

氏 名	まつ 村 たく ひろ 松 村 拓 洋
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	理 博 第 2698 号
学位授与の日付	平 成 15 年 5 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	染色体分配に必須なセパレーズ, セキュリンと相互作用する新規遺伝子 産物の探索

論文調査委員 (主 査) 教 授 柳 田 充 弘 教 授 大 野 陸 人 教 授 藤 吉 好 則

論 文 内 容 の 要 旨

1015株の分裂酵母の高温感受性変位株の中から, *cut1*⁺/separase, あるいは*cut2*⁺/securin 遺伝子を発現する多コピープラスミド (pCUT1, pCUT2) を導入することによって, 生育が抑制される変異株を18株単離した。(湯浅氏, 小原氏による) 本研究では, これらの株のうち, プラスミドを持たない状態において, 制限温度で凝縮染色体を示す6つの変異株の原因遺伝子の同定を試みた。分裂酵母ゲノムDNAライブラリーを導入して, これらの変異株の原因遺伝子のクローニングを試みた結果, これらの6つの株の全てから, APC/サイクロソームに関連する遺伝子を含むプラスミドが得られた。さらに, 遺伝学的解析により, これらのうち5株は, *cut9* (2株), *cut20*, *cut23*, *cut8* の変異体であることを確かめた。残る1株も, *apc10* 変異体である可能性が高い。

今回単離したAPC/サイクロソーム変異株に, pCUT1およびpCUT2を導入したときの表現型を観察したところ, これらは, APC/サイクロソーム変異株に典型的な“cut”やdisplaced nucleus, 分裂期での停止といった表現型とは違う表現型を示した。pCUT1を導入した細胞では, 複数の隔壁を持つ細胞が多く見られた。また, pCUT2を導入した細胞では, 伸長した間期様の細胞が観察された。さらに, これらの株におけるpCUT1による生育阻害には, Cut1タンパク質のプロテアーゼ活性部位が必要であることも明らかになった。

これらは, Cut1/セパレーズとAPC/サイクロソームの間に, セパレーズ活性に依存的に, 何らかの機能的なリンクがあることを強く示唆している。また, Cut1/セパレーズとCut2/セキュリンによるAPC/サイクロソーム変異体に対する阻害効果には, はっきりとした違いがあることが明らかになった。セパレーズ, セキュリンとAPC/サイクロソームの関係で, これまで未解明だった部分について, 考察したい。

同時に, 本研究では, APC/サイクロソーム変異株の多コピーサプレッサーを多数単離した。それらのうちのいくつかは, これまでAPC/サイクロソーム変異株の多コピーサプレッサーとしては知られていなかった。それらの生理的機能は多岐にわたり, 14-3-3ホモログをコードする*rad25*⁺, *rad24*⁺や, RNA結合タンパク質をコードする*csx1*⁺, 熱ショックタンパク質*skp2*⁺, GSK3ファミリーに属するキナーゼをコードする*gsk3*⁺/*skp1*⁺が含まれていた。とくに, *rad25*⁺, *rad24*⁺は, 高温下で崩壊したAPC/サイクロソーム複合体を回復しているのではなく, ほかの経路により高温感受性を抑圧していることが明らかになった。これらの多コピーサプレッサーの研究を通じて, APC/サイクロソームの機能やその制御に対する理解が, より深まることが期待できる。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者は, 姉妹染色分体の分離に必須なセパレーズ, セキュリンと相互作用をする新たな因子を発見することを目的にして研究を行った。セパレーズは, 保存されたプロテアーゼドメインを持つタンパク質であり, セキュリンはセパレーズの制御因子である。申請者は, セパレーズ, セキュリンの過剰発現によって, 生育が阻害される分裂酵母の変異株のうち, 制限

温度で分裂期中期に停止する株に注目して、それらの原因遺伝子の特定を試みた。

その結果、それらの変異株が、APC/サイクロソーム変異株、および、*cut8*変異株であることを明らかにした。APC/サイクロソームと*cut8*は、いずれも、セキュリンやサイクリンのポリユビキチン化とタンパク質分解に関わる因子である。そして、本論文では、セパレースの過剰発現によるAPC/サイクロソーム変異株の生育阻害が、セパレースのプロテアーゼ活性に依存することを見出した。

さらに、セパレーズ、セキュリンの過剰発現によって、生育が阻害されたAPC/サイクロソーム変異株が、予想外の細胞の形態を示すことを明らかにした。セパレーズを過剰発現させたAPC/サイクロソーム変異株は、隔壁が多数形成される表現型を示した。この表現型は、セパレーズ活性に依存して現れた。また、セキュリンを過剰発現させたAPC/サイクロソーム変異株は、細胞が異常に伸長した表現型を示した。

セパレーズは、保存されたプロテアーゼドメインを持つことが知られている。しかし、セパレーズの基質は、これまでに限られた数しか報告されていない。現在までに知られているセパレーズの基質や機能からは、本論文によって報告された、予想外の細胞の表現型を説明することはできない。また、本論文は、セパレーズ、セキュリンの増量による表現型がそれぞれ異なることから、セパレーズ、セキュリンの機能の違いを指摘した。このように、本論文は、セパレーズ、セキュリンとAPC/サイクロソームの間に、現在の知見では説明できない相互作用が存在することを報告し、これらのタンパク質の未知の機能の存在を示唆した。

同時に、APC/サイクロソーム変異株の温度感受性を相補する、これまでに知られていない多コピーサプレッサーを多数、単離した。それらの中には、14-3-3タンパク質や、進化上、保存されているキナーゼ、ホスファターゼが含まれており、いずれも、生物学上、広く研究が行われている重要なタンパク質である。本論文は、これらの因子とAPC/サイクロソームの新たな遺伝的相互作用を報告することによって、今後、APC/サイクロソームの研究を行う上で、重要な手がかりを示した。

また、本論文は、新しいアプローチを用いたゲノム規模の研究の一環として行われた。セパレーズ、セキュリンの過剰発現による生育阻害と、制限温度における表現型を指標にして、1015株に及ぶ温度感受性変異株から選択された6株が、いずれも、サイクリン、セキュリンのタンパク質分解に関わる遺伝子の変異株であることを明らかにした。このことから、この研究で用いられたゲノム規模の新しい研究手法によって、特異性の高い結果が得られることを示した。ポストゲノム時代では、このようなゲノム規模の研究手法は、ますます重要になっている。

本論文の成果は、Genes to Cells誌8巻4号に公表される予定である。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。論文内容とそれに関連した試問の結果、合格と認めた。