

氏 名	木 全 諭 宇
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 18 号
学位授与の日付	平 成 16 年 5 月 24 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	生 命 科 学 研 究 科 統 合 生 命 科 学 専 攻
学位論文題目	細胞分裂期後期の進行に必須な APC/cyclosome 複合体の新規制御機構の探索

論文調査委員	(主 査) 教 授 柳 田 充 弘	教 授 清 水 章	教 授 米 原 伸
--------	----------------------	-----------	-----------

論 文 内 容 の 要 旨

真核生物の細胞が細胞周期 M 期から脱出するためには、M 期サイクリンの分解が必須であり、姉妹染色体分離には、セキユリンの分解が必須である。これらのタンパク質の分解は、ユビキチン経路とよばれるタンパク質分解機構により行われており、M 期にサイクリンやセキユリンをポリユビキチン化し、分解の制御を行っているのが、APC/cyclosome (APC/C) である。しかし、その細胞周期を通じた機能の制御メカニズムについては、まだ明らかとなっていないことが多い。申請者は、分裂酵母の APC/C サブユニットの変異株を用いて、変異株の温度感受性を相補する抑制変異や薬剤などについて解析を行うことにより、APC/C の新規制御機構の発見を試みた。

第一部では、APC/C 変異株 *cut9-665* の温度感受性の抑制変異 *scn1*, *scn2* について解析を行っている。*scn1*, *scn2* 変異株の低温下での表現型を詳細に観察した結果、細胞周期の M 期に致死となること、M 期後期 B でのスピンドル伸長が遅延していることを示し、M 期後期にスピンドル伸長が完了していないにも関わらず、隔壁が形成されるため、染色体が正しく分配されないことを明らかにした。また、*scn1*, *scn2* 変異株の原因遺伝子の同定を行った。変異部位のマッピング、変異株のゲノム DNA の塩基配列決定を行い、*scn1*, *scn2* 変異株の原因遺伝子がともに、アラニン tRNA (UGC) 遺伝子であることを示した。その結果から、*scn1*, *scn2* 変異による *cut9-665* 変異株の温度感受性相補がミスセンス抑圧によるものであることが予想された。また、*scn1*, *scn2* 変異株の多コピーサプレッサーである *scn3⁺* 遺伝子の解析を行い、その遺伝子破壊株が、カナバニンや変異 tRNA の発現に感受性を示し、シクロヘキシミドに対しては耐性であることを発見した。それらの結果をもとに、申請者は、*scn1*, *scn2* 変異が M 期後期に顕著な表現型を示す理由と、*Scn3* タンパク質の生理機能について考察を行っている。

第二部では、APC/C 変異株がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 阻害剤 TSA により温度感受性を強く相補されることを発見し、その相補のメカニズムについて解析を行った。TSA を培地へ添加することにより、APC/C 変異株 *cut4-533* の M 期中期停止表現型は抑圧された。この抑圧現象は、TSA 以外の HDAC 阻害剤によっても観察された。さらに、APC/C 変異株においては崩壊している沈降係数 20S の APC/C 複合体が、TSA 添加により回復することを示した。また、分裂酵母の HDAC 遺伝子の変異株と、APC/C 変異株との遺伝的相互作用を調べた結果、Clr6 の変異に特異的に、APC/C 変異株の温度感受性が相補されることを発見した。さらに、TSA 添加時と同様に、Clr6 の変異により APC/C 変異株中の 20S の APC/C 複合体が回復することを示しており、HDAC Clr6 が APC/C 複合体の機能制御に関与していることが示唆されている。また、TSA による APC/C 変異株の相補には、Mad2 や PKA、また、ヘテロクロマチン形成に関与する Swi6 や Dcr1 は必要ではないことを示し、APC/C の制御機構は、今まで知られていない Clr6 の新たな機能であることが予想される。さらに質量分析計による解析の結果、APC/C サブユニットの一つである Cut23 タンパク質が、細胞内でアセチル化されていることを示した。これらの結果をもとに申請者は、サブユニットタンパク質、あるいはヒストンのアセチル化による APC/C の新規制御機構を考察において提唱している。

論文審査の結果の要旨

細胞周期 M 期の進行において、M 期サイクリンの分解は M 期からの脱出に必要であり、セキュリンの分解は、M 期中期から後期への移行に必須である。これらのタンパク質の分解は、ユビキチンリガーゼ APC/C により制御されていることが明らかとなっており、M 期進行の分子メカニズムを理解するためには、APC/C の機能制御機構の解明が必要不可欠である。近年、精力的な研究が数多くなされているが、APC/C の活性制御機構については、いまだ明らかとなっていないことは多い。そこで申請者は、遺伝学的解析が行えるという分裂酵母の利点を生かし、APC/C の変異株の温度感受性を相補する因子の同定・解析を行い、APC/C の新規制御機構の発見を試みた。

第一部において、申請者は、APC/C サブユニットの変異株 *cut9-665* の温度感受性の抑制変異 *scn1*, *scn2* についての解析を行い、詳細な細胞表現型の観察から、*scn1*, *scn2* 変異株が、M 期後期のスピンドル伸長に顕著な表現型を示すことを明らかにした。さらに申請者は、今まで同定されていなかった *scn1*, *scn2* の原因遺伝子が、ともにアラニン tRNA 遺伝子であることを示した。この結果は、*scn1*, *scn2* の表現型を考えると驚くべき結果であり、染色体分配に顕著な異常を示す tRNA の変異は、本研究が最初の報告である。アラニン tRNA の変異である *scn1*, *scn2* が、M 期後期のスピンドル伸長に顕著な表現型を示す理由については、実験により明らかにできてはいないが、考察でのタンパク質合成チェックポイントの仮説は、非常にユニークで興味深い。ただ、第一部での解析からは、APC/C の制御機構の理解につながる知見は得られていない。しかし、*scn1* 変異株の原因遺伝子が *scn3⁺* 遺伝子であるという以前の報告の誤りを訂正し、さらにその *Scn3* タンパク質の生理機能の理解につながる結果を得ており、分子生物学的に十分な評価に値する。

第二部において申請者は、HDAC 阻害剤 TSA によって APC/C 変異株が相補されることを発見し、HDAC という細胞周期進行における機能が明らかでない因子が、APC/C の制御に関わる可能性を見いだした。さらに、申請者は、遺伝学的解析の結果、分裂酵母 HDAC のうち、Clr6 が特異的に APC/C と機能的に相互作用することを示す結果を得ており、HDAC による APC/C 制御機構が細胞内に実際に存在していることが強く予想される。しかし、考察において提唱されている、アセチル化修飾による APC/C の制御モデルの検証には、さらなる解析が必要である。ただ、HDAC の不活性化時には APC/C の 20S 複合体が回復すること、さらに APC/C サブユニットの一つ Cut23 タンパク質が細胞内でアセチル化修飾されることが、本研究ですでに示されており、申請者はこの制御機構の分子メカニズムの解明につながる手がかりはすでにつかんでいることから、今後の発展が多いに期待される。

本研究において提示されたアセチル化による APC/C 制御機構の仮説は、APC/C の制御機構として新規なものであるだけでなく、アセチル化という化学修飾による細胞周期進行の制御という点でも新しいものあり、本研究は細胞周期研究の発展に大いに貢献すると考えられる。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。

なお、平成16年4月13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。