

《農芸化学奨励賞》



ゲノム安定化維持に必要な DNA 複製チェックポイント機構に関する研究

関西学院大学理工学部生命科学科 助教授 田 中 克 典

細胞周期は遺伝子情報を複製して分配する順序だったシステムであり、そのエラーにより細胞の死や、逆に細胞の不死化(がん化)に陥って個体の死を招く危険がある。特にある事象が不完全なうちに、次のステップに進んでしまうことは非常に危険である。そこで、前のステップが完了しないと次のステップへ進行できなくなるようなメカニズムが働いており、これをチェックポイントと呼ぶ。複製チェックポイントをはじめ、細胞周期チェックポイントは、センサー、トランスデューサー、エフェクタータンパク質の働きによるシグナル伝達ネットワークから形成されている。

ゲノムを安定に維持するためには、真核細胞は細胞分裂の度に正確な DNA 複製や染色体分配を行わなければならない。しかし細胞は、放射線や化学物質など細胞内外に存在する DNA 損傷因子により常に危険な状態にさらされている。DNA 複製装置であるレプリソームは、S 期において染色体 DNA を複製しながら移動するが、損傷因子によって損傷を受けた DNA 領域に到達するとその運動を停止し、しかるべき修復を待つ。このとき、複製チェックポイントと呼ばれるシグナル伝達が活性化し、別の複製起点での新たなレプリソームの形成や細胞周期の進行が抑制される。同時に、複製チェックポイントは、複製フォークの停止と、停止した複製フォークの安定化に寄与する。このチェックポイントが正常に働かない場合、染色体 DNA に変異が蓄積し、がん化が誘発される。しかし、複製チェックポイントがどのような分子機構で複製フォークの安定化とチェックポイントの活性化を実現しているのか解き明かされるべき謎は多い。

本研究では、分裂酵母をモデル生物として、DNA 複製チェックポイントにおいて、DNA 複製障害により発生したシグナ

ルをエフェクター分子へ選択的かつ効率的に伝達するのに必須な新たな仲介因子(メディエーター) Mrc1 を同定し、その機能を分子レベルで詳細に解き明かした。

1. ATM 様キナーゼによる下流エフェクター分子の制御機構の解明

DNA 複製チェックポイントシグナル伝達経路は、大きく分けて次の四つの素過程、1)DNA 複製障害や DNA 損傷などの異常を検知するセンサー、2) 検出された異常をターゲットに伝えるトランスデューサー、3) チェックポイントへの作用を直接行うエフェクター、4) チェックポイントシグナルが最終的に作用するターゲット、から構成されている。これらの因子の多くは、放射線や DNA 損傷を引き起こす薬剤に高感受性を示す変異体の解析から発見された(表)。

ATM 様キナーゼは、あらゆる真核生物の DNA 損傷および複製チェックポイントにおいて中心的な役割を果たすリン酸化酵素である。ATM はヒト遺伝病毛細血管拡張性運動失調症(ataxia-telangiectasia)の原因遺伝子である。分裂酵母では、ATM 様キナーゼである Rad3 が発生したシグナルの種類に応じて2種類のチェックポイント(Chk1 キナーゼをエフェクターとした損傷チェックポイントと、Cds1 キナーゼをエフェクターとした DNA 複製チェックポイント)を選択的かつ特異的に制御する。しかし、そのメカニズムに関してほとんど未解明であった。そこで、Rad3 による Cds1 および Chk1 のリン酸化部位の決定を行った。その結果、DNA 複製異常に応答して Rad3 が Cds1 の Thr11 を、一方 DNA 損傷に応答して Rad3 が Chk1 の Ser365 を直接リン酸化することで、Rad3 が2種類のエフェクターキナーゼを効率的に使い分けていることを明らかにした。

表 DNA 複製および損傷チェックポイント因子の対応表

ヒト	分裂酵母	出芽酵母	特徴
ATR	Rad3	Mec1	PI3 キナーゼファミリー
ATRIP	Rad26	Ddc2	ATR 制御サブユニット
ATM	Tel1	Tel1	PI3 キナーゼファミリー
Rad17	Rad17	Rad24	RFC 様複合体 (チェックポイントクランプローダー)
Rad1	Rad1	Rad17	PCNA 様複合体 (チェックポイントクランプ)
Rad9	Rad9	Ddc1	
Hus1	Hus1	Mec3	
Tim1	Swi1	Tof1	FPC (フォーク保護複合体)
Tipin	Swi3	Csm3	
53BP1	Crb2	Rad9	メディエーター, BRCT ドメイン
Claspin	Mrc1	Mrc1	メディエーター, coiled-coil ドメイン
Chk1	Chk1	Chk1	セリン/スレオニンキナーゼ
Chk2	Cds1	Rad53	セリン/スレオニンキナーゼ, FHA ドメイン

表の中で、主に複数チェックポイントで働く因子群を網掛けで示した。

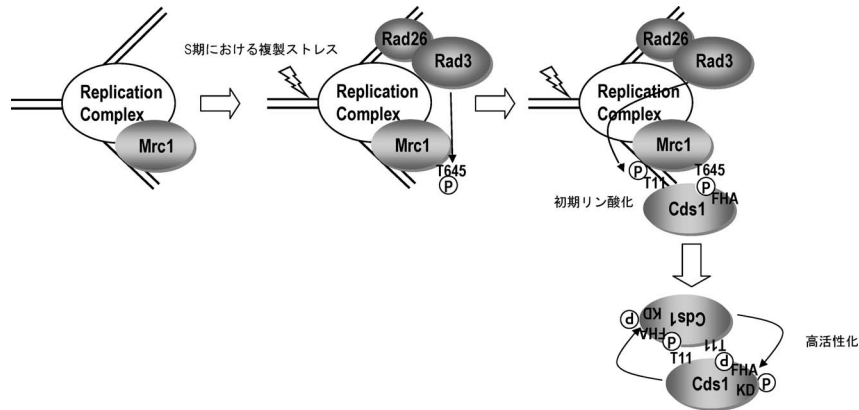


図1 分裂酵母におけるメディエーター Mrc1 依存的な Cds1 の活性化モデル

## 2. 複製チェックポイント特異的に働くメディエーター Mrc1 の発見

Chk1, Chk2 キナーゼは、活性化された ATM, ATR により直接リン酸化・活性化され、その下流の細胞周期制御因子にシグナルを伝達する。ATM, ATR がいかんして発生したシグナルの種類を識別し、Chk1, Chk2 キナーゼを区別してシグナルを伝達しているかについては長らく謎であった。分裂酵母では Rad3 が G2 期における DNA 損傷に応答して Chk1 を、一方 S 期での DNA 損傷や複製フォーク障害に対しては Cds1 をそれぞれリン酸化・活性化することで細胞周期の停止を行う。そこで、DNA 複製チェックポイント情報伝達の特異性を規定する仲介因子の存在を仮定した。仮定した因子を同定するために、遺伝学的スクリーニング系を考案し、DNA 複製障害が発生してもエフェクター Cds1 に情報伝達が起こらない変異株の単離に成功した。変異原因遺伝子を同定した結果、この因子は S 期に特異的に発現しており、まさに DNA 複製障害部位からエフェクターへの情報伝達を特異的に仲介する分子そのものであった。この因子を“Mrc1 (Mediator of replication checkpoint 1)”と命名した。

Mrc1 は S 期特異的に発現し、DNA 複製障害に応答した Cds1 のリン酸化・活性化に必要な因子である。出芽酵母でもほぼ同時期に、DNA 複製チェックポイントにおいて Rad53 の活性化に必要な因子として Mrc1 が見いだされた。両酵母の Mrc1 はタンパク質レベルでの相同性は比較的低いものの、機能的ホモログであるといえる。一方、アフリカツメガエルの系で、リン酸化型 Chk1 と結合する分子として Claspin が同定された。Claspin は広く脊椎動物間で保存されており、DNA 複製フォークの停止による ATR 依存的な Chk1 の活性化に必要であり、酵母 Mrc1 と同様に DNA 複製チェックポイントのメディエーターとして機能することが報告されている。

この Mrc1 の発見により、Cds1 をはじめとする真核生物の複製チェックポイントエフェクターキナーゼの S 期特異的な活性化を規定する分子機構の謎を解き明かすことに成功した。

## 3. 複製チェックポイントメディエーター Mrc1 の機能の分子レベルでの解明

それでは、DNA 複製チェックポイントシグナル伝達経路において、どのような分子機構で複製チェックポイントメディエーターが機能しているのだろうか。まず、DNA 複製異常に応答して、Rad3 キナーゼが Mrc1 をリン酸化制御することを見いだした。Mrc1 は Rad3 により Ser604 と Thr645 の 2 種

類のリン酸化を受け、Ser604 のリン酸化が Mrc1 のクロマチン DNA 結合能に必要であった。また、Thr645 のリン酸化は Mrc1 と Cds1 の FHA 領域との特異的結合に必要である。Mrc1 と Cds1 の FHA ドメインとの間に相互作用が生じると、Rad3 が Cds1 を特異的な基質として認識できるようになり、Cds1 の Thr11 をリン酸化（初期リン酸化）することがわかった。この初期リン酸化により、もう 1 分子の Cds1 の FHA ドメインがリン酸化 Thr11 領域と結合してホモ二量体を形成し、Cds1 のキナーゼドメイン内に自己リン酸化を誘発して、Cds1 キナーゼは高活性化状態となると考えられる（図 1）。以上の結果により、エフェクターキナーゼ (Cds1) の活性化機構でのメディエーター (Mrc1) の機能的役割を明らかにした。

## おわりに

以上、DNA 複製チェックポイントにおけるメディエーターの存在を明らかにし、DNA 複製チェックポイント活性化における Mrc1 の機能に関する分子機構のほぼ全貌を明らかにした。この Mrc1 は染色体ゲノムの安定化機構において極めて重要な因子であり、真核生物のゲノム安定化維持に必要な DNA 複製チェックポイント活性化の分子機構の解明に大きく貢献した。

本研究は、米国スクリプス研究所分子生物学部門ならびに島根大学生物資源科学部生命工学科において行われたものです。本研究に出会うチャンスを与えていただき、さらに終始ご指導、ご鞭撻を賜りました米国スクリプス研究所のポール・ラッセル教授に心より御礼申し上げます。また、本研究を継続・推進するにあたり、終始激励と温かいご助言を賜りました松田英幸先生（島根大学生物資源科学部名誉教授）、川向 誠先生（島根大学生物資源科学部生命工学科教授）、ならびに中川 強先生（島根大学総合科学研究支援センター助教授）に心より感謝いたします。本研究を始める前に、研究者としての基礎をご指導いただきました駒野 徹先生（京都大学名誉教授）、酒井 裕先生（現 岡山大学教授）、植田和光先生（京都大学大学院教授）、山野好章先生（現 鳥取大学教授）、木岡紀幸先生（京都大学大学院助教授）をはじめとする京都大学農学部農芸化学科ゆかりの諸先生に深く御礼申し上げます。さらにもとに議論し、研究を進めてきた島根大学生物資源科学部生命工学科の卒業生、在校生の方々に感謝いたします。最後になりましたが、本奨励賞にご推薦くださいました日本農芸化学会関西支部長 清水 昌先生、ならびにこれまでご支援賜りました日本農芸化学会中四国支部の諸先生に厚く御礼申し上げます。