

## 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)
論文調査委員	主 査 九州大学 教授 釣本 敏樹 副 査 九州大学 教授 川畑 俊一郎 副 査 九州大学 教授 藤田 雅俊 (薬学府)

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

生物の DNA 複製中の損傷は正確な遺伝情報の伝達の大きな障害となる。ヒトのチェックポイントクランプ 9-1-1(Rad9-Hus1-Rad1)は、DNA 損傷応答経路の初期段階で機能し、DNA 複製中に生じる損傷に対応する応答のマスターキナーゼの一つ ATR を活性化する。その構造はコアとなる環状構造(CRS)と Rad9 サブユニットの C 末端領域(C-tail)からなり、後者はコアの環状構造から突出している。この領域は様々なタンパク質との相互作用が報告されているがその詳細は未だはつきりとしなない。本研究では、DNA 損傷応答に関与するヒト Rad9 C-tail の機能を生化学的、細胞生物学的手法で解析し、以下の知見を明らかにした。

1. カゼインキナーゼ 2(CK2)による Rad9 C-tail のリン酸化を介して TopBP1 は 9-1-1 に結合し、この結合は DNA 損傷応答に必須である

9-1-1 と結合する新規の結合因子として CK2 を見出した。この CK2 はユビキタスに働くキナーゼであり、9-1-1 もリン酸化された。CK2 の標的アミノ酸の一つ Ser387 のリン酸化は、DNA 損傷応答経路の活性化に重要な TopBP1 との結合に必須とされている。そこで CK2 依存的な 9-1-1/TopBP1 間の結合の再構築を行い、この結合には Rad9 の Ser387 だけでなく Ser341 のリン酸化も関与することを示した。さらにこの両セリン残基のリン酸化がヒト細胞内の DNA 損傷応答に重要であることを示した。

2. C-tail は CRS に対して分子内結合し、9-1-1 の DNA やチェックポイント因子に対する結合を制御する

9-1-1 及び C-tail を欠いた 9-1-1 が DNA に結合するという知見に基づき、CRS だけで構成された 9<sup>ΔC</sup>-1-1 を用いて DNA 結合の解析を行った。DNA の長さ依存的に 9<sup>ΔC</sup>-1-1 が結合すること、並びに二次構造をもつ DNA が 9<sup>ΔC</sup>-1-1 と強く結合したことから CRS の環状内に DNA が結合することが考えられた。C-tail の有無によって 9-1-1 の DNA 結合性が変化したことから CRS と C-tail の分子内結合が DNA 結合を阻害する可能性を見出した。実際、C-tail は CRS と結合しており、この結合に必要な C-tail の領域を解析した結果 Phe365/Phe366 を含む 15 アミノ酸残基の領域が特定された。上記で示した 2 つの Phe を Ala に置換した変異型 C-tail, C-FFAA は 9<sup>ΔC</sup>-1-1 との結合、並びに DNA 結合の抑制を欠損させた。さらに分子内結合を欠いた変異型 9-1-1 は 9<sup>ΔC</sup>-1-1 と同程度の DNA 結合を示した。以上の結果から C-tail は 9-1-1 の CRS と分子内結合して折り畳まれ、DNA 結合を抑制していることを示した。

さらに、前半の研究で示した 9-1-1/TopBP1 間の結合は C-tail を介して TopBP1 と結合していることに着目し、この結合と C-tail/CRS 間の結合との関係を解析した。その結果、C-tail/TopBP1

間の結合に必要な領域は C-tail/CRS 間の結合に必要な 15 アミノ酸残基中にある 10 アミノ酸残基と領域が重なった。また C-tail/CRS 間の結合を欠損させた C-FFAA は C-tail/TopBP1 間の結合も欠損させたことから、両結合は同じ、もしくは似た結合様式によって結合することが示唆された。

これらより、9-1-1 の C-tail の修飾、並びに折り畳みの状態はこの複合体と他因子との相互作用を制御し、9-1-1 とその結合因子間の相互作用の切り換えを行い、DNA 損傷応答経路の活性制御を行う機構を提唱できた。

以上の結果は、ヒトの DNA 損傷センサー複合体である 9-1-1 の分子構造と関連因子間との相互作用が巧みな機構で切り替えるという極めてユニークなしくみを初めて提唱したものであり、高等真核生物のゲノム構造維持のための分子機構の解明において価値ある業績であると認める。

よって、本論文は博士（理学）の学位論文に値するものと認める。