

氏名	江 刺 史 子
学位(専攻分野)	博士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2225 号
学位授与の日付	平成 12 年 3 月 23 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	DNA 損傷チェックポイントに必須な分裂酵母 Crb 2 の研究

論文調査委員 (主査) 教授 柳田充弘 教授 米原 伸 教授 平野丈夫

### 論 文 内 容 の 要 旨

細胞は DNA 複製に異常があるときや DNA に損傷があるとき、複製や DNA 修復を行うために細胞周期を一時的に停止させる機構を備えている。この機構すなわち細胞周期チェックポイントは、細胞がゲノムを安定に維持するために必須な役割を担う。本研究では、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* をモデル生物として、チェックポイント機構の分子制御メカニズムを明らかにすることを目的とした。

本研究では、細胞周期チェックポイントに必須な BRCT モチーフタンパク質 Crb 2 の機能解析を詳細に行った。まず *crb 2*<sup>+</sup> 遺伝子破壊株の詳細な解析を行い、Crb 2 が DNA 損傷チェックポイントと DNA 複製装置の異常によるチェックポイントを活性化して細胞周期を停止させるのに必須な因子であることを突き止めた。Crb 2 はもともと複製と複製チェックポイントに必須な Cut 5 と直接相互作用するタンパク質として分離されたタンパク質である。Cut 5 と Crb 2 の機能を比較検討することにより、Crb 2 と Cut 5 が細胞周期チェックポイントを活性化する上で、それぞれ異なる機能を担いながら、かつ重複した機能を担っていることを見出した。さらに、Crb 2 が細胞周期と DNA 損傷に依存してリン酸化を含む修飾を受けていることを示し、そのリン酸化部位の一つとして Cdc 2 標的部位 T 215 を同定した。T 215 リン酸化ペプチド抗体を用いた詳細な解析を行い、T 215 部位が正常な細胞の細胞分裂期中期および DNA 損傷に反応してリン酸化されることを見出した。特に、T 215 部位が DNA 損傷に反応して 2 度にわたってリン酸化されることを明らかにした。すなわち、DNA 損傷を与えた直後の弱いリン酸化、およびチェックポイント停止後の後期の強いリン酸化である。T 215 がリン酸化されない T 215 A 変異体は、チェックポイントを活性化して細胞周期を停止させることはできるが、損傷 DNA の修復が完了しても細胞周期を再開しなかった。T 215 部位は、実際に Cdc 2 キナーゼによってリン酸化される。このことから、Crb 2 の T 215 が Cdc 2 によってリン酸化されることがチェックポイント停止を解除するために必須であることを示した。すなわち、Cdc 2 がチェックポイントに対して拮抗的な役割を果たしているといえる。Cdc 2 の活性はチェックポイントによって抑制されるという今までの概念に照らすと、Cdc 2 がチェックポイント制御に積極的な役割を担っていることを示したことは、チェックポイント研究に新しい一石を投じた発見といえよう。

本研究の過程で、Crb 2 は損傷チェックポイントの活性化と不活性化に必須な因子であることが明らかになった。しかし、Crb 2 が具体的にどのような分子機構でチェックポイント制御に寄与しているかについての知見は乏しい。進化的に保存されたチェックポイントキナーゼ Chk 1 および Rad 3 と密接に相互作用することから、Crb 2 はチェックポイント経路で中心的な役割を担っていると思われる。本研究で得られた結果を踏まえて、Crb 2 がどのような制御を受けて、どのような分子機構でチェックポイントに関わるのかについて考察する。さらに、DNA 損傷に伴って起こる DNA 修復やアダプテーションといった事象に Crb 2 が関わる可能性についても考察する。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

ゲノムを正常に維持するための細胞周期チェックポイントの制御機構を理解することは、重要かつ必須な課題である。申

請者は、分裂酵母における細胞周期チェックポイントの作用機構の解析をおこない、この課題に重要な知見をもたらした。分裂酵母の新規遺伝子  $crb2^+$  を単離し、Crb 2 が損傷チェックポイントと複製装置異常における複製チェックポイント活性化に必須であることを明らかにした。さらに、Crb 2 がリン酸化による制御を受けていることを明らかにし、そのリン酸化部位の一つとして Cdc 2 標的的部位 T 215 を同定した。Cdc 2 による T 215 部位のリン酸化は、チェックポイントの解除に必須であることを示した。Crb 2 は、複製と複製チェックポイントに必須な Cut 5 タンパク質、チェックポイントキナーゼ Chk 1、および Rad 3 キナーゼと相互作用することを示し、Crb 2 がチェックポイント活性化のみならずチェックポイント解除や DNA 損傷修復といった多様な機能を担う可能性について考察している。

申請者は、一貫して Crb 2 の機能解析を通じてチェックポイント活性化の分子機構を明らかにすることを目的として研究を進めている。特に、Crb 2 の解析にもとどまらずチェックポイント全般の理解を深めようとする申請者の積極的な姿勢がうかがわれる。第一に、Crb 2 の複製装置異常およびヌクレオチド枯渇という 2 つの複製障害に対する応答の差を見出し、複製チェックポイントには複製装置の異常によって活性化されるものとヌクレオチドプールの枯渇によって活性化されるものの 2 つの範疇があるという結論を導き出した。第二に、Crb 2 の Cdc 2 によるリン酸化がチェックポイント解除に必須であることを見出し、チェックポイントの標的であると考えられてきた Cdc 2 キナーゼがチェックポイントの制御に積極的に関わることをしめした。これら結論はともに、いままでの既成の概念にとらわれない発想で研究を進めてきた結果導き出されてきた新しい知見であり、特に評価するところがある。

申請者はさらに、Crb 2 が進化的に保存されたキナーゼ Chk 1 および Rad 3 と直接相互作用することを示しており、Crb 2 がチェックポイント制御において極めて重要なタンパク質であることが予想される。また、Cut 5 との相互作用に着眼し Crb 2 がチェックポイント機能のみならず損傷修復に関わる可能性についても示している。チェックポイントタンパク質がどのようにチェックポイントシグナルを認識し、損傷修復を行い、チェックポイントの解除がなされるのかについては、チェックポイント制御を理解するために明らかにしていかなければならない課題である。この点に関して申請者は広い視野を保ちつつ明らかにすべき問題点を具体的に提示している。Crb 2 の機能および分子制御機構をユニークな発想で考察しており、今後の解析が期待できる。

以上、本研究で得られた成果は十分な解析に裏打ちされたものであり、細胞周期チェックポイント制御機構の理解に大きく寄与するものであると思われる。よって、本論文は理学博士の学位授与に値すると認める。なお、主論文について報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について諮問した結果、合格と認めた。