

氏 名	かわ 川 さき 寄 よう 洋 すけ 祐
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学 位 記 番 号	生 博 第 87 号
学位授与の日付	平 成 18 年 11 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	分裂酵母セパレーズ, セキュリン変異株の姉妹染色体分配異常が環境ストレスにより抑圧される分子機構の探求
論文調査委員	(主 査) 教 授 松 本 智 裕 教 授 西 田 栄 介 教 授 荒 木 崇

論 文 内 容 の 要 旨

本研究では細胞外の環境変化が姉妹染色分体を分離する機構に与える影響に注目して、分裂酵母を用いて研究を行った。セパレーズ・セキュリンタンパク質複合体は姉妹染色分体を分離する際の鍵となる因子であり、その機能の制御は極めて緻密に行われていると考えられている。セキュリンタンパク質はセパレーズタンパク質に対して阻害因子として働くと同時に、活性化も補助する興味深い機能を持っているが、その機構に関しては依然として謎が多い。本研究では分裂酵母のセパレーズ Cut1, セキュリン Cut2 の変異株の高温感受性が高濃度のソルビトール, KCl, CaCl₂ を培地に加えることによって抑圧される事を発見した。ソルビトールにより浸透圧ストレスを加えられた細胞は細胞周期の一時的な遅延を示したが、これは MAP キナーゼ Spc1/Sty1 に依存していた。また、浸透圧ストレス下で培養された細胞は人工ミニ染色体を高頻度に脱落することから、浸透圧ストレスは M 期の進行に何らかの影響を与えると考えられた。環境ストレスによる変異株の高温感受性抑圧は MAP キナーゼ Spc1/Sty1 に依存していた。また、*cut1* 変異株は *spc1* 遺伝子破壊株と合成致死性を示し、MAPK キナーゼ Wis1 の活性化型変異によって高温感受性の抑圧を示した。PKA シグナル経路はこれと反対の結果を示し、*cut1*, *cut2* 変異株の高温感受性は *pka1* 遺伝子破壊株により抑圧された。浸透圧ストレスを加えた *cut1* 変異株では MAP キナーゼ Spc1/Sty1 に依存した Cut1, Cut2 タンパク質複合体の顕著な安定化が見られた。リン酸化型の Cut2 タンパク質は Cut1 タンパク質と相互作用しやすいことを示唆する結果を得たことから、環境ストレスによって Cut2 タンパク質のリン酸化が制御される可能性に着目した。大量発現した Cut2 タンパク質を解析することによりストレスに応じて変化するリン酸化部位を発見した。また、Cut1 タンパク質と MAP キナーゼ Spc1/Sty1 の間に物理的な相互作用を検出した。以上の結果から、分裂酵母 *cut1*, *cut2* 変異株の高温感受性の環境ストレスによる抑圧には、MAP キナーゼ Spc1/Sty1 が必須であり、おそらくリン酸化を介した Cut1, Cut2 タンパク質複合体の顕著な安定化が浸透圧ストレスによる温度感受性を抑圧する機構の鍵であると考えた。

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

セパレーズ・セキュリンタンパク質複合体は姉妹染色分体を分離する際に重要な因子であるが、その制御機構に関しては不明な点が多かった。申請者は分裂酵母のセパレーズ Cut1, セキュリン Cut2 の変異株の高温感受性が高濃度のソルビトール, KCl, CaCl₂ を培地に加える事によって抑圧される事を発見した。その分子機構の解析を通じて、セパレーズ・セキュリンタンパク質複合体の制御機構の一面を明らかにすることを試みた。

申請者は最初に、浸透圧ストレスが酵母細胞の増殖、および有糸分裂過程に与える影響について調べた。浸透圧ストレスを加えた細胞は紡錘体チェックポイント, DNA 損傷チェックポイントに依存しない細胞増殖の一時的な遅延を示し、この際、G2 期から M 期への細胞周期進行が遅延している事を示した。この細胞周期進行制御は MAP キナーゼ Spc1/Sty1 に依存していた。また、浸透圧ストレス下では人工ミニ染色体の分配安定性が低下することから、染色体分配にあたって浸透

圧ストレスは多少の毒性を有することを示した。

申請者はまた、浸透圧ストレスによる *cut1* 変異株の高温感受性抑圧は MAP キナーゼ *spc1/sty1* 遺伝子の存在に依存していることを示した。さらに、*cut1* 変異株は *spc1* 遺伝子破壊株と合成致死性を示し、MAPK キナーゼ Wis1 の活性化型変異によって高温感受性の抑圧を示すことを明らかにした。反対に PKA シグナル経路については、*cut1*, *cut2* 変異株の高温感受性は *pka1* 遺伝子破壊株により抑圧されることを示した。次に、申請者は浸透圧ストレスを加えた *cut1* 変異株において Cut1, Cut2 タンパク質複合体の顕著な安定化を見だし、これが MAP キナーゼ Spc1/Sty1 に依存していることを示した。Cut1 タンパク質と相互作用している Cut2 タンパク質は高度にリン酸化されていることから、Cut1 タンパク質と Cut2 タンパク質の相互作用は Cut2 タンパク質のリン酸化により制御されるという考えを提案した。質量分析機を用いて Cut2 タンパク質の修飾を解析することにより、浸透圧ストレスに応じて変化するリン酸化部位を発見したが、浸透圧ストレスによって *cut1* 変異株の高温感受性が抑圧されるのに必須な部位を同定するまでには至らなかった。従って、Cut2 タンパク質のリン酸化と *cut1* 変異株の高温感受性の浸透圧ストレスによる抑圧の間の因果関係を示すにはいたらなかった。また、Cut1 タンパク質と MAP キナーゼ Spc1/Sty1 の間の物理的な相互作用を示した。

申請者は以上の結果から、分裂酵母 *cut1*, *cut2* 変異株の高温感受性が環境ストレスによる抑圧される機構として、MAP キナーゼ Spc1/Sty1 を介して Cut2 タンパク質のリン酸化状態に変化が起こることにより、Cut1, Cut2 タンパク質複合体の顕著な安定化が生じて Cut1 タンパク質の活性が回復するという仮説を提示した。

環境ストレスが M 期の進行について与える影響については従来ほとんど報告がなかった。本研究はセバレース、セキュリン変異株の高温感受性が環境ストレス、特に浸透圧ストレスによって抑圧される現象を調べることを通じて、これら細胞外のストレスが M 期の進行にも影響を与えていることを示し、Cut1 タンパク質と Cut2 タンパク質の複合体形成制御についても一定の新しい知見を明らかにした。

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。

平成18年10月12日、論文内容とそれに関連した試問の結果合格と認めた。