

審査の結果の要旨

氏名 平野 稚子

膜型マトリックスメタロプロテアーゼ 1 (MT1-MMP) の細胞内領域に結合する新規因子 MTCBP-1 は、原核生物のメチオニン再生経路の酵素 aciredoctone oxygenase (ARD) と相同性を持つことから、この分子は進化上 MT1-MMP に対する機能制御因子としての役割を獲得する以前の機能を持つことが考えられた。本研究は新規因子 MTCBP-1 の機能解析を出芽酵母を用いて試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 出芽酵母ゲノムより、MTCBP-1 出芽酵母ホモログ *YMR009w* を同定した。ゲノム中には他に類似の遺伝子は存在しなかった。相同組み換えを用いて *YMR009w* 遺伝子欠損株 (*ymr009Δ*) を作製した。メチオニン再生経路依存的な培養条件を設定して *ymr009Δ* の増殖を検討したところ、*ymr009Δ* は増殖不全の表現型を示し、*YMR009w* がメチオニン再生経路で機能することが示唆された。
2. *ymr009Δ* の増殖不全は *YMR009w* の導入により回復したが、ARD の活性中心を形成するグルタミン酸に相当する *YMR009w* タンパク質 (Ymr009p) のグルタミン酸 (91Glu) のアラニン置換変異体は増殖不全を回復出来なかったことから、*ymr009Δ* 株の表現型の相補には Ymr009p の ARD としての活性が必要である事が示された。
3. *ymr009Δ* の増殖不全は MTCBP-1 の導入によっても回復がみられたことから MTCBP-1 も *YMR009w* と同様の活性を持つことが示唆された。ARD の立体構造を基に MTCBP-1 の立体構造をモデリングした結果、ともに ARD と全体の構造がかなり類似しており、特に ARD の活性中心が含まれる cupin ドメイン部分の構造はアミノ酸配列の相同性から予想される以上の近似を示した。以

上の結果から *YMR009w*、MTCBP-1 はそれぞれ出芽酵母、ヒトの ARD ホモログであると結論し、*YMR009w* を出芽酵母 ARD (*yARD*) と命名した。

4. ARD としての酵素活性を担うと考えられる *yARD* の cupin ドメインより N-末端側の連続欠損変異体を *yard*Δへ導入し、細胞分画を行ったところ、N-末端側から 21 から 30 残基の領域が *yARD* タンパク質細胞質へ局在させるために重要であることが示唆された。この領域を持たない *yArd* 変異体は *yARD* 遺伝子欠損の表現型を相補しなかったことから、*yArd* の機能発揮には細胞内での局在が重要である可能性が示唆された。*yArd* は pre-mRNA スプライシング調節因子 SNP1 との結合が示唆されており、本研究において実際に検討したところ両者の結合が確認され、また SNP1 の機能に必要であると報告されている領域と結合したことから、*yARD* はメチオニン再生経路の酵素であるだけでなく、pre-mRNA のスプライシングにも関与する、多機能性因子である可能性が考えられた。

以上、本論文は出芽酵母を用いてヒト新規因子 MTCBP-1、及び出芽酵母ホモログ *YMR009w* がメチオニン再生経路において機能する酵素 ARD の相同遺伝子であることを明らかにし、この分子が細胞内局在制御を受けている可能性を示唆した。ヒト MTCBP-1 は MT1-MMP の機能制御に関与する可能性があること、酵母 ARD は SNP と相互作用し、pre-mRNA スプライシングに関与する可能性があることから、ARD タンパク質は進化の過程で複数の機能を獲得してきた可能性が示唆された。本研究はこれまで機能未知であった *YMR009w* 及び MTCBP-1 が真核生物 ARD であることを初めて報告するものである。また、これまで殆ど情報のなかった MTCBP-1 の機能について先駆的な知見をもたらしたと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。