

[別紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 Possibility of novel checkpoint regulation for Cdc2 kinase in fission yeast.

和訳 分裂酵母 Cdc2 に対する新規チェックポイント制御機構の可能性

指導教官 岡山 博人 教授

東京大学医学系研究科

分子細胞生物学専攻

平成10年4月 入学

医学博士課程

氏名 伊藤 健治

真核生物の細胞周期研究において、出芽酵母、分裂酵母は良いモデルとして解析されてきた。それは細胞の基本的な機能に関する多くの変異体が単離されていること、強力で迅速な遺伝学が使えるためである。

細胞周期因子の中でも Cdk は細胞周期エンジンと呼ばれる中心的な役割を果たすリン酸化酵素群であり、この因子の制御が細胞周期制御に非常に重要である。分裂酵母における Cdk は Cdc2 キナーゼのみと考えられているが、この因

子の 15 番目のチロシン残基が Wee1/Mik1 キナーゼによりリン酸化されることで負に制御されることが知られており、この制御が DNA 障害時や DNA 複製阻害時における細胞分裂抑制 (G_2 チェックポイント停止) に重要であると考えられてきた。

本研究ではまず、15 番目チロシン残基近傍を高等真核生物 Cdk4/6 の配列と置き換えた新たな *cdc2*cDNA を作製し、これを *icdc2-4a* と名付けた。*wee1-50*、 Δ *mik* は *cdc2* の 15 番目チロシンをリン酸化出来ないことにより *cdc2* 活性が上昇し、染色体複製途中で細胞分裂を引き起こす温度感受性変異株であるが、*icdc2-4a* 遺伝子を組み込んだ多コピープラスミドを導入した場合温度感受性が抑圧された。また、*cdc25-22* は *cdc2* の 15 番目チロシンを脱リン酸化出来ないことにより細胞分裂を起こせないまま停止してしまう温度感受性変異株であるが、同様に導入した場合やはり温度感受性が抑圧された。

この変異遺伝子を染色体上に組み込んだ場合でも、*cdc25-22* の温度感受性を抑制し、*wee1-50*、 Δ *mik* においてもある程度抑制した。一方で、*icdc2-4a* 株は野生株 *cdc2* と同等の生育速度を示し、また *in vivo* から精製した場合ほぼ同等のリン酸化活性を示した。以上のことから、この変異株は 15 番目のチロシンリン酸化制御非依存的に生存していると考えることが出来る。

この 15 番目のチロシンリン酸化について、リン酸化抗体を用いたさらなる精査を試みた。対数増殖期ではこの変異 Cdc2 は野生型と同等にリン酸化されていた。また、*wee1-50*、 Δ *mik* の半許容温度条件下において速やかに脱リン酸化されるという点でも野生型と等しかった。しかしながら、その半許容温度条件下において、野生株はチェックポイント異常を引き起こすのに対し、*icdc2-4a*

株は正常に停止した。このことは 15 番目のチロシンリン酸化が細胞周期停止に必ずしも必要でないことを示している。

次に、この *cdc2* 変異株においてチェックポイント機構が正常に機能しているかどうかを調べた。MMS (メチルメタンスルホネート) 瀑布による DNA メチレーションや、HU (ハイドロキシウレア) による DNA 合成阻害に対しては弱い感受性を示し、UV 照射に対しては野生株と同等に生育した。すなわち、この *cdc2* 変異株の DNA 傷害、DNA 複製阻害に対する細胞周期停止はほぼ正常であることが判明した。現在までの知見では、*cdc2* は 15 番目チロシン残基リン酸化、及び脱リン酸化の阻害のみがチェックポイント制御下にあると考えられてきたが、この新たな変異株の存在により、*cdc2* の別の部位がチェックポイント制御下にあることを、すなわち未知の機構が存在していることを示唆している。