

# 論文審査の結果の要旨

氏名 磯野江利香

本論文は4章からなるが、第1章の前にはイントロダクションがあり、ここでは本研究の背景となる酵母プロテアソームの研究に関するこれまでの知見がまとめられていると共に本研究の目的が示されている。本研究ではプロテアソームの調節因子19S-RPを構成するサブコンプレックスの一つリッドの形成の时空制御を解明することを目的としている。

第1章ではリッドの構成成分の一つ Rpn7 をコードする遺伝子の温度感受性変異株を用いてプロテアソーム構造解析を行った。変異株は *in vivo* でユビキチン-プロテアソーム系のモデル基質の分解に欠損を示したことからプロテアソームの活性低下が生じていることが示唆される。基質分解活性の低下が制限温度下での酵素の失活という直接的な影響なのかどうかを調べるため、野生型と変異体から許容温度下でプロテアソームを精製し、*in vitro* でのユビキチン化基質の分解をみた。3xFLAG タグをリッドの構成因子 Rpn11 に融合した株から抗 FLAG 抗体ビーズを用いて 26S プロテアソームが精製できる。許容温度下で生育した細胞から精製した 26S プロテアソームの CBB 染色によるプロファイルには野生型、変異体で大きな差はなく、許容温度下での会合は正常に行われていることが分かった。これらの精製プロテアソームを用いて分解アッセイを行ったところ、変異プロテアソームはユビキチン化基質の分解活性を持ち、さらにその活性は反応温度を制限温度以上の 38°C でも失われなかった。すなわち、本研究で単離した変異体の温度感受性致死の原因は許容温度下で会合した 26S プロテアソームの高温における失活ではなく、別の要因、たとえば制限温度下での会合欠損である可能性が示唆された。事実、変異体では制限温度下の細胞粗抽出液のゲル濾過展開のパターンに大きな変化が見られ、26S プロテアソームの会合に欠損があることが明らかとなった。さらに、*rpn7* 変異体では9つのリッド構成因子のうち5つのみ (Rpn5、6、8、9、11) が安定な複合体を形成していることを初めて見いだした。

第2章では、同様の解析を *RPN6* 遺伝子について行い、*rpn6* 温度感受性株は制限温度下で、*rpn7* 変異株で見出された複合体の内の一つ Rpn6 を含まない4つ

のリッド構成成分 (Rpn5、8、9、11) からなる複合体を形成していることを明らかにした。この中に、Rpn7 は正常であるにもかかわらず含まれない。Rpn5、8、9、11 からなる複合体がリッド形成の核になっている可能性がある。

さらに、第3章では *RPN5* 遺伝子について解析し、*rpn5* 温度感受性変異体ではリッドの複合体は全く検出されなかった。この結果は、Rpn5 が複合体形成の核になるという考えを指示する。これらの結果と既存の変異体解析の結果より、これまで two-hybrid 相互作用でしか議論されなかったリッドの構成因子の位置関係を推測することができた。

第4章では、変異体を用いてプロテアソーム形成の場を解明することを試みた。Rpn5 変異株中で 19S-RP のもう一つの複合体ベースは形成されていることを示した。一方、ベース遺伝子の温度感受性株中ではリッドの形成は正常であった。この結果はリッドとベースは互いに独立に形成されることを示している。*rpn5* 変異体のベースは制限温度下でも核に局在することを明らかにした。一方、ベース変異体ではリッドは核に存在できなかった。これらの結果から、リッドとベースは独立に細胞質中で形成され、19S-RP に会合した後に核内に輸送されることを提案した。

なお、本論文の第1章は佐伯泰、横沢英行、および東江昭夫との共同研究、また第2章は佐伯泰、斎藤尚子、鎌田直子、東江昭夫との共同研究であるが、いずれも論文提出者が主体となって行われたもので、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。