

Functions of the Rad9 C-terminus in the human checkpoint clamp, Rad9-Hus1-Rad1.

武石, 幸容

<https://hdl.handle.net/2324/1500529>

出版情報：九州大学, 2014, 博士（理学）, 課程博士
バージョン：
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（2）



氏 名 : 武石 幸容

論 文 名 : Functions of the Rad9 C-terminus in the human checkpoint clamp, Rad9-Hus1-Rad1.
(ヒトチェックポイントクランプ Rad9-Hus1-Rad1 の Rad9 サブユニット C 末端領域の機能)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

ヒトチェックポイントクランプ Rad9-Hus1-Rad1 複合体 (9-1-1) は、機能に必要な環状構造 (core ring structure, CRS) を持つ。DNA 損傷時、9-1-1 はこの構造を介してクランプローダー Rad17-RFC 依存的に DNA 上へロードされ、ATR を介した DNA 損傷応答経路を活性化する。9-1-1 のサブユニット Rad9 の C 末端 120 アミノ酸残基 (C-terminal tail, C-tail) は特定の構造を持たない天然変性領域であり、CRS から突き出ていると考えられている。C-tail は、一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA やチェックポイントメディエーター TopBP1 等と結合することが報告されているが、その機能は不明である。この学位論文では DNA 損傷応答に関与するヒト Rad9 C-tail の機能を解析し、得られた以下の 2 つの知見を報告する。

1. カゼインキナーゼ 2 (CK2) 依存的な Rad9 C-tail のリン酸化による 9-1-1/TopBP1 間の結合と、この結合が DNA 損傷応答に及ぼす影響。

9-1-1 が CK2 に結合するという知見に基づき、精製タンパク質を用いて 9-1-1/CK2 間の直接的な結合を確認した。さらに CK2 が C-tail 上の Ser341 と Ser387 をリン酸化することを示し、このリン酸化依存的な 9-1-1/TopBP1 間の結合を再構築した。さらに 2 つのセリン残基をアラニン、グルタミン酸に置換した変異体を作成し、この変異体を含む 9-1-1 を用いて 9-1-1/TopBP1 間の結合に対するこれらリン酸化の必要性を示した。次に、この 2 つのセリン残基をアラニンに置換した Rad9 を過剰発現するヒト細胞株を作成し、DNA 損傷を引き起こす UV や MMS に対する感受性を調べた。その結果、いずれに対しても高い感受性を示した。以上より、チェックポイント因子 9-1-1/TopBP1 間の結合は CK2 によってリン酸化された Rad9 の Ser341 及び Ser387 を介して行われ、このリン酸化依存的なタンパク質間結合がヒト細胞の DNA 損傷応答に必須であることを明らかにした。

2. C-tail/CRS 間における 9-1-1 の分子内結合と、それによる 9-1-1 と DNA や結合因子との相互作用の制御。

9-1-1 と DNA の結合に関する知見に基づいて、9-1-1 および C-tail を欠いた CRS のみで構成された変異型 9-1-1 (9^{ΔC}-1-1) の DNA 結合性を比較した。その結果、9^{ΔC}-1-1 は 9-1-1 より数十倍高い結合性を示した。このことから 9-1-1 では C-tail が CRS に分子内結合して、その DNA 結合を抑制することが予想された。これを確認するため、9^{ΔC}-1-1 に C-tail 断片を加えたところ、両者の結合が見られ、その結合によって 9^{ΔC}-1-1 の DNA 結合が抑制された。この結合に必要な C-tail の領域を解析した結果、Phe365 と Phe366 を含む 15 アミノ酸残基が特定された。この 2 つのフェニルアラニンをアラニンに置換した変異型 C-tail 断片は、9^{ΔC}-1-1 との結合及び、DNA 結合の抑制が失われた。さらにこの領域内の 10 アミノ酸残基を欠く変異型 Rad9 を含む 9-1-1 を作成した。この変異

型 9-1-1 は、C-tail をもたない 9^{ΔC}-1-1 と同程度の DNA 結合を示した。この結果より、9-1-1 の DNA 結合は、C-tail がその分子内結合によって折り畳まれた状態では抑制されることが示された。また同じ C-tail を介した 9-1-1/TopBP1 間の結合に必要な領域を解析した結果、必須の 2 つのリン酸化セリン残基以外に、上記の 15 残基の領域と重複し、Phe365 と Phe366 を含む 10 残基の領域が結合に必要であった。このことより CRS に対する C-tail の分子内結合は、同じ C-tail を標的とする 9-1-1/TopBP1 間の結合と競合することが示唆された。

以上より、チェックポイントクランプ 9-1-1 と DNA 及び関連する因子との相互作用において 9-1-1 内の C-tail の折り畳み構造の変化、リン酸化等の修飾を介してダイナミックな結合の切り換えが行われ、これが DNA 損傷応答の調節を行っている機構を提示することができた。