、各種欠失変異体およびアミノ酸置換変異体を作成して解析を進めた。内在性の Cdt2 をノックダウンして UV 照射後の Cdt1 の分解をもとに欠失変異による解析を行ったところ、450-550 アミノ酸領域が CRL4^{Cdt2} の活性化に重要であることを見出した。この領域は塩基性アミノ酸が多く、予測解析ツールにより 470-570 アミノ酸領域が DNA 結合活性を持つことが示唆された。この特性は、マウス、ニワトリ、カエル Cdt2 でも確認された。そこでこの領域を含むタンパク質を精製し、DNA ビーズによるプルダウンおよび電気泳動での DNA バンドシフト (EMSA 法) にて、DNA 結合性を持つこと、そして一本鎖 DNA に強い結合能を示すことを明らかにした。これらの結果から、Cdt2 は C 末の PIP ボックスにより PCNA と結合し、さらに DNA と結合することにより、DNA にロードされた PCNA 上で基質 Cdt1 を捉えユビキチン化を促進すると考えた。

2. 論文審査結果

CRL4^{Cdt2} ユビキチンリガーゼは、DNA 複製開始因子 Cdt1 をはじめとする PIP デグロンを持つ PCNA 結合タンパク質の分解に関わり、DNA の再複製の抑制や DNA 損傷修復において重要な働きをしている。そのような制御のため、CRL4^{Cdt2} は、DNA 合成に伴い PCNA が DNA にロードされた場合にのみ素早く機能するように制御されているが、その機構の詳細は明らかでない。申請者は、Cdt2 の WD40 リpeat よりなる N 末側領域のみでは、CRL4 と結合して複合体を形成できるが、低いユビキチン化活性しか持たないことから、C 末側領域に重要な部位が存在すると考え各種変異体 Cdt2 を作成して研究を行なった。欠失変異による解析により、活性化に 450-550 アミノ酸領域が重要であることを見出した。この領域は塩基性アミノ酸が多く DNA 結合性が予測され、この領域を含むタンパク質を精製し、DNA 結合性を持つことを発見した。そして、一本鎖 DNA にも強く結合することを見出した。ゲノム維持のため CRL4^{Cdt2} は、G1 期では働かず、S 期が開始して PCNA が DNA にロードされると機能するように制御されている。本研究は、このような CRL4^{Cdt2} の細胞周期進行に応じた活性の制御機構において、Cdt2 の DNA 結合部位が重要な働きをしていることを示す初めての成果である。

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 31 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。

博士論文審査報告書

論文題目 : A DNA-binding domain in the C-terminal region of Cdt2 enhances CRL4^{Cdt2} ubiquitin ligase activity for Cdt1

「Cdt2 C 末端領域内の DNA 結合ドメインは Cdt1 に対する CRL4^{Cdt2} のユビキチン化活性を促進する」

申請者 : Muadz bin Ahmad Mazian

1. 論文内容の要旨

細胞周期における正確な DNA 複製および修復によりゲノムが維持される。そのためにタンパク質分解系が重要な働きをしている。DNA の複製は、細胞周期に正確にそして一度だけ行われる。Cdt1 は、Cdc6-ORC とともにヘリカーゼ MCM2-7 をロードして複製起点をライセンス化し、DNA 複製の準備を行う。DNA の複製が開始すると、ユビキチンリガーゼ CRL4^{Cdt2} が Cdt1 をユビキチン化して分解するので、DNA の再複製が抑制される。また、UV などによる DNA 損傷時にも機能して Cdt1 の分解をもたらす。CRL4^{Cdt2} は、Cdt1 が PCNA 結合配列 (PIP ボックス) を介して PCNA に結合するとユビキチン化する。そして CRL4^{Cdt2} は、PCNA がクロマチンに結合していない G1 期においては機能せず、DNA 合成が開始して PCNA が DNA にロードされると Cdt1 の分解をもたらす。この細胞周期に依存した Cdt1 分解がゲノム維持に必須であるが、その制御機構はよくわかっていない。申請者は、このような課題を明らかにするため研究を行なった。

まず、WD40 リピートを持つ Cdt2 の N 末領域で CRL4 との複合体を形成するが、ユビキチン活性が非常に低下することから、C 末側に活性化に関わる領域があると考えた。Cdt2 C 末端に見ついていた PIP ボックス以外の重要な部位を見つけるため、各種欠失変異体およびアミノ酸置換変異体を作成して解析を進めた。内在性の Cdt2 をノックダウンして UV 照射後の Cdt1 の分解をもとに欠失変異による解析を行ったところ、450-550 アミノ酸領域が CRL4^{Cdt2} の活性化に重要であることを見出した。この領域は塩基性アミノ酸が多く、予測解析ツールにより 470-570 アミノ酸領域が DNA 結合活性を持つことが示唆された。この特性は、マウス、ニワトリ、カエル Cdt2 でも確認された。そこでこの領域を含むタンパク質を精製し、DNA ビーズによるプルダウンおよび電気泳動での DNA バンドシフト (EMSA 法) にて、DNA 結合性を持つこと、そして一本鎖 DNA に強い結合能を示すことを明らかにした。これらの結果から、Cdt2 は C 末の PIP ボックスにより PCNA と結合し、さらに DNA と結合することにより、DNA にロードされた PCNA 上で基質 Cdt1 を捉えユビキチン化を促進すると考えた。

2. 論文審査結果

CRL4^{Cdt2} ユビキチンリガーゼは、DNA 複製開始因子 Cdt1 をはじめとする PIP デグロンを持つ PCNA 結合タンパク質の分解に関わり、DNA の再複製の抑制や DNA 損傷修復において重要な働きをしている。そのような制御のため、CRL4^{Cdt2} は、DNA 合成に伴い PCNA が DNA にロードされた場合にのみ素早く機能するように制御されているが、その機構の詳細は明らかでない。申請者は、Cdt2 の WD40 リピートよりなる N 末側領域のみでは、CRL4 と結合して複合体を形成できるが、低いユビキチン化活性しか持たないことから、C 末側領域に重要な部位が存在すると考え各種変異体 Cdt2 を作成して研究を行なった。欠失変異による解析により、活性化に 450-550 アミノ酸領域が重要であることを見出した。この領域は塩基性アミノ酸が多く DNA 結合性が予測され、この領域を含むタンパク質を精製し、DNA 結合性を持つことを発見した。そして、一本鎖 DNA にも強く結合することを見出した。ゲノム維持のため CRL4^{Cdt2} は、G1 期では働かず、S 期が開始して PCNA が DNA にロードされると機能するように制御されている。本研究は、このような CRL4^{Cdt2} の細胞周期進行に応じた活性の制御機構において、Cdt2 の DNA 結合部位が重要な働きをしていることを示す初めての成果である。

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 31 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。

主査：宮澤 淳夫



副査：吉久 徹



：西谷 秀男



：真木 寿治



(奈良先端科学技術大学院大学、教授)

：Eishi Noguchi 署名* _____

(Drexel University, USA,

Principal Investigator, Associate Professor)

*Noguchi 委員の審査結果については別紙（英文）として添付する。



DREXEL UNIVERSITY

College of
Medicine

Biochemistry and Molecular Biology

January 24, 2019

Review of Thesis Submitted by Muadz bin Ahmad Mazian, PhD candidate, University of Hyogo

CRL4^{Cdt2} plays an important role in the preservation of genomic integrity. CRL4^{Cdt2} functions as an ubiquitin ligase for several important proteins involved in cell cycle and DNA replication controls. These proteins include Cdt1, p21, and Set8, all of which contain the PIP box, which allows these proteins to bind PCNA, and subsequent ubiquitination by CRL4^{Cdt2}. In this thesis, the authors conducted functional analyses of the human Cdt2 protein, the substrate-recognition subunit of CRL4^{Cdt2}. Although the N-terminal region of Cdt2 is conserved among species, the Cdt2 C-terminal region is less conserved, and how this region regulates Cdt2 functions is not well understood.

To elucidate the role of the Cdt2 C-terminal region, the authors started their investigation by whether C-terminal deletion affects CRL4^{Cdt2} complex formation. Accordingly, the authors found that the C-terminal region is dispensable for complex formation. However, they found that the C-terminal region of Cdt2 is important for its activity to ubiquitinate Cdt1. To further investigate the role of the Cdt2 C-terminal region, the authors performed serial deletion analysis, which led to the identification of a 100 amino acid domain (450-551 aa) necessary for Cdt2 activity. Furthermore, using a variety of DNA-binding assays, including pull-down assay, EMSA, and chromatin fractionation, the authors found that this C-terminal domain is required for Cdt2 to bind DNA.

Overall, the experiments are done carefully, and necessary controls are included. The interpretation of the results is straightforward throughout the manuscript. The authors' conclusions are well supported by experimental data presented in this paper. In addition, the introduction is well written and contains important information as to how the authors were prompted to conduct the present studies. I feel that this paper describes an important finding as

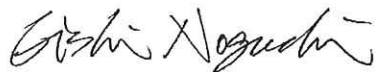
Mail Stop 497, 245 N. 15th Street, Philadelphia, PA 19102-1192. TEL 215.762.4902 FAX 215.762.4452

www.DrexelMed.edu

Drexel University College of Medicine is a separate not-for-profit subsidiary of Drexel University

to how ubiquitination activity of Cdt2 is regulated via DNA-binding, and how Cdt2 might be involved in genome maintenance is also well discussed, providing important insights into understanding of Cdt2 functions in genome maintenance mechanisms. Therefore, I enthusiastically support granting him a PhD degree based on his doctoral dissertation studies.

Sincerely,



Eishi Noguchi

Eishi Noguchi, Ph.D.

*Associate Professor, Department of Biochemistry & Molecular Biology
Director, Graduate Program in Molecular & Cellular Biology & Genetics*

Graduate School of Biomedical Sciences and Professional Studies
College of Medicine

Drexel University

245 N. 15th Street – MS 497, NCB 11319

Philadelphia, PA 19102

Tel: 215-762-4825 | Fax: 215-762-4452 | E-mail: enoguchi@drexelmed.edu