

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770178

研究課題名（和文） DNA 損傷の感知機構と修復機構のリン酸化による切り換えメカニズムの解明

研究課題名（英文） Toward the understanding of the switching mechanism between DNA checkpoint and repair machineries at DNA damage sites.

研究代表者

古谷 寛治（FURUYA KANJI）

京都大学・放射線生物研究センター・講師

研究者番号：90455204

研究成果の概要（和文）：

放射線や紫外線などにより私たちの細胞の遺伝情報がコードされているゲノム DNA を傷つけられる。傷ついた DNA は子孫細胞へと受け継がれる前に速やかに検出され、正確に修復される。その際には DNA 上の傷を検出するチェックポイント機構と傷を修復する修復機構が協調し合う必要が有ると考えられるが分子レベルでの理解は全くされていなかった。本研究では傷ついた DNA の上でチェックポイント機構が修復機構と入れ替わるための分子機構を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Genomic DNA where our genetic information were encoded was easily damaged by irradiation by gamma-ray or ultraviolet. These damaged DNA were not transferred to daughter cells until they get repaired. Upon repairing DNA damage must be quickly sensed by checkpoint mechanisms and correctly fixed through the repairing enzymes. These two processes, checkpoint and repair mechanisms, must be tightly cooperated, but the switching mechanism is undefined. Here we unveil that phosphorylation dependent feedback mechanism that is responsible the switching.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、分子生物学

キーワード：DNA 損傷、DNA 修復、細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞の染色体 DNA は紫外線や放射線、酸化ストレスにより常に損傷をうけている。その損傷は（1）DNA チェックポイント機構により感知して細胞分裂を止めたのちに（2）DNA 修復機構により直される。これら二つのタンパク質群は DNA 損傷部位にお

いて連携することでより効果的に DNA 損傷の修復を完遂していると予想されるが、どのような分子基盤で連携しているかは明らかにはされていなかった。本研究では DNA 損傷の検出機構であるチェックポイント機構に焦点をあて、遺伝学、生化学の両手法でもって解析を進めた。

チェックポイント機構は本来 DNA 損傷を受けた細胞が自身の細胞分裂を停止させるためのシグナル伝達機構として同定されて来たが、近年の解析から特定の DNA 損傷修復の活性化や DNA 代謝経路の制御などを司る事も分かって来ている。また、未修復の DNA 損傷に直接結合する事でシグナル経路が活性化するため DNA 損傷の検出機構として機能する。

興味深い事に DNA チェックポイント機構にかかわる幾つかのタンパク質や、相同組み換えタンパク質である Rad52 などは、ともに単鎖 DNA 結合タンパク質 RPA を標的として DNA 損傷部位に結合する。RPA はほぼ全ての DNA 損傷修復過程に関わるタンパク質であり、チェックポイントタンパク質や修復タンパク質は RPA タンパク質の同一のドメインを標的として DNA 損傷部位に集合する。これらのタンパク質は共通のモチーフを有しており、RPA 上で競合していると予想されるが、その協調機構は理解されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究ではこれまで私が解析してきた分裂酵母のチェックポイントタンパク質である Rad9 に注目した。Rad9 はアミノ末端側で Rad1 と Hus1 とヘテロ三量体を作り、DNA 複製因子 PCNA 様の環状複合体を形成して DNA に結合する。カルボキシル末端側を介してアダプタータンパク質である Cut5 (ヒトでは TOPBP1) と結合し、上流因子 ATR キナーゼと下流因子 Chk1 キナーゼと物理的に DNA 損傷部位上で引き合わせる鍵となる役割を果たす事を申請者らは見出して来た。さらに、下記の二点から申請者らは Rad9 タンパク質こそが、DNA 損傷の検出・修復の切り換え制御に重要な役割を果たすと考えている。(1) Rad9 は二つの異なるキナーゼにより段階的なリン酸化を受ける。(2) 最終段階までリン酸化された Rad9 は DNA 損傷部位から解離している。以上の予備的な結果から、本申請課題においては Rad9 タンパク質が損傷部位に結合して認識した後、タイミングよくリン酸化を受けることで損傷部位から離れ、DNA 修復機構に場所を譲る、との仮説を立てたのでそれを検証した。

## 3. 研究の方法

(1) Rad9 タンパク質と RPA タンパク質複合体の物理的相互作用を生化学的手法により検定し、Rad9 タンパク質が受けるリン酸化修飾の影響を検討した。

(2) Rad9 のリン酸化部位を同定し、細胞内で実際に検出を試みた。

(3) 遺伝学的手法を用いる事で Rad9 タンパク質が DNA 損傷から解離しない事が相同

組み換えの経路を阻害する事をしめた。

(4) 普遍的制御の可能性を追求するべく、ヒト培養細胞、および別種酵母を用いた解析を試みた。

## 4. 研究成果

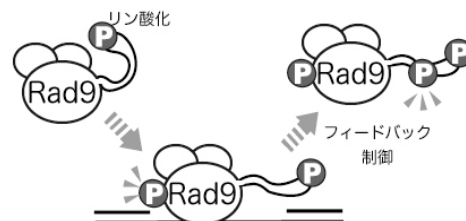
(1) GST タグを付加させた Rad9 タンパク質を精製し、精製 RPA タンパク質との共沈実験を行った。Rad9 と RPA の相互作用を検出する事が出来ただけでなく、その相互作用が単鎖 DNA 存在下のみで見られる事を示す事が出来た。これは Rad9 が DNA 損傷部位にある RPA タンパク質のみを標的とする事を示しており、DNA 損傷を特異的に検出する機構を説明出来たと考える。

さらに、Rad9 タンパク質がリン酸化を模擬させる酸性アミノ酸置換変異を導入しリン酸化が Rad9 と RPA との相互作用を減弱させる事を示す事が出来た。

並行して Rad9 のリン酸化を DNA 損傷以外の方法で自在に誘導する系を構築した。Rad9 と RPA の結合が Rad9 のリン酸化を誘導したときのみ失われる事を確認した。以上の結果から、Rad9 と RPA の結合が DNA 損傷の検出に置いて重要な役割を果たす事、また、その結合が、Rad9 が最終段階までリン酸化を受ける事で消失する事を示す事ができた。申請時に提唱した Rad9 がリン酸化される事で損傷部位から解離するモデルを詳細な分子制御レベルで示す事が出来たと考えている。

(2) リン酸化部位に関しては必要なアミノ酸残基は同定していた物の、実際のリン酸化部位に関しては未同定であった。申請者らは網羅的解析により、スレオニン 319、320 セリン 321 番のアミノ酸が重要な役割を果たす事が示唆されていた。しかしながら実際にこれらの残基がリン酸化されるかに関しては検証していなかった。最終的にリン酸化抗体を作成し、スレオニン 319、320 セリン 321 番が細胞内でリン酸化されている事を確認した。

申請者らは Rad9 のリン酸化が DDK と呼ばれるキナーゼ複合体により促進される事を既に見出していた。三つの連続したアミノ酸がリン酸化を受けるのは DDK キナーゼの基質に特徴的に見られるものである。試験管内のリン酸化アッセイも行う事で DDK こそが Rad9 のリン酸化酵素である事を証明する事が出



来た。Rad9 をリン酸化する酵素として ATR と呼ばれ

るキナーゼも申請者は同定しており、以上の結果は Rad9 タンパク質が複数のキナーゼにより段階的にリン酸化を受けるフィードバック制御の存在を示している（図参照）。

（3）本研究では遺伝学的なアプローチも行った。当初は遺伝学的なスクリーニングにより、Rad9 のリン酸化の経路と協調的に働く電子産物を同定する予定であった。ただ、予備的実験の過程で DNA 複製時の相同組み換え修復と関わる因子との遺伝的相互作用が見られた。したがって本研究では相同組み換え機構との機能関連について解析を進めた。また、中でも Rad9 と同じく RPA タンパク質を標的として DNA 損傷部位にリクルートされる Rad22 タンパク質に注目した。

Rad22 タンパク質は GFP を付加させる事で細胞内の挙動を可視化できる。この可視化ツールを用い、Rad9 変異株細胞に置ける Rad22 タンパク質の挙動を追った。その結果、リン酸化されない Rad9 を発現する細胞では Rad22 タンパク質が DNA 損傷部位へ結合したまま昨日出来ず滞っていると思われる像が得られた。また、一般に染色体 DNA は二本鎖切断を受けると速やかに修復されるが、本研究で用いたリン酸化されない Rad9 を発現する細胞では切断されたまま修復されない事もパルスフィールド電気泳動法を用いる事で確認出来た。

以上の(1)-(3)の結果から Rad9 タンパク質は DNA 損傷を検出するために損傷部位に結合すると段階的リン酸化を受け速やかに解離する事、さらに、この一連のフィードバック制御が上手く働かないと DNA 損傷部位へ同様にリクルートされる修復酵素の障害となるとのモデルを建てた。Rad9 単独の分子内でフィードバック制御が働く珍しい例である。以上の大部分の結果は文献③に報告した。

（4）申請内容の大部分は達成したため、フィードバック制御が普遍的な制御機構かどうかを確認するため他生物種に置ける制御機構を検討した。例えばヒト細胞は細胞サイズが大きいためタンパク質のダイナミクス解析に適しており、本研究で申請した生化学的解により得られた知見を増強すると考えられる。また、同じ分裂酵母でも分化する能力を有するジャポニカス種では一般に用いられる分裂酵母ポンベ種と同じセットのチェックポイント遺伝子を保持している。興味深い事に申請者らはチェックポイント機構が以上活性化するとジャポニカス酵母は形態変化を伴う細胞分化を起こす事を見出した（文献①）。チェックポイント機構の脱制御が細胞運命へと影響を与える珍しい例であり、Rad9 の DNA 損傷部位への脱着制御との機能関連を今後は論じたい。

## 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 7 件）

① Furuva, K., Aoki, K. and Niki, H. (2012) Construction of an insertion marker collection of *Sz. japonicus* (IMACS) for genetic mapping and a fosmid library covering its genome, *Yeast*, May 5  
査読有り、doi:10.1002/yea.2907

② Furuva, K., and Niki, H. (2011) Diploid construction by interallelic complementation in *Schizosaccharomyces japonicus*. *Yeast*, 28, 747-754.  
査読有り、doi:10.1002/yea.1898

③ Aoki, K., Hayashi, H., Furuva, K., Sato, M., Takagi, T., Osumi, M., Kimura, A., and Niki, H. (2011). Breakage of the nuclear envelope by an extending mitotic nucleus occurs during anaphase in *Schizosaccharomyces japonicus*. *Genes Cells*. 16, 911-926  
査読有り、doi:10.1111/j.1365-2443.2011.01540.x.

④ Rhind, N., Chen, Z., Yassour, M., Thompson, D. A., Haas, B. J., Habib, N., Wapinski, I., Roy, S., Lin, M. F., Heiman, D. I., Young, S. K., Furuva, K., Guo, Y... (計 47 名) ...Nusbaum, C. (2011). Comparative functional genomics of the fission yeast. *Science* 332, 930-936.  
査読有り、doi:10.1126/science.1203357

⑤ Furuva, K., Miyabe, I., Tsutsui, Y., Paderi, F., Kakusho, N., Masai, H., Niki, H., and Carr, A.M. (2010). DDK phosphorylates checkpoint clamp component Rad9 and promotes its release from damaged chromatin. *Mol. Cell*, 40 606-618.  
査読有り、doi:10.1016/j.molcel.2010.10.026

⑥ Aoki, K., Nakajima, R., Furuva, K., and Niki, H. (2010). Novel episomal vectors and a highly efficient transformation procedure for the fission yeast *Schizosaccharomyces japonicus*. *Yeast* 27. 1049-1060.

査読有り、doi:10.1002/yea.1815

⑦ Furuva, K., and Niki, H. (2010).  
The DNA damage checkpoint regulates a transition between yeast and hyphal growth in *Schizosaccharomyces japonicus*.  
Mol. Cell. Biol. 30. 2909-2917.  
査読有り、doi: 10.1128/ MCB.00049-10

〔学会発表〕(計 12 件)

①○Kanji Furuva, Izumi Miyabe, Naoko Kakusho, Hisao Masai, Hironori Niki, Antony M Carr: “DDK phosphorylates checkpoint clamp component Rad9 and promotes its release from damaged chromatin”  
Cold Spring Harbour Meeting, Eukaryotic Replication & Genome Maintenance, Cold Spring Harbour, 9<sup>th</sup> September, 2011,

②○Kanji Furuva, Izumi Miyabe, Naoko Kakusho, Hisao Masai, Hironori Niki, Antony M Carr: “DDK phosphorylates checkpoint clamp component Rad9 and promotes its release from damaged chromatin”  
The 6<sup>th</sup> Fission Yeast Meeting, Boston, 25<sup>th</sup> June, 2011,

③○ 古谷 寛治: 「The regulation of checkpoint proteins by checkpoint kinase ATR and DNA replication kinase DDK」BMB2011 (日本分子生物学会年会)・ワークショップ、2011年12月16日、横浜

④白岩善治、仁木宏典、○古谷寛治: 「チェックポイントタンパク質のDDKキナーゼ依存的な制御機構」  
第21回「DNA複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ」、2011年10月26日、福岡

⑤○K Furuva:: “REGULATION OF DNA DAMAGE CHECKPOINT SIGNALLING THROUGH PHOSPHORYLATION”  
The 27<sup>th</sup> RBC-NIRS International Symposium, Kyoto, 9<sup>th</sup> December. 2011.

⑥○Furuva, K., Miyabe, I., Tsutsui, Y., Paderi F., Kakusho, N., Masai, H., Carr AM., Niki, H.  
DDK phosphorylates checkpoint clamp Rad9 and promotes its release from damaged Chromatin  
第53回放射線影響学会、京都、2010年10月21日

⑦○Furuva, K., Tsutsui, Y., Miyabe, I., Kakusho, N., Carr AM., Masai, H., Niki, H.  
DDK phosphorylates checkpoint clamp Rad9 and promotes its release from damaged Chromatin  
EMBO workshop, Freiburg, 22<sup>nd</sup> July<sup>d</sup>, 2010.

⑧○古谷 寛治: 「複製キナーゼDDKに依るチェックポイントタンパク質の制御」  
第1回「ゲノム損傷応答研究会」、2011年10月16日、静岡県三島市、国立遺伝学研究所

⑧○ Furuva, K., Miyabe, I., Tsutsui, Y., Kakusho, N., Masai, H., Carr AM., Niki, H. DDK phosphorylates checkpoint clamp Rad9 and promotes its release from damaged Chromatin. The 57<sup>th</sup> NIBB conference, Okazaki, 15<sup>th</sup> October, 2010.

⑩○Furuva, K., Miyabe, I., Tsutsui, Y., Kakusho, N., Masai, H., Carr AM., Niki, H. DDK phosphorylates checkpoint clamp Rad9 and promotes its release from damaged Chromatin 33回日本分子生物学会年会、神戸、2010年12月7日

⑪○ Furuva, K., Miyabe, I., Kakusho, N., Masai, H., Carr AM., Niki, H. DDK phosphorylates checkpoint clamp Rad9 and promotes its release from damaged chromatin. International Conference on Radiation and Cancer Biology. Nagasaki, 18<sup>th</sup> February, 2010.

⑫○ Furuva, K., Miyabe, I., Tsutsui, Y., Kakusho, N., Masai, H., Paderi F., Carr AM., Niki, H.; DDK phosphorylates checkpoint clamp Rad9 and promotes its release from damaged chromatin.  
7<sup>th</sup> 3R symposium, Toyama. 27<sup>th</sup> October, 2010

〔その他〕

ホームページ等

成果は

<http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/mutagenesis2/index2.html>

にて随時更新している。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

古谷 寛治 (FURUYA KANJI)

京都大学・放射線生物研究センター・講師  
研究者番号: 90455204