

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 伊藤 健治

本研究では真核生物の細胞周期進行において非常に重要な役割を果たしている Cdk の制御をより詳しく精査するため、分裂酵母 *Shizosaccharomyces pombe* をモデルに Cdc2/Cdk1 キナーゼの制御様式を解析し、以下の結果を得ている。

1. Cdc2 は 15 番目チロシン残基リン酸化により負に制御、脱リン酸化により正に制御されることが知られている。この Cdc2 15 番目チロシン残基周辺 4 アミノ酸を変異させ、ヒト Cdk4/6 と同配列となるように変異させた Cdc2-4a を作成し解析を試みた。まず、このタンパクをコードする *cdc2-4a* 遺伝子は *cdc2-L7* 変異株の温度感受性を多コピープラスミドにより抑圧した。また、SV40 プロモーター支配下にある *cdc2-4* 遺伝子を染色体 *cdc2* 遺伝子座位に組み込んだ *icdc2-4a* 株は、野生型 *cdc2⁺* 遺伝子を同様に組み込んだ *icdc2⁺* 株と同等の生育及びキナーゼ活性を示した。これらのことから Cdc2-4a 変異型タンパクは野生型 Cdc2 と同等の活性を持つことが遺伝学、生化学両方の面から示された。
2. *wee1-50 Δmik1* 二重変異株及び *icdc2⁺ wee1-50 Δmik1* 三重変異株は温度感受性を示す。これは Wee1/Mik1 チロシンキナーゼ失活により Cdc2 キナーゼ

活性が抑制されないためと考えられている。また *cdc25-22* 株及び *icdc2⁺ cdc25-22* 二重変異株も温度感受性を示すが、これは Cdc25 チロシンフォスファターゼが Cdc2 キナーゼを正に制御する機能を有しており、この失活により Cdc2 が抑制されたままになるためと考えられている。一方で、*icdc2-4a weel-50 Δmik1* 三重変異株及び *icdc2-4a cdc25-22* 二重変異株は温度感受性を示さなかった。また、*weel-50 Δmik1* 二重変異株や *cdc25-22* 変異株に Cdc2-4a をコードする多コピープラスミドを導入した場合においても同様に温度感受性からの回復が見られ、Cdc2-4a 変異は Wee1/Mik1 キナーゼ、Cdc25 フォスファターゼの機能が欠損した状態においても生育が可能であるということが示された。

3. これまでのところ、細胞周期チェックポイント制御において Cdc2 15 番目チロシンがそのターゲットと考えられていた。そこで *icdc2-4a* 株の DNA 傷害、DNA 合成阻害に対するチェックポイント応答を調べたところ、*icdc2⁺* 株と同様の生育を示した。このことから、Cdc2-4a 変異下でもチェックポイント機構による細胞周期停止が正常であることが示された。
4. 先に述べた通り、*icdc2-4a weel-50 Δmik1* 三重変異株は Wee1 キナーゼが失活する温度下においても生育可能である。この条件下での Cdc2-4a 15 番目チロシン残基リン酸化状態を抗リン酸化抗体を用いて調べたところ、*icdc2⁺ weel-50 Δmik1* 三重変異株における Cdc2 と同様、非許容温度移行後 3 時間で速やかに脱リン酸化された。この結果から、Cdc2-4a は 15 番目チロシン

残基が脱リン酸化された状態でもキナーゼ活性が制御されていることが示された。

以上、本論文は分裂酵母新規 Cdc2 変異因子の解析から、Cdc2 が 15 番目チロシン残基リン酸化以外の機構で制御されていることを明らかにした。本研究は、チェックポイント機構による Cdc2 キナーゼ活性制御及び細胞周期停止の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。