

Title	Biochemical characterization of Rad53p from <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	王, 成忠
Citation	大阪大学, 2007, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/47478
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	王 成 忠
博士の専攻分野の名称	博士 (医 学)
学位記番号	第 20904 号
学位授与年月日	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科情報伝達医学専攻
学位論文名	Biochemical characterization of Rad53p from <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母 Rad53 タンパク質の生化学的解析)
論文審査委員	(主査) 教授 花岡 文雄 (副査) 教授 米田 悦啓 教授 田中亀代次

論文内容の要旨

[目 的]

出芽酵母の Rad53 タンパク質 (Rad53p) は、Ser/Thr キナーゼで、また DNA 複製および DNA 損傷チェックポイントに機能している。DNA 損傷を与えると、Mec1 や Tel1 キナーゼが Rad53p をリン酸化して活性化し、それが複製フォークの安定化、細胞周期進行の停止、DNA 修復遺伝子の発現誘導などを起こす。またヒドロキシウレア (HU) 処理細胞では、活性化 Rad53p は複製フォークの進行を阻害し、後期複製開始点での着火を阻害する。

本論文では、Rad53p がどのようにして細胞周期の進行を停止するのか、またそのキナーゼ活性の critical なターゲットは何か、という疑問に答えるための一つのアプローチとして、HU 処理あるいは未処理の出芽酵母から Rad53p を精製し、生化学的な性質を明らかにすることを目的とした。

[方法ならびに成績]

Rad53p あるいはそのキナーゼドメインに変異を入れキナーゼ活性を欠損した rad53KDp を過剰発現している出芽酵母を HU 処理あるいは未処理後、ホモジナイザーで破砕し、塩抽出、ポリミン P 処理、硫酸沈澱を経て、SP-セファロース、Q セファロース、MonoS、ヒドロキシアパタイト、MonoS、一本鎖 DNA セファロースの各カラムクロマトグラフィーにより、Rad53p および rad53KDp を精製した。

HU 処理した細胞から精製した Rad53p において、リン酸化と思われる移動度の遅い分子が検出され、実際に BAP 処理によってリン酸化型であることが示された。HU 処理しない細胞から精製した Rad53p を *in vitro* で [γ - 32 P]ATP とインキュベートすると、タンパク質量および時間依存的に自己リン酸化が見られ、Rad53p が自己リン酸化活性を有することが確認された。キナーゼ活性を持たない rad53KDp を Rad53p と共存させると、rad53KDp は自己リン酸化活性を示さないが、Rad53p によりリン酸化を受けることが分った。すなわち Rad53p はシスおよびトランスのリン酸化活性をもつことが示された。

次に Rad53p の持つキナーゼ活性の標的を調べるため、DNA 複製に重要な役割を持つ Cdc7p-Dbf4p キナーゼと Mcm 複合体の一分成分 Mcm2 について調べた。あらかじめ自己リン酸化した Rad53p によって、Dbf4p および Mcm2p

がリン酸化された。また Cdc7p-Dbf4p によってリン酸化を受けない Mcm2 変異体 (mcm2-12SAp) も Rad53p によりリン酸化され、Rad53p が Cdc7p-Dbf4p とは独立して Mcm2p 中の Ser/Thr 部位をリン酸化することが示された。

最後に Rad53p の DNA 結合の特異性をゲルシフト法により調べた。HU 未処理の出芽酵母から精製した Rad53p は、一本鎖 DNA に結合し、二本鎖 DNA にはほとんど結合しなかった。この結合には ATP の存在は影響しなかった。フラップ型 DNA、フォーク型 DNA、バブルを含む DNA など、様々な構造の DNA への結合を調べたところ、基本的に Rad53p は一本鎖 DNA 部分に結合すると考えて矛盾のない結果が得られた。HU 未処理の酵母から精製した Rad53p を BAP 処理して脱リン酸化した後、DNA 結合実験に供したところ、BAP 処理する前に比べて電気泳動上の移動度が遅くなり、推定分子量から Rad53p が二量体で一本鎖オリゴ DNA に結合していると推定された。グリセロール密度勾配遠心の結果より、Rad53p 単独では、BAP 処理しても二量体を形成しないことから、Rad53p のリン酸化状態が DNA への結合に影響を与えるものと考えられる。

[総括]

Rad53p がシスおよびトランスのリン酸化活性を持っているというこれまでの知見に加え、Dbf4p だけでなく、Mcm2p をしかも Cdc7p-Dbf4p とは独立してリン酸化することを明らかにした。また Rad53p が一本鎖 DNA 結合活性を有すること、リン酸化状態によって DNA への結合様式に変化が見られることを示した。これらの知見は、Rad53p の複製チェックポイントにおける役割を考察するうえで重要である。

論文審査の結果の要旨

出芽酵母の Rad53 タンパク質 (Rad53p) は、DNA 複製および損傷チェックポイントに働く Ser/Thr キナーゼである。本研究では、Rad53p がどのようにして細胞周期の進行を停止するのか、またそのキナーゼ活性の critical なターゲットは何か、という疑問に答えるための一つのアプローチとして、ヒドロキシウレア (HU) 処理あるいは未処理の出芽酵母から Rad53p を精製し、その生化学的な性質を調べた。その結果、HU 処理した細胞から精製した Rad53p において、リン酸化型のフォームが検出され、また HU 処理しない細胞から得た Rad53p を *in vitro* で [γ - 32 P]ATP とインキュベートすることにより、Rad53p の自己リン酸化が見られた。次に Rad53p のキナーゼ活性のそれ自身以外の標的を知るため、DNA 複製に重要な役割を持つ Cdc7-Dbf4 キナーゼと Mcm 複合体について調べた。あらかじめ自己リン酸化して活性化した Rad53p によって、Dbf4 および Mcm2 がリン酸化された。Mcm2 は Cdc7-Dbf4 キナーゼによってもリン酸化されることが知られているが、Rad53p はそれとは別のアミノ酸残基をリン酸化することが分った。Rad53p の DNA 結合の特異性をゲルシフト法により調べたところ、HU 未処理の細胞から精製した Rad53p は、一本鎖 DNA に結合し、二本鎖 DNA には結合しなかった。またこの結合に ATP の存在は影響しなかった。HU 未処理の細胞から精製した Rad53p をアルカリ性ホスファターゼ処理して完全に脱リン酸化した後、DNA 結合実験に供したところ、Rad53p が二量体で DNA に結合していると考えられる移動度を示した。このことは Rad53p のリン酸化状態によって DNA への結合の様式が異なる可能性を示唆している。

以上の結果は、Rad53p のチェックポイント機構における役割を理解するうえで重要な知見を提供するものであり、学位の授与に値すると考えられる。