

学 位 審 査 報 告 書

(ふりがな) 氏 名	はなふさ とも 花房 朋
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 号
学位授与の日付	平成 年 月 日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科 生物科学 専攻
(学位論文題目) 3V7 及び MAD2 タンパク質が結合するモチーフ配列の解析	
論文調査委員	(主査) 大森 治夫 准教授 大野 睦人 教授 森 和俊 教授

理 学 研 究 科

(続紙 1)

京都大学	博士 (理 学)	氏名	花房 朋
論文題目	REV7 及び MAD2 タンパク質が結合するモチーフ配列の解析		
(論文内容の要旨)			
<p>損傷乗り越え DNA 合成 (translesion DNA synthesis, TLS) に関わるヒト DNA polymerase ζ (hPolζ) は、触媒サブユニットの hREV3 と補助サブユニットの hREV7 の 2 つのサブユニットから成る。hREV7 タンパク質は hREV3 の他にも、TLS で機能する hREV1 や、TLS 以外の機能を果たす ADAM9 (A Disintegrin And Metalloprotease 9) あるいは ELK-1 (an Est-Like transcriptional factor-1) などのタンパク質とも相互作用することが知られている。hREV7 は spindle assembly checkpoint (SAC) に関わる hMAD2 と 26% のアミノ酸相同性を持つことから hMAD2L2 と呼ばれる。hMAD2 は hMAD1 あるいは hCDC20 と相互作用することで SAC において重要な機能を果たすことが明らかになっているが、hREV7/hMAD2 は hCDC20 の構造的、機能的ホモログである hCDH1 と相互作用することによって SAC にも関与すると考えられている。</p> <p>本研究において私は、hREV7/hMAD2L2 及び hMAD2 の結合パートナーとの相互作用をアミノ酸レベルで明らかにした。その結果、hREV3 の全長 3130 アミノ酸配列のうちの 1878-ILKPLMSPP-1885 の配列が hREV7 との相互作用に必要な十分であることが明らかになり、最小コア配列 (minimum core sequence, MCS) と呼ぶことにした。hADMA9 や hELK-1 の hREV7 結合領域にはそのような REV3 の MCS に類似した配列が存在するが、それらの MCS 類似配列は hREV7 との結合能が低く、MCS 類似配列の C 末端側の数個のアミノ酸の配列が hREV7 との相互作用には必要であった。意外なことに、hMAD2 もまた hREV3 の MCS 配列に結合することが明らかになった。しかし、hMAD2 は ADAM9 や ELK-1 に存在する hREV7 結合配列とは結合せず、また hREV7 は hMAD1 や hCDC20 の hMAD2 結合配列と結合しなかった。そこで、hREV7 及び hMAD2 の結合特異性について <i>in vitro</i> での詳細な解析を行ったが、hMAD2 が <i>in vivo</i> で全長の hREV3 に結合するという結果は得られなかった。また、hREV7 が hCDH1 と相互作用するという結果は得られなかった。</p> <p>出芽酵母、分裂酵母の REV3、REV7、MAD2 の間での相互作用についても解析した。それらの REV3 の REV7 結合配列を同定したところ、hREV3 MCS 同様の短い配列には同じ種の MAD2 が結合したが、その前後の配列が存在すると結合しなくなった。このように、結合モチーフ配列の存在と全長のタンパク質の間での結合とは別な問題であると言える。本研究の結果は REV7 と MAD2 とは構造的に類似している所以他们の結合モチーフ配列はオーバーラップしているが、hREV7 は TLS において、そして hMAD2 は SAC において別個に機能しており、両者の作用の「クロストーク」の可能性は低いと考えられた。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

DNA 損傷を乗り越えて合成する TLS DNA ポリメラーゼとしては構造的に類似して Y-family と分類される REV1, Pol η , Pol ι , Pol κ の他に、それらとは異なり B-family に分類される Pol ζ が知られている。Y-family の酵素は一つのサブユニットから成るのに対して、Pol ζ は触媒活性を持つ REV3 と補助因子の REV7 の二つのサブユニットから構成される。これらの TLS DNA ポリメラーゼは異なる種類の DNA 損傷のバイパス合成に関わると考えられているが、Pol η , Pol ι , Pol κ 、及び Pol ζ は REV7 サブユニットを通じて REV1 の C 末端領域に結合することから、それらのタンパク質間で REV1 を中心とするネットワークが存在することが明らかになっている。一方、REV7 は DNA 損傷乗り越え合成以外の機能に関わる ADAM9 や ELK-1 などのタンパク質とも相互作用することが報告されている。取り分け、hREV7 はスピンドルチェックポイントに関わる MAD2 とアミノ酸配列において 26% の相同性を持つことから hMAD2L2 とも呼ばれ、hMAD2 が hCDC20 と結合するように、hREV7/hMAD2L2 は hCDC20 のホモログである hCDH1 と結合することにより、hREV7 もスピンドルチェックポイントに関わるという報告もある。従って、hREV7/hMAD2L2 が様々なタンパク質とどのように相互作用するかを明らかにすることは非常に重要な研究課題であった。

本研究によって、hREV7 は hREV3 の中央部分の 9 アミノ酸の配列に結合し、それに類似した配列が ADAM9 や ELK-1 の hREV7 結合領域にも存在することが明らかになった。そのような配列は hMAD2 が結合する hCDC20 の配列とも類似性が認められたが、hREV7 は hCDC20 そして hCDH1 とも相互作用しなかった。一方、hMAD2 は ADAM9 や ELK-1 の hREV7 結合領域には結合しなかったが、hREV3 の hREV7 結合配列に結合することが明らかになった。そして、数多くの変異体を作成して、それらと hREV7, hMAD2 との結合を定量的に解析することにより、同じアミノ酸配列中の異なるアミノ酸残基との相互作用が hREV7、hMAD2 との結合に重要であることが分かった。

hMAD2 が hREV3 の短い配列に結合するが、hREV3 のより長い配列や全長のものに結合するという結果は得られなかった。そこで、REV3 がスピンドルチェックポイントに関与するかどうかを明らかにするためにも、出芽酵母や分裂酵母における REV3, REV7, MAD2 タンパク質間の相互作用についても解析を進めた。その結果、それらの MAD2 もまた REV7 が結合する REV3 の短い配列に結合するが、その N 端側の配列が存在すると MAD2-REV3 間の相互作用は阻害されることが明らかになった。異なる生物種においても REV7 と MAD2 とは比較的弱い相同性を持つが、他のタンパク質との相互作用に関わるアミノ酸は良く保存されており、それらの結合認識配列には共通性が見られる。しかし、REV7 と MAD2 のそれぞれが DNA 損傷乗り越え合成とスピンドルチェックポイントという異なる機能を果たすために、相互作用のクロストークの可能性は低いという結論が得られた。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認める。また、平成 22 年 1 月 20 日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認めた。