

明らかになった ATR の自己リン酸化 ～ATR 活性化指標の発見～

千葉大学薬学部薬学科 5年 森井 真理子

ATR Autophosphorylation as a Molecular Switch for Checkpoint Activation

Shizhou Liu, Bunsyo Shiotani, Mayurika Lahiri, Alexandre Maréchal, Alice Tse, Charles Chung Yun Leung, J.N. Mark Glover, Xiaohong H. Yang, and Lee Zou
Molecular Cell, 43, 192-202 (2011)

細胞が DNA 損傷を受けると、チェックポイント機構により細胞周期が停止し損傷部の修復が行われる。DNA 損傷応答と修復を担う重要な分子として、PI3K 関連キナーゼ (PIKK) ファミリーに属するセリン/スレオニンキナーゼである ATM、ATR、DNA-PKcs が知られている。ATM や DNA-PKcs は DNA 二本鎖切断応答に関与しており、一方 ATR は DNA 複製ストレスや DNA 損傷により露出した一本鎖 DNA (ssDNA) に結合し機能する。ATR は細胞の生存に必須であることから、主要なチェックポイント制御因子でありゲノム安定性の保持に寄与すると考えられている。また、ATM、ATR、DNA-PKcs はそれぞれ異なる DNA 損傷センサータンパク質によって制御されている。ATM は Mre11-Rad50-Nbs1 複合体に、DNA-PKcs は Ku70-Ku80 二量体により DNA 損傷部位にリクルートされ、自己リン酸化を伴って活性化する。一方、ATR は ATRIP と複合体を形成し、RPA が集積した DNA の一本鎖領域 (RPA-ssDNA) を認識し結合するが、ATR の十分な活性化には Rad17、9-1-1 複合体、TopBP1 といった他の分子の寄与が必要である。しかし、RPA-ssDNA において ATR がどのように活性化されるか、ATR がどのようにして基質を認識しシグナル伝達を行うかについては未解明の部分が多い。今回筆者らは ATR 活性化の起点と考えられる自己リン酸化部位として ATR の 1989 番目スレオニン残基 (Thr1989) を同定し、ATR 活性化と下流へのシグナル伝達機構の一端を見出した。

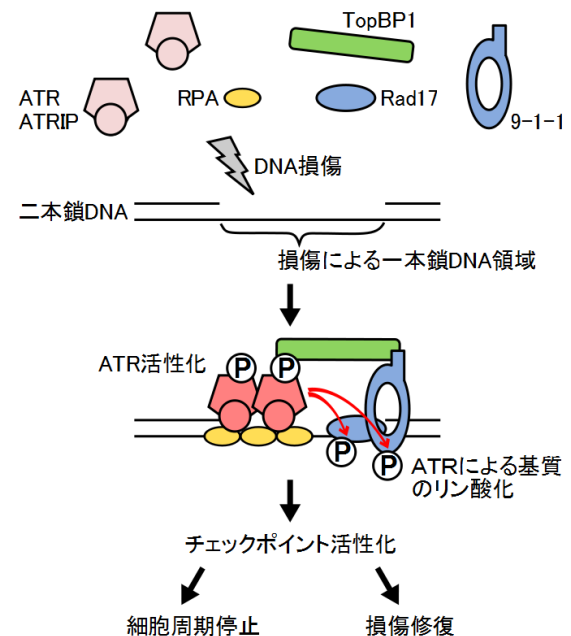
筆者らは ATR の活性化に関わる分子機構を解明することを目的とし、ATR の活性化を反映するリン酸化部位を同定することを試みた。まず DNA 損傷によって活性化した ATR を精製し、質量分析法を用いて ATR のリン酸化部位を複数個所同定した。このうち FAT ドメインという PIKK に保存された重要な領域に存在する部位が Thr1989 であった。筆者らは Thr1989 に対する特異抗体を作製し、この抗体を用いて紫外線、電離放射線、ヒドロキシウレアによる DNA 損傷に応じて Thr1989 のリン酸化が検出できること、ならびに Thr1989 のアラニン置換体 (TA 置換体) ではリン酸化が消失することを示している。次に ATR Thr1989 のリン酸化が機能的に重要かどうかについて検証した。*in vitro* では TA 置換体では野生型と同様にキナーゼ活性を保持しているにも関わらず、*in vivo* では基質である Chk1、Rad17 のリン酸化は低下していることがわかった。また、TA 置換体発現細胞では細胞増殖能が見られないことから Thr1989 が重要なリン酸化部位であることが示された。

続いて、ATR Thr1989 がどの分子によってリン酸化されるかについて調べた。PIKKファミリーの阻害剤である Caffeine 処理を用いたところ Thr1989 のリン酸化の低下が見られた。ATM、DNA-PKcs それぞれに対する特異的阻害剤の処理ではリン酸化に差は見られないことから、ATR Thr1989 のリン酸化には ATR 自身が必要であることが示唆された。そして *in vitro* において ATR が Thr1989 を直接リン酸化していることを見出した。さらには、キナーゼドメインを欠損させた ATR が全長の ATR にリン酸化されることから、ATR Thr1989 のリン酸化が ATR 分子間で起こることを示した。また、RPA ノックダウンによって Thr1989 のリン酸化が消失することから、ATR-ATRIP 複合体の RPA-ssDNA へのリクルートが Thr1989 のリン酸化に必要であることが示唆された。

ところが、Thr1989 の疑似リン酸化体において DNA 損傷非存在下では下流へのシグナル伝達が起こらなかった。そのことから、ATR の機能には Thr1989 のリン酸化だけでは不十分であると考えられた。そこで、ATR 活性化分子である TopBP1 と ATR Thr1989 の関連について検証した。TopBP1 は ATR と結合し、ATR の下流へのシグナル伝達に寄与すると考えられている。TopBP1 をノックダウンもしくは ATR との結合部位を欠損した場合には、ATR Thr1989 はリン酸化されたが下流の基質である Chk1 や Rad17 のリン酸化は抑制された。さらに、ATR の TA 置換体では TopBP1 との結合が見られなかった。このことから、ATR Thr1989 のリン酸化は TopBP1 との相互作用の上流にあり、Thr1989 のリン酸化を介して ATR と TopBP1 が結合することを明らかにした。

今回の論文では、(1) ATR Thr1989 が DNA 損傷後に ATR により分子間で自己リン酸化されること (2) ATR の下流へのシグナル伝達には ATR Thr1989 のリン酸化を介した ATR と TopBP1 の相互作用が必要であるという

ことがわかった。ただし、ATR の分子内でのリン酸化が起こるかについての答えはでていない。また、Thr1989 の次のアミノ酸残基はプロリンであり、ATR が Thr-Pro 配列を認識することが明らかとなった。既知の PIKK 認識配列は Thr-Gln もしくは Ser-Gln 配列であることから、Thr1989 のリン酸化により基質の選択性が変化している可能性についても興味深い。さらには、DNA 損傷後の Thr1989 のリン酸化は Chk1 のリン酸化消失後も持続していたことから、ATR はチェックポイントの活性化以降においても何らかの機能を有していることが考えられる。今回明らかになった ATR の自己リン酸化部位は、今後チェックポイント機構に関わる ATR やその上流分子の機能解析において重要な指標となることだろう。



ATR自己リン酸化に依存したチェックポイント活性化のモデル
 (1) ssDNAにRPAが結合することで、ATR-ATRIPやTopBP1、Rad17、9-1-1複合体がリクルートされる。(2) RPA-ssDNA上でATRはThr1989を自己リン酸化する。(3) ATRはThr1989リン酸化依存的にTopBP1と結合する。(4) TopBP1との結合により、ATRはRad17、9-1-1といった基質を効率よく認識し、下流へのシグナル伝達を行う。