

# 論文審査の結果の要旨

氏名 北村 亮

本研究は、DNA複製開始の制御にcriticalな役割をはたすヒトCdc7キナーゼの機能部位を様々な変異体の解析によって同定し、Cdc7の細胞内局在に必須な配列を同定するとともに、活性化サブユニットDbf4/ASKによるCdc7キナーゼ活性化のメカニズムについて新しいモデルを示した意欲的な研究である。

Cdc7キナーゼは複製開始に必須なキナーゼとして出芽酵母で同定された。調節サブユニットであるDbf4/ASKと活性のある複合体を形成し、ヒトを含む真核生物に広く保存されている。Cdc7キナーゼは複製開始において、複製フォーク巻き戻し因子であるMCMをリン酸化し、複製開始を誘導する。しかしDbf4/ASKによる活性化の詳細なメカニズムや、活性の細胞周期制御などについては未だ解明されていない。また全てのキナーゼは高度に保存されたキナーゼドメインを有するが、Cdc7キナーゼはCdc7特有の保存されたキナーゼドメインとともに、それを分断する3個のキナーゼ挿入配列を有することがその構造上の特徴である。しかしこれまでのところ、キナーゼ挿入配列の機能としては、キナーゼ挿入配列II全体がCdc7キナーゼの核局在に必要であるとする報告がなされているものの、Cdc7分子の半分近くを占めるキナーゼ挿入配列の機能はほとんど未知である。また、Cdc7キナーゼ活性の発現には、Dbf4/ASKとの結合が必須であるが、Dbf4/ASKによるCdc7キナーゼ活性化の機構は全く未知である。本研究でCdc7分子の詳細な分子解剖による解析を通じて、Cdc7キナーゼの細胞周期発現制御、細胞内局在に必要な領域、Dbf4/ASKとの相互作用、Cdc7の活性化に必須な領域を同定し、Dbf4/ASKによるCdc7キナーゼ活性化について検証可能な新規モデルを提示した。

まず、Cdc7キナーゼタンパク質レベルが、細胞周期で変動することを示した。G1期で低下し、S期に増加し核内に局在する。Ectopicに発現したCdc7レベルも同様に変動するのでタンパク質の安定性のレベルでの制御を受けている可能性が示唆された。

Cdc7の細胞内局在について以下の点を明らかにした。Cdc7キナーゼを12の部位に分け、それぞれの部位を欠失した変異体Cdc7キナーゼを蛍光タンパク質mKO2 (monomeric Kusabira Orange 2)融合タンパク質としてHeLa細胞内で発現させることで、その細胞内局在を観察した結果、C末端の50アミノ酸および、キナーゼ挿入配列IIのN末端側の欠失によってCdc7キナーゼが核と細胞質の両方に局在するようになることを示した。これらの結果より、Cdc7キナーゼの核局在には、これまで報告されていたキナーゼ挿入配列II以外に、C末端の領域が必要であることを明らかにした。

クロマチン結合は、Cdc7の基質認識の機構を明らかにする上で重要であるが、今回の結果からはキナーゼドメインを破壊することにより、喪失することが示された。しかしこれは、タンパク質の全体構造が影響を受けることが理由かもしれない。これまで報告

されているキナーゼ挿入配列 II が必要であるという結果は再現できなかった。

Dbf4/ASK との相互作用については以下の点を明らかにした。Cdc7 キナーゼの 24 の欠失変異体を作製し、293T 細胞内で Dbf4/ASK とともに発現させ、Dbf4/ASK との免疫共沈降を解析した。その結果、C 末端の 50 アミノ酸およびキナーゼ挿入配列 III の N 末端付近(448-457)が Dbf4/ASK との相互作用に必須であること、またキナーゼ挿入配列 II の C 末端付近(337-361)は Dbf4/ASK との相互作用に必要ではないが Cdc7 のキナーゼ活性に必須であることを示した。キナーゼ挿入配列 III の N 末端の 444 の残基が実際に Dbf4/ASK と相互作用することを、クロスリンク法により示した。同定した領域のアミノ酸配列をヒト、アフリカツメガエル、分裂酵母、出芽酵母間で比較した結果、C 末端テイル領域に保存性の高い配列(567-572)が存在することを明らかにした。これらの結果から得られた Dbf4/ASK との結合に必須な領域である C 末端およびキナーゼ挿入配列 III の N 末端付近の位置関係を、Cdc7 キナーゼに分子系統樹上最も近いとされるカゼインキナーゼ II a サブユニットの構造をもとに予測することで、それらが共にキナーゼ活性中心に対して裏面に、近接して位置していることを示した。そしてこれらの結果より、Cdc7 キナーゼはその活性中心とは反対の面において、C 末端テイル領域とキナーゼ挿入配列 III の N 末端領域を介して Dbf4/ASK と結合し活性化するというモデルを示した。また、Dbf4/ASK 上には motif-M および-N の二個の独立の Cdc7 結合モジュールの存在が証明されている。これらの二個の Cdc7 結合モジュールが、今回同定された Cdc7 上の二個の ASK 結合配列に相互作用する可能性もあり、今後実験的に検証する。

本研究により、ヒト Cdc7 キナーゼにおける Dbf4/ASK との結合に必須な領域、および核局在に必須な領域を明らかにした。キナーゼ挿入配列 II は Cdc7 の核局在に必須であり、C 末端の 50 アミノ酸およびキナーゼ挿入配列 III の N 末端付近(448-457)は Dbf4/ASK との結合に必須であることを示した。さらにこれらの結果をもとに Dbf4/ASK による Cdc7 の活性化のモデルを示した。本研究の結果は、Cdc7-Dbf4/ASK 複合体の構造上の特徴を明らかにするとともに、その機能発現に必要なドメイン、Dbf4/ASK による活性化のメカニズムの解明に大きく貢献する。明らかにされた Cdc7 の特異ドメインと相互作用する分子の解析は、新たな基質、結合パートナーの解明に貢献し、最終的に Cdc7-Dbf4/ASK の高次構造の解明に向けて基礎データを提供し、Cdc7 キナーゼの活性を正あるいは負に制御する低分子化合物の開発のための科学的基盤を与える。以上述べたように、本論文は染色体複製開始の鍵を握る制御因子 Cdc7 による多様な染色体動態制御の分子基盤の解明に大きく貢献することが期待され、博士論文として学位に値する内容であると判断する。また、学位審査会における、北村亮君の質疑応答の際の受け答えも、適切であり、学位に値する知識、学識を有していると判断された。

なお、本論文は、当研究室 覺正直子、深津理乃、Gaik-theng Toh、理研の沢野朝子博士、宮脇敦史博士との共同研究であるが、論文提出者が主体となってすべての分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

以上の理由により、北村亮君に博士（生命科学）の学位を授与できると認める。