

氏 名	熊 田 和 貴
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2091 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	細胞周期 M 期後期を起動する APC/サイクロソーム及び Cut 1 /Cut 2 複合体の分子機能の探求

(主査)

論文調査委員 教授 柳 田 充 弘 教授 米 原 伸 教授 西 田 栄 介

論 文 内 容 の 要 旨

細胞周期のM期後期は染色体分離やMPF活性の低下、スピンドルの伸長などが協調的に進行する重要な時期であり、その開始は厳密に制御されている。本研究では前半でユビキチン依存的タンパク質分解を制御してM期後期全体を起動しているAPC/サイクロソームの解析を、後半ではAPC/サイクロソームの基質となるCut 2 タンパク質を含み、染色体分離に必須なCut 1 /Cut 2 複合体に焦点を絞り、その分子機能の探求を行った。

まず、分裂酵母Nuc 2, Cut 9 タンパク質がAPC/サイクロソームに相当する沈降係数約20Sの複合体(20S複合体)に含まれることをショ糖密度勾配遠心法を用いて確認し、さらに、Nuc 2, Cut 9 タンパク質がこの複合体の形成に必須であることを示した。また、細胞周期変異株等を用いた解析を行い、この複合体の活性が、量の変動ではなく、M期特異的な調節因子の付加やリン酸化/脱リン酸化等の修飾により制御されていることを示唆する結果を得た。次に、この複合体と相互作用する因子の同定を目指して、*nuc 2*変異ならびに*cut 9*変異を相補する遺伝子をそれぞれ分離した。*cut 9*変異を相補するとして同定したHcn 1 タンパク質は80アミノ酸の小さなタンパク質であり、20S複合体の安定性に関わる新たなサブユニットであることが明らかになった。また、*nuc 2*変異を相補する遺伝子は、偶然にも、1型ホスファターゼ(PP1)と密接な関係を持つ因子として当研究室で独立に得られていた*sds23⁺*遺伝子と同一であった。Sds23タンパク質は本研究の後半で扱った染色体分離に必須なCut 1 /Cut 2 複合体とも密接な関係をもち、M期後期の進行全体に広範な影響を与える新しい因子と考えられた。

後半では、まず様々な部分欠失Cut 1 タンパク質を用いて、Cut 2 タンパク質がCut 1 タンパク質のN末領域と結合することを示した。次に、クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質(GFP)を用いて細胞が生きたままの状態を観察することで、Cut 1 タンパク質が、今まで知られていたM期中期のスピンドルだけでなく、M期後期のスピンドルにも存在することを見出した。このCut 1 タンパク質のM期後期スピンドルへの局在とCut 1 タンパク質の機能との間には相関が見られた。また、Cut 1 タンパク質のスピンドルへの局在にはCut 2 タンパク質との結合が不可欠であった。非分解型のCut 2 タンパク質は姉妹染色体分離を抑制することが知られており、本研究の結果を合わせると、Cut 2 タンパク質はM期の始まりとともにCut 1 タンパク質をスピンドルに局在化させ、その後M期中期までCut 1 タンパク質の機能を抑制していると考えられた。M期後期にNuc 2, Cut 9 タンパク質を含む20S複合体の働きに依存してCut 2 タンパク質が分解されると、Cut 1 タンパク質が活性化して、スピンドル上で姉妹染色体の分離に機能していると思われる。また、Cut 1, Cut 2 タンパク質が形成する複合体が沈降係数30S及び40Sの巨大なものであることを見出し、この複合体の精製とその性質の解析も行った。

参考論文1では分裂酵母APC/サイクロソームのサブユニットとしてのNuc 2, Cut 9 タンパク質の機能とHcn 1 タンパク質の同定に関する研究成果を報告している。参考論文2はM期後期開始に必須なPP1とAPC/サイクロソームをつなぐ新規因子としてのSds23タンパク質の機能を報告したものである。参考論文3ではCut 1 タンパク質とCut 2 タンパク質が複合

体を形成し、強調して姉妹染色分体分離に機能していることを、参考論文4ではAPC/サイクロソーム依存的なCut 2タンパク質の分解の姉妹染色分体分離への必須性について報告している。参考論文5は分離酵母APC/サイクロソームの新規サブユニットとしてCut 4タンパク質の同定とその変異に関する研究成果の報告である。

論文審査の結果の要旨

細胞周期のM期中期から後期への移行に際しては、M期サイクリンの分解によるMPF活性の低下や、スピンドル微小管の伸長開始、対合していた姉妹染色分体の分離などが一斉に進行する。このM期中期から後期への細胞周期の進行にはユビキチン依存的なタンパク質分解が必須であり、サイクロソームもしくはAPC (Anaphase Promoting Complex) と呼ばれる沈降係数20Sの複合体による基質タンパク質のポリユビキチン化により制御されることが知られている。分裂酵母の姉妹染色分体の分離にはAPC/サイクロソームに依存したCut 2タンパク質のポリユビキチン化とそれに続く分解が必須である。

申請者は、以前にM期中期から後期への移行に必須であるとして同定されていた分裂酵母Nuc 2タンパク質とCut 9タンパク質がAPC/サイクロソームに相当する沈降係数20-23Sの複合体に含まれていることを示した。これにより、Nuc 2, Cut 9タンパク質をとおして分裂酵母APC/サイクロソームの解析が可能となった。

次に申請者は、Cut 9タンパク質のM期特異的なリン酸化が、この複合体に含まれているCut 9タンパク質にのみ起こることを示すとともに、1型ホスファターゼ (PP1) であるDis 2ホスファターゼの変異ならびに二重特異的キナーゼであるDsk 1キナーゼの変異とcut 9変異とが遺伝学的な相互作用を示すことを明らかにした。これらの結果はAPC/サイクロソームの活性がサブユニットのリン酸化・脱リン酸化により制御されていることを示唆するものである。申請者は活性を抑制するリン酸化の存在とその脱リン酸化によるAPC/サイクロソームの活性化のモデルを提唱しており、興味深い。

申請者はNuc 2, Cut 9タンパク質がAPC/サイクロソームの形成に必須であることを示すと同時に、APC/サイクロソームの安定化に関わる新規のサブユニットHcn 1タンパク質を同定した。これらの結果はAPC/サイクロソームの構造とその形成に対する理解を深めるものとして評価できる。

また、申請者はPP1の変異を相補することが既に知られていたsds23⁺ 遺伝子が、APC/サイクロソームの各サブユニットの変異、ならびにAPC/サイクロソームの基質を含むみ染色体の分離に機能するCut 1/Cut 2複合体の変異をも相補することを明らかにした。Sds23タンパク質はCBSドメインが繰り返した構造をもち、PP1, APC/サイクロソーム, Cut 1/Cut 2複合体のいずれにも直接には含まれていなかった。これらの結果はSds23タンパク質がM期後期の進行を調節する新規の制御因子であることを示しており、その機能の解明によりPP1, APC/サイクロソーム, Cut 1/Cut 2複合体による一連のM期後期開始機構の理解が深まるものと期待される。

続いて申請者はAPC/サイクロソームの基質であるCut 2タンパク質と染色体の分離に必要なCut 1タンパク質の結合領域を決定した。Cut 1タンパク質とCut 2タンパク質の結合は既に知られていたが、この解析によりCut 2タンパク質はCut 1タンパク質のN末領域に結合することが明らかになった。さらに申請者は温度感受性変異Cut 2タンパク質ではCut 1タンパク質との結合に問題があることを示した。また、申請者はクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質 (GFP) を用いることでCut 1タンパク質の局在を観察し、Cut 1タンパク質がSPBならびにスピンドルに局在することを示した。さらにCut 2タンパク質との結合領域のみでスピンドルに局在すること、この局在がCut 2タンパク質に依存していることを示した。これらの結果はCut 2タンパク質がCut 1タンパク質のN末領域に結合してスピンドルに局在化させる機能を果たしていることを示しており、Cut 2タンパク質の染色体分離に果たす役割の一部を明らかにしたものとして評価できる。

次に申請者はCut 1タンパク質の機能とM期後期スピンドルへの局在に相関があること、このM期後期スピンドルへの局在にはCut 1タンパク質の種間で保存されたC末領域が重要であることを示した。これはCut 2タンパク質がAPC/サイクロソーム依存的に分解されたM期後期のスピンドル上で、Cut 1タンパク質が染色体の分離に機能していることを示唆しており、染色体の分解機構を考える上で興味深い。

さらに、申請者はCut 1, Cut 2タンパク質が沈降係数30S, 40Sの複合体を形成していることを示し、この複合体を精製してその塩に対する安定性などの性質を解析した。これらの結果は染色体分離機構の分子レベルでの解明を目指す初期の試みとして評価でき、今後の解析が期待される。

以上、申請論文は分裂酵母APC/サイクロソームの同定とその制御機構の解析、ならびにAPC/サイクロソームの下流で染色体の分配を制御するCut 1/Cut 2複合体の機能解析を行い、Cut 1/Cut 2複合体がスピンドル機能を通して姉妹染色分体の分離を制御する機構の存在を示唆した。本研究で得られた知見は、細胞周期のM期中期から後期への進行を制御し、染色体の分離を開始する機構の理解に大きく貢献したと考えられる。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、主論文及び参考論文に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。