

審査の結果の要旨

氏名 山口 聡子

本研究は真核生物の増殖および、増殖と分化の切り換えにおいて、中心的な役割を果たすと考えられるサイクリン依存性キナーゼ (Cdk) の制御機構を明らかにするため、分裂酵母で遺伝学的スクリーニングを用いて新規制御因子を単離し、生物学的機能の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. Cdc2p キナーゼの未熟な活性化により、分裂期カタストロフィーで致死となる温度感受性株 *rad1-1 wee1-50* の多コピー抑圧因子をスクリーニングした結果、新規遺伝子 *srw1⁺* (suppressor of *rad wee*) を単離した。*srw1⁺* は 556 のアミノ酸から成る、真核生物において高度に保存されている Fizzy 関連蛋白の一員をコードしていることがわかった。
2. *srw1⁺* の穏やかな発現はさまざまな株の分裂期カタストロフィーを抑圧することが示された。一方、*srw1⁺* の高度な発現は細胞分裂を停止し、DNA 合成期の繰り返しをまねくことが示された。このことから *srw1⁺* の発現は Cdc2p/Cdc13p (分裂期サイクリン) 複合体活性を抑制することが示唆された。
3. *srw1⁺* 破壊株を作成したところ、増殖には全く異常を示さなかったが、分化に異常を示した。窒素源枯渇に際して、破壊株は G₁ 期に停止することができず、接合も不能であることが示された。接合は *cig2⁺* サイクリンの破壊あるいは Cdc2p キナーゼの不活化により回復されることが示された。
4. *srw1⁺* 破壊株は Cdc2p キナーゼの 15 番目のチロシン残基 (Tyr15) を抑制的にリン酸化する Wee1p キナーゼを不活化した条件で致死であった。*srw1Δ wee1-50* 二重変異株は分裂期カタストロフィーで死に、この形質は窒素源枯渇下で増強が認められた。
5. *srw1⁺* の発現は、Tyr15 の制御が失われている時でも分裂期カタストロフィーを抑圧できること、*srw1Δ wee1-50* 二重変異株の分裂期カタストロフィーがヒドロキシウレアで抑圧されることなどから、*srw1⁺* は Tyr15 の制御とは独立して Cdc2p の抑制に働くことが示された。
6. *srw1⁺* の発現は、Cdk 抑制因子 (CKI) である Rum1p の破壊株の G₁ 停止能、接合能を抑圧できることが示された。また *srw1Δ rum1Δ* 二重破壊株では、逆に細胞は G₁ 期に停止しやすくなることが示された。
7. 窒素源枯渇、あるいは *cdc10* 温度感受性株を用いた実験でサイクリンの分解を調べた結果、*srw1⁺* は、G₁ 期における Cdc13p の分解に必須であることが示された。さらに、*srw1⁺* 破壊株を用いて詳しく細胞周期の解析を行った結果、破壊株では増殖中の細胞で、分裂期からの脱失、およびその際の Cdc13p の分解に全く欠陥がないことが示された。

このことから、Cdc13p の分解には独立した 2 つ以上の系が働いていること、Srw1p は分化前の G₁ 期特異的な Cdc13p 分解の促進因子であることが示された。

8. Srw1p 活性が増殖中の細胞では抑制されている可能性を考え、Srw1p 蛋白全長を抗原として抗体を作成した。62kDa の Srw1p 蛋白が増殖中の細胞で複数のバンドとして検出されることが示された。フォスファターゼ処理を行った結果、Srw1p は増殖中の細胞では、細胞周期を通じてリン酸化されていることが示された。
9. Srw1p が Cdc13p の分解に必須となる、G₁ 停止時の Srw1p 蛋白のリン酸化状態を検出したところ、Cdc13p の分解の時期と一致して Srw1p の脱リン酸化がおこることが示された。
10. Srw1p のキナーゼを同定するため、*cdc2* 温度感受性株で Srw1p のリン酸化状態を調べたところ、Srw1p のリン酸化は Cdc2p キナーゼ活性に依存することが示された。さらに、*cdc13* を不活化する実験により、Srw1p のリン酸化は、Cdc2p/Cdc13p 複合体の活性に依存することが示された。
11. G₁/S 期の進行の際に、S 期の開始にさきがけて、Srw1p のリン酸化が Cdc13p の蓄積と同時に起こることが示された。同様に、減数分裂の進行において、Srw1p のリン酸化、脱リン酸化の時期は、Cdc13p の分解、蓄積の時期と一致してそれぞれ、減数分裂前 DNA 合成直前、減数第二分裂直後におこることが示された。
12. Cdc2 キナーゼおよび、Cdc13 と結合した Cdc2p を免沈した結果、両方とも Srw1p を *in vitro* にてリン酸化できる活性を持つことが示された。
13. Srw1p の蛋白には 4 か所、Cdk によるリン酸化コンセンサスサイトがみとめられた。これらのサイトのセリンまたはスレオニンをアラニンに置換することによって、リン酸化不能型の変異株を構築した。この結果、Srw1p は実際にこれらのサイトでリン酸化を受けていることが示された。
14. 野生型とリン酸化不能型の Srw1p の蛋白の安定性を比較したところ、リン酸化は蛋白を不安定化する働きがあることが示された。
15. リン酸化不能型の株の解析を行った結果、一倍体の細胞が容易に二倍体化することが判明した。つまり、このリン酸化が細胞周期の順序だった進行の保障に重要な役割を果たすことが示された。この形質は、Cdc13p の同時発現により抑圧され、またリン酸化不能型の株では Cdc13p 蛋白がより不安定であることも示された。

以上、本論文は分裂酵母において、Cdk の制御について、真核生物を通じて高度に保存された Fizzy 関連蛋白の一員をコードする新規遺伝子 *srw1*⁺ を単離し、その分化における役割と制御機構を解析した。本研究は、これまで未知に近かった、真核生物の増殖と分化の切り換え機構の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。