

氏 名	もり した じゅん 森 下 純
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2409 号
学位授与の日付	平 成 13 年 11 月 26 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	分裂期の進行に連動した染色体とスピンドル微少管の動態制御に必須な 分裂酵母 Birl/Cut17の研究
論文調査委員	(主 査) 教 授 柳 田 充 弘 教 授 上 村 匡 教 授 宮 田 隆

論 文 内 容 の 要 旨

真核生物の有糸分裂における一連の劇的な構造変化は、多数のタンパク質が関与する極めて複雑な過程であり、未だに未知の領域を多く残す興味深い研究分野である。

申請者は分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* をモデル系として、姉妹染色体分配に欠損を示す一連の温度感受性変異株のうち *cut17-275* 変異株の詳細な解析を行い、Cut17 タンパク質の機能を探索した。

cut17 変異株は許容温度で DNA 合成阻害剤であるヒドロキシ尿素、UV 照射、さらには微小管合成阻害剤である TBZ に超感受性を示すという非常に特徴的な表現型を示した。DNA 複製チェックポイントや傷害チェックポイントに関与する遺伝子がヒドロキシ尿素、UV 照射に超感受性を示すことが報告されていることから、チェックポイントに関わるタンパク質であることが期待されたが、*cut17* 変異株ではチェックポイント機構は維持されているものの、傷害を受けた DNA を除去する DNA 修復に欠損をもつことを明らかにした。しかし同調培養実験の結果は、Cut17 タンパク質が M 期で必須の機能を果たすことを示唆していた。遺伝子のクローン化、塩基配列の決定により *cut17⁺* 遺伝子産物はその N 末端領域に 2 つの BIR モチーフを有しており、*bil1⁺/pbh1⁺* と報告された遺伝子と同一の遺伝子であることが判明した。BIR モチーフは酵母からヒトまで高度に保存されたモチーフであり、このモチーフを含むタンパク質は酵母においては Birl/Cut17 のみであるが、哺乳動物においては複数存在することが報告されている。それらは、Birl/Cut17 の機能的なホモログであることが予想される M 期で機能する survivin と、アポトーシスの阻害に機能する IAPs (inhibitor of apoptosis proteins) の 2 つのグループに分けられると現在のところ考えられている。

申請者は Birl/Cut17 タンパク質の M 期の機能についての詳細な解析をおこなった。FISH 法により、*cut17* 変異株が染色体凝縮に欠損をもつこと、これが染色体凝縮に必須なコンデンシンサブユニットが核へ蓄積できないことによることを明らかにした。また生細胞観察により *cut17* 変異株が後期スピンドル伸長にも欠損を示すことを明らかにした。さらに Cut17 タンパク質の大量発現によって動原体タンパク質の変異株である *mis6* や *mis12* と同様の姉妹染色体の不均等分配が引き起こされることを見いだしており、Birl/Cut17 タンパク質が動原体でも機能していることを示唆した。実際に、Birl/Cut17 タンパク質の局在はこれら多岐にわたる機能を反映するかのような劇的なものであった。間接蛍光法により Birl/Cut17 タンパク質の局在を観察すると、間期、M 期とも核に局在するが、M 期中期には動原体領域に強くシグナルが検出され、M 期後期に染色体が分離するとスピンドルの中央領域にその局在を変化させる。このような局在変化は、INCENP、オーロラキナーゼなどの染色体パッセンジャータンパク質と極めて類似していた。クロマチン免疫沈降 (CHIP) 法を用いた実験から、Birl/Cut17 は M 期初期には動原体の外側の領域に結合することが示された。

さらに本研究室で同定された分裂酵母オーロラキナーゼ相同タンパク質 Ark1 の局在が、M 期で Cut17 タンパク質と共局在すること、その局在には Birl/Cut17 タンパク質が必要であることを明らかにした。驚くべきことに、両タンパク質の動原体局在は姉妹染色体間での対合に必須な Mis4 や Rad21 に依存していることを見いだした。この結果は、M 期中期・

後期遷移における Bir1/Cut17, Ark1 タンパク質の動原体からスピンドルへの局在の移行が、姉妹染色分体間の対合の状態によって制御されていることを示唆している。

以上の結果から申請者は、Bir1/Cut17, Ark1 は染色体パッセンジャータンパク質としての挙動を示すが、これらは DNA 修復、染色体凝縮、動原体微小管の形成、スピンドル伸長といった素過程に必要な因子を必要な時期にリクルートし、それらの過程を促進する因子として機能しているというモデルを提案した。

論文審査の結果の要旨

本論文では分裂酵母 Bir1/Cut17 タンパク質の機能を遺伝学的、細胞生物学的手法を用いて探索したものである。本研究では、Bir1/Cut17 タンパク質、さらには分裂酵母オーロラキナーゼ Ark1 タンパク質の細胞局在が、これまで高等真核生物においてのみ知られていた染色体パッセンジャータンパク質と同様であることを示した。染色体パッセンジャータンパク質は M 期で染色体から動原体、そしてスピンドルの中央領域へとその局在を変化させるタンパク質として定義される。

本論文は、Bir1/Cut17 タンパク質が DNA 修復に必須の機能を果たすこと、染色体凝縮に必須であるコンデンシンの M 期での核への蓄積に必要であること、さらに後期スピンドル伸長に必須の機能を果たすことを明らかにした。また、Ark1 タンパク質の細胞内局在が Bir1/Cut17 に依存していることを明らかにした。さらに、Bir1/Cut17 タンパク質の大量発現によって不均等な姉妹染色体分配が引き起こされることは、染色体パッセンジャータンパク質が動原体機能に関与していることを示唆している。分裂酵母の動原体 DNA は非常に巨大であり、染色体分配に必須な中央領域と、必須ではないが重要な機能を果たす外側の領域からなる。本研究において、Bir1/Cut17 タンパク質が動原体の外側の領域と相互作用することを明らかにした。

姉妹染色分体は、DNA 複製後から M 期中期・後期遷移まで対合しているが、これにはコヒーシタンパク質複合体が必須であることが知られている。極めて興味深いことに、本論文は Bir1/Cut17, Ark1 タンパク質の動原体からスピンドルへの局在変化がコヒーシンに依存的であること示した。これは染色体パッセンジャータンパク質の局在の制御が、姉妹染色分体の対合状態を認識している事を示唆している点で重要である。

本論文は、分裂酵母分子遺伝学を駆使して、これまで独立していると考えられていた M 期の素過程—染色体の動態、動原体機能と微小管動態—が、染色体パッセンジャータンパク質という高度に保存されたタンパク質群によって制御され、促進されることを示した点で非常に画期的であり、今後の染色体、動原体の制御機構解明に大きく貢献するだけでなく、この分野に新しい展開をもたらすことが期待され、高く評価できる。

よって本論文は博士（理学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、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。