

学位論文審査の結果の要旨

氏名	松尾 祐児
審査委員	主査 川向 誠 (印) 副査 中川 強 (印) 副査 戎能 智宏 (印) 副査 松下 一信 (印) 副査 森 信寛 (印)
題目	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
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>ユビキチン・プロテアソーム系(UPS)は酵母からヒトに至る全ての真核生物における選択的なタンパク質分解機構である。UPS はこれまで細胞周期制御因子や癌抑制因子を含む広範囲の細胞内タンパク質の選択的分解を担っていることが示されている。また、UPS が細胞質におけるタンパク質の品質管理においても重要な役割を担っていることはよく研究されているが、核内タンパク質の品質管理における UPS の役割はまだあまり分かっていない。本論文において著者は分裂酵母 <i>Schizosaccharomyces pombe</i> を用いることにより核内タンパク質の品質管理に関わる UPS の分子機構に焦点を当てている。分裂酵母は様々な分子細胞生物学的現象(細胞周期制御など)を研究するための優れたモデル真核生物である。出芽酵母と同様に、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に可能である。</p> <p>まず、著者は分裂酵母における 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調べた。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 <i>in silico</i> 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。これに加えて、著者は <i>in vivo</i> 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。これらの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。</p>	

次に、著者は分裂酵母での効率的な Gap-repair cloning(GRC)を行う際の、相同配列付加について調べた。GRC とは酵母内の相同組換え活性を利用して断片化したプラスミドにプラスミドと相同な配列をもつ遺伝子をクローニングする方法である。出芽酵母において GRC はプラスミド作製のためのとても効率的な方法であるが、この方法は分裂酵母においては使用例が限られているため広く使用されていない。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、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のみならず、この方法が複数の DNA 断片の多断片連結にも適応可能であることを示した。

さらに、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を開発した。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)について検討を行った。その結果、分裂酵母から再現性よく効率的にタンパク質抽出を可能にする最適な方法を開発した。それに加えて、著者はこの方法が通常のウエスタン・ブロッ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。

著者は本論文において分裂酵母で以下の三つのことを証明した。(1) 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) 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) 0.3M NaOH で 10 分間の処理で効率的にタンパク質抽出を可能にする最適な方法を開発した。

以上の結果は分裂酵母の実験技術の改良と核内タンパク質の制御機構を示した優れた研究成果であり、本論文は博士（農学）の学位論文に値すると認められる。