

氏 名	もち だ さとる 持 田 悟
学 位 の 種 類	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 3 号
学位授与の日付	平成 16 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	生 命 学 研 究 科 統 合 生 命 学 専 攻
学位論文題目	DNA 損傷チェックポイントの二つのキナーゼと相互作用する Crb2 の研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 柳 田 充 弘 教 授 竹 安 邦 夫 教 授 松 本 智 裕

論 文 内 容 の 要 旨

正確に複製された遺伝情報を娘細胞に確実に伝達することは、細胞の安定な増殖にとって重要である。そのため細胞は DNA に異常があるときには、それ以上細胞周期を進行させない DNA 損傷／複製チェックポイントというシステムを持っている。申請者は分裂酵母 Crb2 タンパク質のチェックポイントシグナル伝達系におけるはたらきを詳細に解析した。まず Crb2 に緑色蛍光タンパク質を融合することでその細胞内局在が細胞周期を通じて核クロマチン領域であることを明らかにし、そして Crb2 部分欠失シリーズの解析によりそのアミノ末端領域がクロマチン領域局在に、中央領域が核局在に十分であることを示した。一方で、カルボキシ末端の BRCT モチーフ (BRCA1 C-terminal) を含む領域はタンパク質の細胞内局在には必要ないにも関わらずチェックポイント機能には必須であり、この領域の断片タンパク質は野生型細胞の紫外線感受性を高めるという結果を得た。この BRCT 領域は Crb2 のなかで唯一ヒトまで保存性を持つ領域であったことから、その機能を解明することは生物種を越えて重要な意味を持つと考えられた。そこでこの領域の機能を解析したところ、驚いたことに Crb2 がこの領域で ATM (毛細血管拡張性失調症の原因変異遺伝子) / ATR キナーゼファミリーの Rad3 と物理的に相互作用していることを見出した。そしてこの相互作用は DNA 損傷に応答して解消すること、その解消が Rad3 キナーゼ活性に依存しないことを明らかにした。さらに興味深いことにその相互作用の解消は Crb2 分子側の変化の結果であり、in vitro の実験系は BRCT 領域が Rad3 キナーゼ活性を抑制することを示した。これより Crb2 が Rad3 の活性を制御する因子であるというモデルを示すとともに、Crb2 が DNA 損傷を独自に感知している可能性をも示唆した。また Crb2 が DNA 複製と複製チェックポイントに必須な Cut5, DNA 損傷チェックポイントに必須な Chk1 キナーゼとも分裂酵母細胞内で物理的に相互作用していることを初めて示した。これら二つの相互作用とも DNA 損傷後に一時的に増強することを詳細な時間経過を追うことで明らかとし、特に Chk1 と相互作用するのは DNA 損傷後に現れる高リン酸化型 Crb2 のみであった。そしてここまで述べてきた三つの相互作用の変化が細胞周期の停止－再開のタイミングと密接な相関があることも示している。以上の結果から、Crb2 がこれら複数のチェックポイント因子どうしをつなぐ仲介因子であることを、他に先駆けて分子レベルで説明するモデルを提示した。このモデルと合致するように Crb2 の変異体では Chk1 の活性化が起こらないことを Chk1 のキナーゼ活性を直接測定することで示し、さらに上流の Rad3 による下流の Chk1 のリン酸化が全く起こらないことを抗リン酸化ペプチド抗体を用いることで示した。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

DNA 損傷／複製チェックポイントは細胞周期制御研究の主要な一分野である。それは親細胞が娘細胞に遺伝情報を正確に伝達するため DNA の状態を随時監視し、異常がある場合には細胞周期を止め問題解決の時間を稼ぐというものである。近年、多くのガン化細胞でチェックポイントの異常が見つかったことから、医学的にみてもこの分野の重要性が明らかとされている。チェックポイントのシグナル伝達は主にタンパク質キナーゼが担っていることは明らかとされていたが、そ

の他に仲介因子 (Adaptor/Mediator) と呼ばれるタンパク質が見つっている。しかしながらこれらはシグナル伝達における必須性は明らかであったものの、その分子的な機能はほとんど解明されていなかった。申請者はその一つである分裂酵母 Crb2 タンパク質がいかにしてシグナル伝達の上流と下流をつなぐ役割を果たしているかを明らかにした。その中で Crb2 が ATM/ATR キナーゼファミリー Rad3 の制御因子である可能性を示したことは、これまで他の仲介因子では報告されていなかった新規の活性であり重要な知見である。その上 ATM/ATR キナーゼファミリーが多くのチェックポイント因子を直接的、もしくは依存的にリン酸化する一方で、その制御機構はほとんど知られていなかっただけにその点でも重要な発見であると考えられる。さらにその解析過程での Crb2 の BRCT モチーフを含む領域が Rad3 相互作用ドメインであるという発見は、BRCT モチーフが DNA メタボリズム関連のタンパク質で多く見つっていることから、Crb2 のみならずほかの多くの BRCT タンパク質の研究にも刺激を与えることが期待される。Crb2 が分裂酵母細胞内でさらに Chk1 キナーゼと DNA 損傷に応答してダイナミックな物理的相互作用を示したことは Crb2 が上流 (Rad3)・下流 (Chk1) 双方と DNA 損傷に応答して相互作用を変化させるということであり、シグナル伝達の仲介者としての機能を想像させるに十分な結果であった。また一方でこれまでチェックポイント研究がその活性化メカニズムに主眼が置かれていたことに対し、Crb2 と DNA 複製に必須な Cut5 タンパク質との相互作用は DNA 修復の進行と細胞周期制御の調和という側面を分子的に結びつけている重要な発見と考えられ、今後のさらなる解析が待ち望まれる。本論文の結果によって Crb2 は他の多くの仲介因子と考えられている分子の中で最もタンパク質間相互作用の理解が進んだ分子となった。そしてそれはこれまでの仲介因子の「シグナル伝達に必須である」という抽象的な位置づけを、「複数のタンパク質と異なるドメインで相互作用することでシグナル伝達を促進する」という物理的レベルの理解にまで進めたことは高く評価できる。

以上より本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。なお、平成16年1月26日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。