

(別紙様式第3号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 松尾 祐児

題目:

Molecular Biological Analysis of the Nuclear Protein Quality Control System in Fission Yeast

(分裂酵母の核内タンパク質の品質管理機構の分子生物学的解析)

異常タンパク質の蓄積によって生じる悪影響を最小限に抑えるため、真核生物は種々のタンパク質品質管理(以下、PQC と略す)機構によってタンパク質の品質を監視・維持している。PQC 機構の1つとしてミスフォールドタンパク質の選択的分解がある。酵母からヒトに至る真核生物において、ユビキチン・プロテアソーム系(以下、UPS と略す)は細胞周期制御因子・癌抑制因子・ミスフォールドタンパク質などの広範囲な細胞内タンパク質の選択的分解を担っている。標的基質はポリユビキチン鎖によって翻訳後修飾され(この修飾はポリユビキチン化と呼ばれる)、ポリユビキチン化された標的基質はプロテアソームによって選択的に認識・分解される。このポリユビキチン化はE1(ユビキチン活性化酵素)、E2(ユビキチン連結酵素)、E3(ユビキリンリガーゼ)によって構成されるカスケード三つの酵素カスケード反応によって触媒される。ポリユビキチン化の特異性を決定するのはE3であるので、PQC 分解経路に関わるE3を同定・解析することは基質選択性の機構を解明する上での最も重要である。

UPS が細胞質におけるPQCにとって重要な機能を担っていることはよく研究されているが、核内におけるPQCにおけるUPSの役割はまだよく分かっていない。本論文において著者は分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* を用いて核内PQCに関わるUPSの分子機構に焦点を当てている。分裂酵母は古典・分子遺伝学的解析のみならず、生化学的・細胞生物学的解析が容易なため、これまで様々な分子細胞生物学的現象(細胞周期制御、シグナル伝達など)を研究するための優れたモデル真核生物として利用されてきた。

本研究で著者はまず分裂酵母におけるUPSを介した核内タンパク質の品質管理機構の存在について研究した。著者は分裂酵母のヒストンシャペロンであるAsf1の変異型タンパク質Asf1-30を核内タンパク質の品質管理を研究するモデル基質として利用し、この核内局在性の変異タンパク質がUPSによって選択的に分解されることを明らかにした。さらに、著者は11個の候補の中からこの分解に関わるE2としてUbc4を同定した。また、著者は3つの条件(核内局在、RINGあるいはHECTドメインを有する、熱ショックによって転写誘導される)をみたす遺伝子を *in silico* によって選抜し、その中からSan1をAsf1-30の分解に導くE3として同定した。著者は *in vivo* において他の核内局在E3ではなくSan1がAsf1-30をポリユビキチン化する特異性を持つことを証明した。更にMis12-537, Orc5-H37, Cnp1-1, Pim1-46, Sad1-1といった核内局在性の温度感受性タンパク質は制限条件において不安定となることが報告されているため、著者はこれらの変異株が示す温度感受性に対する *san1* 遺伝子欠損の影響を調べた。その結果、著者は *mis12-537, cnp1-1, pim1-46* という変異株が制限温度で示す温度感受性が *san1* 遺伝子欠損により抑圧され、実際にCnp1-1の示すタンパク質不安定性が *san1* 遺伝子欠損株で抑圧

されることを見出した。これらの遺伝学的、生化学的結果から著者は分裂酵母において初めて核内で生じた異常タンパク質が E1 (Uba1)-E2 (Ubc4)-E3 (San1)によりポリユビキチン化後、プロテアソームにより分解されることで核内タンパク質の品質管理が行われることを示した。

次に、著者は分裂酵母での効率的な Gap-repair cloning(以下、GRC と略す)を行うには短い相同配列付加で十分であるかどうか調べた。GRC は酵母内で起こる相同組み換え活性を利用してプラスミド構築を行う効率的な方法である。GRC は出芽酵母においてはプラスミド作製のため一般的に用いられているのに対して、分裂酵母においては効率について系統的な研究がなされていないためあまり用いられていない。そこで、著者は分裂酵母を用いた効率的な GRC にどのくらいの長さの相同配列が必要であるか検討を行った。その結果、著者は 20bp という短い相同配列でも実用的な効率で GRC が可能であることを示した。更に、著者はこの方法が分裂酵母内において融合タンパク質を構築するための多断片 DNA 連結にも適応可能であることを示した。

最後に、著者は分裂酵母において多サンプルから同時にタンパク質抽出を可能にするアルカリ抽出法について述べた。出芽酵母は 0.1M NaOH で 5 分間の処理をすることにより通常の SDS サンプルバッファーを用いてタンパク質抽出が可能となることが報告されているが、この方法は分裂酵母のタンパク質抽出の場合には上手くいかない。そこで、著者は分裂酵母からの効率的なタンパク質抽出に必要な十分な NaOH 濃度 (M)と処理時間 (分)について系統的な検討を行った。その結果、著者は分裂酵母からの再現性よく効率的にタンパク質の抽出を可能にする最適な条件(分裂酵母を 0.3M NaOH で 10 分間処理する)を見出した。それに加えて、著者はこの方法が通常のウェスタン・ブロットティング法に供するタンパク質抽出液の調製にも適応可能であることを示した。

以上を総括すると、著者は本論文において分裂酵母において以下に示す三つのことを明らかにした。(1) 分裂酵母の核内タンパク質は Ubc4(E2)と San1(E3)を介した UPS による分解を受けて品質管理されていることを示した。(2)分裂酵母において 20bp という短い相同配列の付加でも実用的な効率で GRC によるプラスミド構築が可能であることを示した。(3) 分裂酵母から簡便・迅速・再現性よくタンパク質抽出する至適条件を見出した。これらの知見は核内 PQC の研究に寄与したのみならず、分裂酵母を用いた効率的な研究のための技術的開発に貢献した。