

(続紙 1)

京都大学	博士 (生命科学)	氏名	堀越 保則
論文題目	Analyses of the Substrate-Selective Ubiquitination of Mitotic Regulators and its Involvement in Silencing the Spindle Assembly Checkpoint (基質選択的な有糸分裂制御因子のユビキチン化機構とその紡錘体チェックポイント解除への関与の解析)		
(論文内容の要旨) <p data-bbox="181 584 1447 929">有糸分裂において紡錘糸は各染色体を娘細胞に誘導するという重要な役割を担う。染色体が均等分配されるためには、姉妹染色分体の解離に先立ち、全ての染色体の動原体に紡錘糸が接続されなければならない。紡錘体チェックポイント(SAC: Spindle Assembly Checkpoint)は、均等な染色体分配を保障する監視機構である。動原体への紡錘糸接続が完了していない際に、姉妹染色分体の解離を防ぐことが主な機能である。SACの主要因子であるMad2タンパク質は、有糸分裂期の進行に必須なE3ユビキチンリガーゼ (APC/cyclosome) の活性化因子である分裂酵母Slp1 (他生物のCdc20の相同体) を標的として結合し、その活性を抑制する。一旦、活性化されたSACは、最後の動原体に紡錘糸が接続されると速やかに解除され、姉妹染色分体が解離する。</p> <p data-bbox="181 976 1447 1473">申請者は、これまで未解明であったSACの解除因子の同定と、その機能解析を目指し、遺伝学的スクリーニングを行った。Mad2タンパク質を条件的に発現できる分裂酵母株を作製し、Mad2発現時には高温感受性を示し、その増殖が有糸分裂期で停止する一方、Mad2非発現時には正常に増殖できる変異体を単離した。すなわち、これらの変異体は、Mad2依存的なSACが解除できなければ増殖停止する。これらの変異体の一つについて詳細な解析を行なった結果、その原因遺伝子は、APC/cyclosomeの前段階で機能するE2酵素Ubc11をコードすることが判明した。分裂酵母の有糸分裂期には2種のE2酵素 (Ubc4とUbc11) が機能することが知られている。Ubc4の変異体である <i>ubc4-P61S</i> と、本研究で単離したUbc11の変異体 (<i>ubc11-P93L</i>) において、APC/cyclosomeの基質であるサイクリン、セキュリン、そしてSlp1の挙動を観察した結果、サイクリンとセキュリンのユビキチン化には、Ubc4とUbc11とが関与するが、Slp1のユビキチン化にはUbc11が選択的に要求されることが判明した。また細胞内においてSlp1がUbc11依存的にユビキチン化されることも示した。</p> <p data-bbox="181 1520 1447 1668">これまで、APC/cyclosome自体が基質を選択し、そのユビキチン化の時期を決定するものと考えられていた。本研究の結果は、APC/cyclosomeの前段階で機能するE2酵素も基質選択性を有すること、さらにUbc11は、SACの標的であるSlp1のユビキチン化を促進することでSACの解除に機能することを示唆した。</p>			

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

分裂期の進行においてユビキチンE3ライゲース (Anaphase Promoting Complex or Cyclosome : APC/C) は中核的な役割を果たす。今回申請された学位論文では、APC/Cの前段階で機能する2種類のユビキチン結合酵素(E2)が、一方は分裂期を進行させるためのタンパク分解を担い、また他方は紡錘体チェックポイント(SAC: Spindle Assembly Checkpoint)の解除を担う、というそれぞれ独自の機能を有していることを提唱した。

申請者はSACが速やかに活性化あるいは不活性化されうる機構であること、また紡錘糸に損傷を与えない限り活性化状態を観察できないことから、SACを解除する機構が存在するのではないかと考え、SACの解除に関わる因子の同定を試みた。2つのパートから構成された内容で報告を行い、前半では、分裂酵母の遺伝学的手法を用い、SACが機能的である遺伝的背景でのみ高温感受性を示す変異株を単離すべくスクリーニングを行ったことを示した。SACはAPC/Cの活性化因子の1つであるSlp1と、チェックポイント因子であるMad2が結合することでAPC/Cの活性を抑制するという機構であり、解除因子に欠損が生じると、このSlp1-Mad2複合体が蓄積すると考えられる。目的遺伝子の性質を考慮しても、スクリーニングの各指標は妥当なものであると思われた。申請者は単離された変異株の中でも、APC/Cとともに機能するE2、Ubc11が原因遺伝子の株に興味をもち、解析を進めたことを後半のパートで報告した。APC/Cとともに機能するもう1つのE2、Ubc4の既存の変異株との比較を通して、同じE3と機能するE2でありながら、それぞれの変異細胞内でAPC/Cの各基質は全く異なった挙動を示すことを見出した。Ubc11はSlp1の安定性に特異的に寄与すること、SACが活性状態にあるときもSlp1は不安定であることを示したうえで、SAC活性時にSlp1-Mad2複合体を不安定化させることで、SACを速やかに解除するというUbc11の分子機能を示唆した。

以上の研究内容より、申請者はE2がAPC/Cの基質選択性に関与し、さらにその特性が分裂期におけるAPC/Cの活性を制御しうる、という新たな見解を示した。これは、分裂期やAPC/Cに限らず、今後のユビキチン研究の発展に貢献しうる意義のある研究であると考えられる。

よって本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認めた。更に、平成25年4月12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