

(論文内容の要旨)

染色体上の遺伝情報を正確に娘細胞に継承することは、形態形成、及び生命の維持に必須である。このために生命は、分裂期においては姉妹染色分体の分配を保障し、また、間期においてはDNA損傷による遺伝情報の欠失を防ぐ機構を備えている。生物種間で保存されたコヒーシン複合体は、姉妹染色体をつなぎ止めることにより効率的なDNA損傷修復を促進し、分裂期までその接着を維持することでゲノムの安定性の維持に寄与しているタンパク質複合体である。本研究では分裂酵母を用いて、コヒーシン複合体因子の一つである Rad21 が高度にリン酸化されていることに注目し、このリン酸化の意義を解明することを目的として行った。

本研究ではまず、Rad21 のリン酸化部位の同定からアプローチすることとした。Rad21 は非同調条件下でも高度にリン酸化されているが、DNA損傷に応じて更に高度にリン酸化されることがわかったため、非同調、分裂期、DNA損傷後の細胞より Rad21 を回収することで質量分析によりリン酸化部位を同定した。これらの部位に対するリン酸化抗体を作製するとともに、アミノ酸置換を行った遺伝子組み込み体を作製することで機能解析を試みた。その結果、Rad21 は細胞の様々な状況に応じて異なるリン酸化制御を受けていることが明らかになった。まず、DNA損傷時には姉妹染色体を持つ複製後の細胞において Rad3/ATR 依存的に S553 を含むリン酸化を受けることがわかった。興味深いことにこのリン酸化はDNA損傷、およびチェックポイントタンパク質のリン酸化に比べ、かなり遅い時期に起こっていた。また、非リン酸化型変異体はセパレーズ変異体と遺伝的相互作用を示し、実際、セパレーズによる切断を受けにくいことがわかった。以上の結果からDNA損傷後の Rad21 のリン酸化は損傷修復後のセパレーズによるコヒーシンの除去に関わるのではないかと考えられる。次に、Rad21 は分裂期特異的にポロキナーゼと思われるキナーゼによりリン酸化されていた (S242)。ポロキナーゼリン酸化部位を置換した非リン酸化型 *rad21* 変異体はセパレーズ-セキュリン変異体と合成致死となり、また、リン酸化型の変異体はコヒーシンの染色体上への局在化に必要な *mis4*, *swi6* 変異体と合成生育阻害を示した。これに加えてリン酸化型変異体は染色体への結合能が減退していた。従って、分裂期における Rad21 はコヒーシンの解離、及びセパレーズによる切断を制御していると考えられる。このほかにもS期においてCdkに依るリン酸化を受けること (T147)、また、姉妹染色体のないG0期においても高度なリン酸化を受けていること (S165, S507) を示した。

以上の結果より、本研究では Rad21 が細胞の様々な状況下において異なるリン酸化制御を受け、その状況に応じた適切な機能に対応していることが示唆された。コヒーシンの役割は分裂期における姉妹染色分体の分配のみならず、DNA損傷修復、さらには転写制御と広範に及ぶため、それぞれの状況に応じた役割がリン酸化により制御されていると考えている。本研究はこれらのリン酸化の詳細な仕組み、およびその機能についての潜在的な重要性を示唆しており、今後、これらの研究結果を土台として更なるコヒーシンの複雑な制御機構が明らかにされることを期待している。

(論文審査の結果の要旨)

正確な遺伝情報の伝達における重要な担い手であるコヒーシン複合体の制御について、リン酸化修飾によるその挙動の制御という側面からアプローチした仕事である。申請者はまず、分裂酵母においてコヒーシン複合体の一つである Rad21 タンパク質が高度なリン酸化修飾を受けていること、更に DNA 損傷後、Rad21 が更なるリン酸化を受けることから、細胞の様々な状態に応じてコヒーシンの機能がリン酸化によってコントロールされている可能性を考えた。その機能的意義に迫るため、まず、分裂酵母より Rad21 タンパク質を精製し、質量分析によってそのリン酸化部位を同定することから始めた。次にその中から適当な部位に対してリン酸化抗体を作製し、様々な条件下で Rad21 のリン酸化状態を調べた。中でも DNA 損傷後の Rad21 のリン酸化について、重点的に研究を行った。

まず、DNA 損傷応答において中心的な役割を果たす Rad3/ATR キナーゼが DNA 損傷後の Rad21 に対するリン酸化に寄与していることを確認した。Rad3/ATR による Rad21 に対するリン酸化の生理的意義に迫るため、このリン酸化部位を非リン酸化型に置換した変異体を作製した。この変異体は DNA 損傷に対しては全く感受性を示さなかったことからこのリン酸化は既知の DNA 損傷チェックポイントや損傷修復には関わっていないということが考えられる。次に遺伝的相互作用を調べることにより、セパレーズ変異体と非リン酸化型 *rad21* 変異体の間に遺伝的相互作用が見られた。これにより Rad3 によるリン酸化とセパレーズによる切断に関係があることが示唆された。更に細胞を同調することにより、実際、セパレーズによる Rad21 の切断がリン酸化に依存して促進されることが示された。最後に、損傷後、どの時期に Rad21 のリン酸化が起こるのか調べたところ、チェックポイント因子や損傷修復に関わる因子がリン酸化されるよりずっと遅い時期、恐らくチェックポイントによる細胞周期停止から再び細胞周期へと復帰する時期にピークを迎えていると考えられる。以上の結果から DNA 損傷後、Rad3/ATR キナーゼが Rad21 のリン酸化をすることで、その後の分裂期における姉妹染色体分体の分配を促進する過程を円滑に行うことが出来るのではないかというモデルを提示している。本研究は DNA 損傷応答と分裂期における染色体分配という二つの現象を結びつける重要な結果であり、十分な評価に値する。

本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものとして認めた。

平成 20 年 3 月 12 日、論文内容とそれに関連した試問の結果、合格と認めた。