

氏名	須谷尚史
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2094号
学位授与の日付	平成11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	染色体凝縮に必須なコンデンシン複合体の構造と機能の研究

(主査)

論文調査委員 教授 柳田充弘 教授 藤吉好則 教授 西田栄介

論文内容の要旨

細胞分裂の際には染色体の分配に先だって染色体凝縮が引き起こされる。これは真核生物で普遍的に観察される現象であり、この凝縮は正確確実な分配に不可欠な前段階であると考えられている。染色体凝縮の分子機構についてはこれまでほとんど解明されておらず、関与する因子としてII型DNAトポイソメラーゼやSMCと呼ばれる一群のタンパク質が報告されているにとどまる。

分裂酵母においては2つのSMCタンパク質、Cut3とCut14が染色体凝縮に必須であること、両者は細胞内で複合体を形成して機能していることがこれまでの研究により明らかにされていた。SMCタンパク質はATP結合部位と長いcoiled-coil領域をもつ進化的に保存された核タンパク質であり、染色体凝縮や姉妹染色分体対合、遺伝子量補償やDNA組み換え修復などに関与していることが報告されている。SMCタンパク質のもつ分子活性については明らかになっていなかった。

本研究ではCut3/Cut14複合体のもつ分子活性を解明し、染色体凝縮の分子機構に迫ることを目的とした。まず分裂酵母の大量発現系を用いてCut3/Cut14ヘテロ2量体を精製し、この複合体のもつDNAに対する活性を検索した。そしてCut3/Cut14複合体が2本の相補的な単鎖DNAの再会合を促進する活性、すなわちDNA renaturation活性を有することを明らかにした。活性の強さはこの活性をもつ典型的なタンパク質である大腸菌RecAタンパク質のものよりもモル当たり70倍も強く、また活性にはCut3、Cut14の両サブユニットが必要であった。制限温度下で染色体凝縮の欠損を引き起こす*cut14-208*変異をもたせた複合体を用いるとrenaturation活性も温度感受性を示すことが見出された。この結果はrenaturation活性が、染色体凝縮を引き起こす際にCut3/Cut14の果たしている機能と密接に関係したものであることを強く示している。このことは*cut3*、*cut14*変異株のクロマチン中に単鎖DNA特異的ヌクレアーゼに感受性の部位が蓄積していることから裏付けられた。

一方、Cut3/Cut14複合体のもつ活性はrenaturation活性のみではないことも示された。Cut14のもつATP結合部位は染色体凝縮に必須の役割を担っているが、renaturation活性には必要でなかったのである。Cut3/Cut14複合体はrenaturation活性とATP依存性の未知の活性を有し、両方の活性が凝縮には必須であることが予想される。ATP依存性の活性をCut3/Cut14複合体に見出すことはこれまでできていない。複合体の分子活性の全体を理解するためにより生理的なものに近い条件で複合体の活性を調べることが必要と考えた。そこで本研究の後半では細胞周期特異的なリン酸化による活性制御と複合体に含まれる未同定のサブユニットについて研究を進めた。

有糸分裂期(M期)はCdc2キナーゼが活性化し様々な基質をリン酸化することにより誘導されることが知られる。Cut3はこのCdc2キナーゼの標的部位と予想される部位を3ヶ所有する。これらの部位がCut3の機能に重要な役割を果たしているかをアラニン変異遺伝子を用いて解析したところ、Cdc2リン酸化部位の1つThr¹⁹が染色体凝縮を引き起こすために必須であることが見出された。抗リン酸化ペプチド抗体を用いた解析によりCut3 Thr¹⁹は染色体凝縮の起こるM期中期に特

異的にリン酸化されていることが明らかになり、以上の結果からCut 3 タンパク質はThr¹⁹がリン酸化されて染色体凝縮を引き起こすために必要な活性化を受けていることが示唆された。

ショ糖密度勾配遠心においてCut3/Cut14ヘテロ 2 量体は7-13Sの沈降係数を示し、これはホロ複合体すなわち細胞内のCut3/Cut14複合体の13Sよりも小さい。細胞内の複合体にはさらにいくつかのサブユニットが含まれていることが示唆された。免疫沈降法を用いてこの複合体の同定を試みたところ、Cut 3, Cut14以外にCnd 1, Cnd 2, Cnd 3の3つのサブユニットが含まれていることが見出された。ペプチドシーケンスの結果これら3つはいずれも真核生物で保存されているタンパク質であることがわかった。特にCnd 2はBarrenと呼ばれるショウジョウバエで染色体分配に関わることの報告されているタンパク質のホモログであった。アフリカツメガエルにおいてCut 3, Cut14のホモログはコンデンシンという5量体の複合体を形成していることが報告されている。コンデンシン複合体中の2つのサブユニットXCAP-D 2, XCAP-HはCnd 1, Cnd 2と相同性があり、分裂酵母においてもコンデンシンに相当する複合体が存在することが明らかになった。Cnd 2, Cnd 3は生育に必要な遺伝子であり、その破壊株は染色体凝縮、分配の欠損を示した。新たに同定されたサブユニットも染色体凝縮において機能していることが見出された。

以上の結果をもとにCut3/Cut14複合体のもつ分子活性とそれが染色体凝縮を引き起こす機構について考察がなされた。

参考論文は分裂酵母のSMCタンパク質であるCut 3, Cut14が染色体凝縮に必須であることを示したものである。

論文審査の結果の要旨

M期染色体凝縮は染色体が分配に適したコンパクトで絡まりのない形に変化する過程であり、その欠損は遺伝情報の正確な分配を損なうと考えられている。申請者は染色体凝縮に必要なSMC複合体の分子活性の一端を明らかにし、これまで知られることの少なかった染色体凝縮の分子機構の理解に貢献した。

申請者はまず分裂酵母のSMCタンパク質であるCut 3, Cut14を複合体として精製し、この複合体が強いDNA renaturation活性をもつことを明らかにした。これは進化的に保存されたSMCタンパク質のもつ活性についての最初の報告の1つに数えられるものであり、十分評価できる。次いで申請者はcut14-208変異部位をもつ複合体が温度感受性のrenaturation活性をあらわすことを示し、この活性が染色体凝縮において重要な役割を果たしていることを強く示唆した。変異株のクロマチン中にrenaturation活性の欠如のために生じたと考えられる単鎖DNA特異的ヌクレアーゼ感受性部位が蓄積していることを見出した実験はこの結論を支持している。以上の結果はCut3/Cut14複合体のもつrenaturation活性の*in vivo*における重要性を示すものと位置づけられる。SMCタンパク質のもつ必須機能を部分的にはあるが解明した点で、その意義は大きい。さらにこれらの結果は染色体凝縮の過程において単鎖DNA領域の形成・再会合が起きているという斬新な考え方を提示しており、凝縮染色体形成の機構の研究に新たな道筋を与えた点で大変評価できる。

申請者はrenaturation活性がCut3/Cut14複合体のもつ活性の全てではないことを明らかにし、活性の全体を理解する礎となる研究を開始した。まずCut 3 タンパク質がM期中期特異的にリン酸化されており、このリン酸化部位は染色体凝縮を引き起こす上で必須であることを見出した。染色体凝縮は細胞周期M期に限ってみられる現象であり、何らかの制御が行われていることが予想されていたが、その実体は未知であった。この結果はリン酸化によるCut3/Cut14複合体の活性制御を通じて染色体凝縮が誘導されている可能性を示唆しており、大変興味深い。M期に起こる諸事象はCdc 2 キナーゼが様々な基質をリン酸化することによって誘導されると考えられているが、その具体的な基質についてはあまり明らかになっていない。Cut 3 タンパク質はその数少ない例の1つとなる可能性が高い。

また申請者は細胞内のCut3/Cut14複合体にさらに3つのサブユニットが含まれていることを見だし、その配列を同定することに成功した。それらはいずれも真核生物で保存されており、アフリカツメガエルにおいても染色体凝縮に必要なSMCタンパク質と複合体を形成していることが報告されているタンパク質であった。申請者の得た結果は染色体凝縮に必要な複合体が進化を通じて保存されていることを明らかにしており、このSMC複合体が普遍的基本的な細胞内機能を担っていることを示した点で重要である。また申請者は少なくともCnd 2, Cnd 3の2サブユニットが染色体凝縮・分配に機能していることを見出したが、この結果はこれらのサブユニットも凝縮に関わる機能をもっていることを初めて確認した点、またCnd 3については初めてその細胞内機能を明らかにした点で評価できる。

以上、申請論文は染色体凝縮に必須なSMC複合体の必須機能の一端を解明し、また複合体のリン酸化による活性制御やホロ複合体中の他のサブユニットを明らかにすることに成功した。本研究で得られた知見は、染色体凝縮の分子機構の理解を推進するものと考えられる。また、SMCタンパク質はDNAの関わる広範な事象に関与することが近年明らかになってきているタンパク質ファミリーであるが、その分子活性の理解にも本研究は大きな貢献をなしていると考えられる。よって、本論文は理学博士の学位論文として価値あるものと認める。

なお、主論文および参考論文の報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、合格と認めた。