

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	参鍋 (赤井) 祐子
論文題目	分裂酵母コンデンシンの染色体分配における分子機能の研究		
(論文内容の要旨)			
<p>コンデンシンタンパク質複合体は染色体凝縮を始めとした染色体ダイナミクスとDNAメタボリズムに必要であることはよく知られているが、その分子メカニズムについては未だ分かっていないことが多い。本研究では、分裂酵母を用いてコンデンシンSMC2/Cut14サブユニットの新しい温度感受性変異株 <i>cut14-Y1</i> を単離した。コンデンシン複合体はSMCサブユニットヘテロ二量体とnon-SMCサブユニット三量体からなる五量体として存在している。<i>cut14-Y1</i> は、コンデンシンサブユニットのうちSMCサブユニットに変異を持ち、且つDNA損傷修復と染色体分離の両方に欠損を示す初めての変異体であった。<i>cut14-Y1</i> の変異部位はCut14タンパク質のヒンジ部位の保存された領域に位置しており、ロイシンがセリンに置換されたミスセンス変異であった。興味深い事に <i>cut14-Y1</i> の許容温度におけるDNA損傷修復欠損と、制限温度におけるM期の染色体凝縮欠損表現型は、一本鎖DNA結合タンパク質ヘテロ三量体Replication protein A (RPA) のラージサブユニットSsb1変異株 <i>ssb1-418</i> と二重変異にすることによって抑制された。<i>cut14-Y1</i> 細胞ではSsb1-YFPが核小体領域に点状局在し、その点状局在が残存したまま分裂期に進入してしまうことが生細胞観察から示されたが、野生株同様に、<i>cut14-Y1 ssb1-418</i> 二重変異株ではこの点状局在は抑制されていた。クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイにおいても、<i>cut14-Y1</i> 変異株のrDNA領域にSsb1が蓄積している事が示された。以上の <i>in vivo</i> での結果に加えて、コンデンシン五量体またはSMC二量体を分裂酵母内で大量発現させ、そこから得られた精製タンパク質を用いて一連の <i>in vitro</i> の実験を行った結果、コンデンシンの持つDNAアニーリング活性によって、一本鎖DNAに予め結合させておいたRPAがアニーリングの過程でDNA上から除去され、二本鎖DNAが生成することが分かった。同様にして一本鎖DNAに予め結合させたおいたRNAもDNA上から除去された。また、<i>cut14-Y1</i> 変異を持つSMC二量体タンパク質ではDNA結合活性とDNAアニーリング活性が低下していることを見いだした。さらに <i>ssb1-418</i> 変異を持つRPA三量体は一本鎖DNA結合活性が低下していること、<i>ssb1-418</i> 変異型RPAは <i>cut14-Y1</i> 変異型SMC二量体で除去されやすい事が分かった。驚いた事に、<i>cut14-Y1</i> の温度感受性を相補する16個のサプレッサー変異は、全てCut14ヒンジドメイン内に位置することが分かった。以上の結果から、コンデンシンはそのヒンジ領域を必須としたDNAアニーリング活性を介して、染色体上の不要な結合物を除去し、DNA修復の完了や分裂期染色体分配段階に寄与していることが示された。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

M期染色体凝縮は細胞周期において、正確な遺伝情報の維持に重要な生命現象であり、この過程にはコンデンシン複合体が必須の役割を担う事が知られているがその分子活性は不明である。さらにコンデンシン複合体は間期においても様々な機能を担っている事が多数報告されているが、コンデンシン複合体がM期染色体凝縮機能と間期機能において共通する活性を利用して働いているのかどうか分かっていない。申請者はこの課題に取り組むため、分裂酵母におけるコンデンシンサブユニット変異株の解析と、コンデンシンタンパク質の生化学的解析を中心に研究を進めてきた。

申請者はまず分裂酵母コンデンシンSMC2/Cut14サブユニットの新規温度感受性変異株 *cut14-Y1* を単離した。そして *cut14-Y1* 変異株が間期DNA損傷修復とM期染色体分離の両方に欠損をもち、そのどちらの表現型もRPAのラージサブユニットSsb1変異株 *ssb1-418* と二重変異にすることによって抑制されることを見いだした。さらにRPAの局在観察を行う事で、M期凝縮染色体からRPA点状局在を除くためにコンデンシンが必要である事を示した。一方、一連の *in vitro* の実験ではコンデンシン精製タンパク質が一本鎖DNAに作用すること、DNAアニーリング活性を利用して一本鎖DNAからRPAを除去し、二本鎖DNAを生成させる活性を持つことを明らかにした。さらにコンデンシンタンパク質はRPA以外の一本鎖結合因子(大腸菌SSBやRNA)もDNA上から除去できる事を示した。*cut14-Y1* 変異型コンデンシンタンパク質ではこれらの活性が低下していたことから、除去活性がコンデンシン機能に重要であることを証明した。また、*cut14-Y1* 変異株の変異部位が保存されたヒンジ領域に存在することや、*cut14-Y1* の温度感受性を相補する16個のサプレッサー変異が全てCut14ヒンジドメイン内に位置したことから、コンデンシンのヒンジ領域はコンデンシン活性に重要なドメインであることも示した。

申請者は以上の結果から、コンデンシンはそのヒンジ領域を必須としたDNAアニーリング活性を利用して、染色体上の不要な結合物を除去し、間期DNA修復の完了や分裂期染色体分配に寄与していると結論した。申請者の研究成果は、コンデンシン複合体が間期からM期にかけ、またM期を通じて、染色体を夾雑物のない状態に維持する働きを持つ事を示唆しており、本研究はコンデンシンの基本活性の解明に貢献した研究として評価できる。

論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。平成24年2月3日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： \_\_\_\_\_ 年 \_\_\_\_\_ 月 \_\_\_\_\_ 日