

論文審査の結果の要旨

氏名 松田憲之

本論文は2章からなり、第1章では植物の小胞輸送に関与すると思われる *PRA2* 遺伝子の酵母小胞輸送変異株を用いた解析について、第2章では酵母の小胞輸送変異 (*sec15* 変異) を抑圧するシロイヌナズナ遺伝子 *RMA1* の機能解析について述べられている。いずれの研究も出芽酵母の小胞輸送変異株を用いて、高等植物の小胞輸送に関与する因子や、その機能に迫ろうとするものである。

まず第1章では、エンドウ由来の Rab/Ypt 低分子量 GTPase Pra2 を一連の酵母 *ypt* 変異株に導入して、その解析を試みている。Pra2 を酵母の種々の *ypt* 変異株に導入したところ、Pra2 はいずれの変異も相補せず、逆にこれらの変異株の増殖を阻害することが示された。既に上田らが、シロイヌナズナの Rab/Ypt 遺伝子 *ARA4* が GDI 等を競合するために、酵母 *ypt* 変異株の生育を阻害することを明らかにしている。しかし、*Ara4* の場合とは異なり、GDI の共発現では Pra2 による増殖阻害は回復しないことから、Pra2 は GDI とは異なる酵母の制御因子を奪うことにより、*ypt* 変異株の増殖阻害を引き起こしていると考えられる。

生化学的な特性を変化させる種々の変異を Pra2 に導入して、その増殖阻害活性を調べたところ、興味深いことに Pra2 Δ C は *ypt1* 変異株の増殖を阻害するが、*ypt3* 変異株の増殖は阻害しないことが示された。また、GTP固定型の変異体やエフェクター領域の変異体は *ypt1* 変異株の増殖を阻害するが、GDP固定型の変異体やヌクレオチドフリー型の変異体は増殖を阻害しないことも明らかにされた。これらの結果は、Pra2 が酵母中で複数の因子を競合しており、ある因子がC末端に依存して Pra2 と結合することで *ypt3* 変異株の増殖を阻害し、別な因子がC末端に依存せずに GTP型の Pra2 と結合することで *ypt1* 変異株の増殖を阻害していることを示唆している。

第2章では、論文提出者らが酵母 *sec15* 変異の抑圧因子として単離した *Rma1* の機能を、

生化学的手法によって明らかにしている。まず大腸菌より精製したマルトース結合タンパク質 (MBP) と Rma1 の融合タンパク質 (MBP-Rma1) を ATP, ユビキチン, 小麦胚芽抽出液と反応させたところ, その見かけ上の分子量が 100 kDa 以上にわたり増加することが示され, さらにその原因が MBP-Rma1 のポリユビキチン化によることが明らかにされた。

また, MBP-Rma1 を ATP, ユビキチン, E1, および動物由来の各種 E2 と反応させると, Ubc4 あるいは UbcH5a 特異的に MBP-Rma1 の自己ユビキチン化が再構成され, 見かけ上の分子量が増加することが明らかにされた。ATP, ユビキチン, E1, および E2 (Ubc4/5) だけで MBP-Rma1 のユビキチン化が再構成できることは, Rma1 のユビキチン化が自身の活性に由来すること, 言い換えれば Rma1 が Ubc4/5 と協調して働く E3 であることを示している。さらに (1) MBP-ヒト Rma1 を ATP, ユビキチン, 網状赤血球抽出液と反応させても, その見かけ上の分子量が 100 kDa 以上にわたり増加すること, (2) 分子量の増加は MBP-ヒト Rma1 のポリユビキチン化によること, (3) MBP-ヒト Rma1 のユビキチン化も ATP, ユビキチン, E1, および E2 だけで再構成できること, が示されており, Rma1 の機能が進化的に保存されていることが明らかにされている。

第 1 章の実験結果は, 酵母の変異と他生物の相同遺伝子の発現による合成増殖阻害が普遍的に起りえる現象であることを示しており, さらに Pra2 と相互作用する因子を酵母変異体を用いて単離・解析するための方法論的な基礎を与えるものだと考えられる。

また, 第 2 章の実験結果は, Rma1 が Ubc4/5 と共に働く広く保存された新しいタイプのユビキチンリガーゼ (E3) であることを生化学的に明確に示している。Rma1 は高等植物で E3 活性が初めて示されたリングフィンガータンパク質であり, 今後その機能解析を進めるうえで, 本研究は欠くことのできない重要な情報を与えるものと考えられる。

なお, 本論文第 1 章は上田貴志氏, 佐々木幸子氏, 中野明彦氏との共同研究であり, 第 2 章は鈴木俊顕氏, 田中啓二氏, 中野明彦氏との共同研究であるが, 論文提出者が主体となって実験及び検証を行ったもので, 論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって, 博士 (理学) の学位を授与できると認める。