

氏名	ふるや かんじ 古谷寛治
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2233号
学位授与の日付	平成12年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	S期における姉妹染色分体間結合の確立に必要な分裂酵母 Mis 4 の研究

論文調査委員 (主査) 教授 柳田充弘 教授 藤吉好則 教授 井口八郎

論文内容の要旨

複製された姉妹染色分体同士はM期において分配されるまでつなぎ止められている。すなわち姉妹染色分体間結合(Sister Chromatid Cohesion)を形成することでM期における染色体分配を保障していることが古くからの細胞生物学的な観察より示唆されてきた。本研究において分裂酵母(*Schizosaccharomyces Pombe*) Mis 4がS期で姉妹染色分体間の結合の確立に機能することが明らかとなり、姉妹染色分体間結合の分子メカニズムの一端が明らかにされた。

温度感受性 *mis4* 変異株は制限温度でS期に致死となり、その後複製された姉妹染色分体が間期においても分離してしまうことを蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション等の実験より見いだした。Mis 4はクロマチン領域に局在した。これらの結果から Mis 4の機能はクロマチン上でDNA複製と協調して姉妹染色分体間結合を確立するものであり、*mis4* 変異株では確立できない結果、致死となり時期尚早な染色体分離が起こると思われる。Mis 4は進化上保存されたタンパク質であった。近年、コヒーシン複合体(Cohesin Complex)が姉妹染色分体間結合に必須であるとして同定されたが、免疫沈降法、ショ糖密度勾配遠心法によると Mis 4はこれとは異なる複合体を形成する。以上の結果から Mis 4を姉妹染色分体間結合に関わる新規複合体であると結論し、アドヘリン(Adherin)と命名した。*mis4* 変異ではコヒーシン複合体のサブユニットである Rad21が正常な局在を示さず、Rad21のリン酸化と思われる一部の修飾が見られなくなっていた。Mis 4/アドヘリンとコヒーシン複合体は異なる複合体を形成するが、局在あるいはタンパク質の修飾を通じて相互作用をしているようである。

Mis 4はM期における染色体分配にも関わるようである。温度感受性 *mis4* 変異株は微小管重合阻害剤チアベンダゾールに対して感受性を示した。さらに、温度感受性 *mis4* 変異株は制限温度においてM期でMad 2依存的な紡錘体チェックポイント(動原体-動原体微小管の結合を監視するシステム)が活性化されM期進行遅延を引き起こすことを見いだした。Mis 4は姉妹染色分体間結合に機能すると同時に動原体機能へも何らかの形で関与しているのかもしれない。

論文審査の結果の要旨

複製された姉妹染色分体同士はM期において分配されるまで結合していると考えられてきた。この結合(申請論文においては姉妹染色分体間結合と呼ぶ)が確立されることで均等な染色体分配が保障されていると考えられていたが、その分子メカニズムはほとんど明らかにされてこなかった。申請者は染色体を安定に維持することのできないことを指標に単離された分裂酵母 *mis4* 変異株の解析を通じて、Mis 4タンパク質が姉妹染色分体間結合に機能し、さらにそれがDNA合成と協調して行われるものであることを示した。

申請者はまず、Mis 4が細胞周期のどの時期に機能するかを知る目的で、*mis4* 変異株が細胞周期のどの時期に致死となるかを調べた。同調培養による解析から *mis4* 変異株はM期とS期の二つの時期に致死となることを見出した。*mis4* 変異株は核分裂異常の表現型を示したが、この表現型を示すより前にすでに致死となっていた。Mis 4は一つ前のS期あるいはM期に機能することで正常な核分裂を保障していることを示した。

申請者はさらに Mis 4のS期の機能に注目した。蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法や、GFPにより染色体の特定の

領域を視覚化する、高度な細胞生物学的技術を用いて、Mis 4 が姉妹染色分体間結合を S 期において確立していること、*mis 4* 変異株ではそれが出来ない結果、致死となり、染色体分配異常が引き起こされることを明らかにした。これらの結果は姉妹染色分体間結合の確立が S 期に行われることを証明した初めての例であり十分に評価できる。また DNA 合成に関わる因子と遺伝学的相互作用があることを示し、姉妹染色分体間結合の DNA 複製装置とのカップリングの可能性を示唆した。

申請者は、次に、これまで他生物種において姉妹染色分体間結合に必須であることが示されていた Rad 21 タンパク質が分裂酵母においても姉妹染色分体間結合に必須であることを示した。Rad21 は分裂酵母においても他種生物と同様、姉妹染色分体間結合に必須な分子複合体コヒーシンを形成していたが、Mis 4 はこれには含まれなかった。これらの結果から、申請者は Mis 4 は姉妹染色分体間結合に必須な新規な因子と結論付け、「アドヘリン」と命名した。しかしながら Mis 4 は、Rad 21 の正常な局在化に必須であり、アドヘリンとコヒーシんとが直接あるいは間接的に何らかの相互作用をする可能性を示した。これらは姉妹染色分体間結合の分子メカニズムの一端を明らかにしたという点で非常に評価できると思われる。

さらに申請者は *mis4* 変異株で見られる核分裂異常の表現型に注目し、この表現型がスピンドルチェックポイントが活性化されたものであることを見出した。

mis4 変異株がチューブリン重合阻害剤に感受性を示すこと等から、Mis 4 が動原体機能にも関わる可能性を提示した。また、申請者はスピンドルチェックポイントタンパク質である Mad 2 の局在を申請研究の過程で決定したがこれ自身はスピンドルチェックポイントの機能解明にとって意義あるものと思われる。

以上、申請論文は分裂酵母 *mis4* 変異株の解析を通して Mis 4 が姉妹染色分体間結合に必須な新規因子であり、S 期においてその後の染色体分配を保障していることを明らかにした。これまでほとんど未解明であった姉妹染色分体間結合の制御機構の理解に大きく寄与するものと思われる。

なお、主論文に報告されている研究業績を中心として、関連する研究分野について試問した結果合格と認めた。