

論文審査の結果の要旨

氏名 関 谷 瑞 穂

本論文は2章からなり、第1章は細胞壁合成停止条件下におけるサイクリン発現の解析、第2章は細胞壁合成停止条件下における CLB2 転写因子群の解析、第3章は細胞壁合成停止条件下における転写因子 Hcm1p の解析について述べられている。

細胞壁チェックポイントは近年、当研究室から報告されたチェックポイントである。出芽酵母の細胞壁構成成分は、芽（娘細胞）の成長部位で合成され、細胞壁へと組み込まれる。細胞壁合成に異常が生じた場合、細胞は十分な大きさの娘細胞を形成できず、ごく小さな芽をもった状態で細胞周期を停止する。このとき DNA およびスピンドル極体は複製されているが、紡錘体は形成されておらず、G2 期で細胞周期が停止している。この G2 期停止は、CLB2 の転写抑制により引き起こされている。Clb2p は M 期進行に重要な働きをするサイクリンの 1 つであり、サイクリン依存性キナーゼと複合体を形成して細胞周期進行の様々な現象を直接あるいは間接的に統御する、細胞周期制御の基幹因子である。細胞壁合成停止時の CLB2 抑制には CLB2 の正の転写因子である Fkh2p や、ダイナクチン複合体の関与が示唆されている。しかし細胞壁合成の異常がどのように核内へ伝達され、G2 期停止が達成されているのかは、大部分が未解明のままである。そこで本研究では M 期サイクリン転写制御因子に着目し、細胞壁合成停止時の G2 期停止がどのようなメカニズムで引き起こされるのかを明らかにすることを目的とした。

1. 細胞壁合成停止条件下におけるサイクリン発現の解析

出芽酵母では 9 種類のサイクリンが時期特異的に発現（Cln1-3p は M/G1 期に、Clb5,6p は G1/S 期に、Clb3,4p は S/G2 期に、Clb1,2p は G2/M 期に発現）している。これらの中で Clb1-4p は M 期進入に重要であることが知られているが、細胞壁合成停止条件下において CLB2 と同様に CLB1,3,4 の転写が抑制されるのかは不明であった。そこで細胞壁合成欠損株である温度感受性 fks1-1154 変異株を用いて、CLB1-4 遺伝子の発現を検証した。その結果、CLB1 は CLB2 と同様に細胞壁合成停止時に転写が抑制されていることが分かった。一方 CLB3、CLB4 は細胞壁合成停止時にも発現が見られた。

細胞壁合成停止条件下において CLB1、CLB2 は共に発現が抑制されたが、これら両方の抑制が細胞周期停止に必要であるのか、あるいはどちらかへの抑制がより重要であるのかを調べるため、CLB1 または CLB2 を過剰発現させ、細胞壁チェックポイントに対する影響を調べた。CLB2 遺伝子を過剰発現すると細胞壁合成停止条件下における細胞周期停止が起こらないこと（チェックポイントの乗り越え）が知られているが、CLB1 の過剰発現はチェックポイントの乗り越えを引き起こさなかった。

これらの結果は、細胞壁合成停止条件下における G2 期停止の達成には、M 期サイクリンの中でも CLB2 の発現を抑制することが最も重要である可能性を提示しており、CLB2 転写抑制メカニズムの解明が細胞壁チェックポイントシステムの全容を解明する上で重要であることを示している。

2. 細胞壁合成停止条件下における CLB2 転写因子群の解析

CLB2 mRNA 量は主として転写によって調節されている。これまでに CLB2 転写因子は、負の転写因子が 2 種 (Sin3p、Rpd3p)、正の転写因子が 3 種 (Mcm1p、Fkh2p、Ndd1p) 報告されている。これらの中で、Fkh2p は過剰発現によって細胞壁チェックポイントの乗り越えを引き起こすことが知られている。そこで Fkh2p 以外の転写因子の細胞壁チェックポイントへの関与について解析した。

まず、負の転写因子である Sin3p、Rpd3p の関与を調べた。Sin3p、Rpd3p は複合体を形成し、ヒストン脱アセチル化酵素として機能することで、CLB2 を含む多くの遺伝子の転写抑制に関与している。CLB2 転写抑制に関しては、G1 期に CLB2 プロモーターに結合し、G1 期での発現を抑制していること、S 期以降はプロモーターから解離することが報告されている。SIN3、RPD3 遺伝子を細胞壁合成欠損株中で破壊し、細胞壁チェックポイントへの影響を検証したところ、これらの欠損は細胞壁チェックポイントの乗り越えを引き起こすことが分かった。このとき CLB2 mRNA の蓄積も見られた。しかし fks1-1154 株を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイの結果、Sin3p、Rpd3p は細胞壁合成停止条件下で CLB2 プロモーター上にリクルートされていないことが分かった。これらの結果は、Sin3p、Rpd3p は細胞壁チェックポイントに関与するが、細胞壁合成停止条件下における CLB2 発現の抑制は Sin3p、Rpd3p が CLB2 プロモーター上に結合し続けることによって行われているのではないことを示している。Sin3p、Rpd3p 複合体はヒストン脱アセチル化酵素としてクロマチンと相互作用することにより転写調節を行っていることを考え合わせると、細胞壁合成停止条件下における CLB2 発現抑制は Sin3p、Rpd3p を直接に介しているのではないことが示唆される。

次に、正の転写因子について解析を行った。Mcm1p、Fkh2p、Ndd1p は G2 期以降、複合体を形成し、CLB2 の転写を強く誘導することが報告されている。FKH2 は過剰発現によって細胞壁チェックポイントの乗り越えを引き起こすことも知られている。そこで NDD1、MCM1 についても過剰発現が細胞壁チェックポイントに与える影響を検証した。その結果、NDD1 が過剰発現によりチェックポイントの乗り越えを引き起こすことが分かった。また NDD1 の過剰発現では、FKH2 過剰発現時と同様に、CLB2 mRNA が蓄積していること、一方チェックポイントの乗り越えを引き起こさない MCM1 の過剰発現は CLB2 mRNA の蓄積を引き起こさないことも見いだした。FKH2 と NDD1 は、S/G2 期に発現があることが知られているが、細胞壁合成停止条件下で FKH2、NDD1 の発現は抑制されていることが観察された。さらに FKH2 のホモログである FKH1 も細胞壁合成停止条件下では発現抑制が起きていた。

3. 細胞壁合成停止条件下における転写因子 Hcm1p の解析

細胞壁合成停止条件下において、CLB2 の正の転写因子の発現が抑制されるメカニズム

について解析するために、発現調節部位に着目した。細胞壁合成停止条件下において発現が抑制される FKH1、FKH2、NDD1 のプロモーター領域には、HCM1 element と呼ばれる Hcm1p 結合領域が共通に存在していた。そこで、プロモーター領域に HCM1 element をもつ 7 遺伝子 (YHP1、CIN8、DSN1、SPC34、WHI5、GCR1、ABF1) について細胞壁合成停止条件下での遺伝子発現を調べたところ、いずれも細胞壁合成停止条件下で発現が抑制または遅延していた。これらの遺伝子発現は GCR1、ABF1 を除き、G1/S 期に発現する転写因子である Hcm1p の遺伝子欠損株において転写が抑制または遅延することが報告されている。今回 GCR1、ABF1 についても hcm1 遺伝子欠損株において発現が抑制されていることを確認した。これらのことから、細胞壁合成停止条件下では、Hcm1p の機能が阻害されており、そのために Hcm1p 依存的発現を示す遺伝子の発現が低下したことが示唆された。

細胞壁合成停止条件下で Hcm1p の機能が阻害されている可能性が示されたことから、Hcm1p の過剰発現が細胞壁チェックポイントによる CLB2 の転写抑制を解除し、細胞壁チェックポイントの乗り越えを引き起こすかどうかを検証した。その結果、Hcm1p の過剰発現は細胞壁チェックポイントの乗り越えを引き起こすことが示された (図 3b)。これらの結果から、細胞壁合成停止によって引き起こされる M 期サイクリン CLB2 の発現抑制に、Hcm1p 機能の阻害が重要であると考えられた。

次に、細胞壁合成停止条件下において、Hcm1p がどのように阻害されているかを検証した。まず、細胞壁合成停止条件下における Hcm1p タンパク質量を観察した。その結果、細胞壁合成停止条件下では細胞壁合成停止前と比べた Hcm1p 量に変化がなかったことから、Hcm1p は細胞壁合成停止条件下で、局在やリン酸化のような翻訳後レベルでの制御を受けている可能性が示唆された。そこで次に Hcm1p の局在を観察した。野生株において Hcm1p は、出芽の直前から小さな芽をもつ細胞の時期 (G1 後期から S 期に相当する) に核に強く局在することが観察された。しかし細胞壁合成欠損株では制限温度下で全ての時期を通じて、Hcm1p の核局在は見られなかった。このことは、細胞壁合成停止により Hcm1p の核局在が妨げられていることを示唆する。

Hcm1p の核局在の阻害が、細胞壁合成停止条件下での G2 期停止に重要であるのかを検証するために、核局在シグナル配列 (NLS) を HCM1 に融合し、強制的に Hcm1p が核に局在することによる細胞壁チェックポイントへの影響を調べた。その結果、細胞壁合成停止条件下において、紡錘体の形成、つまり細胞壁チェックポイントの乗り越えが見られた。これらの結果は、細胞壁合成停止条件下では Hcm1p の核局在が阻害されていること、この阻害が G2 期停止に重要であることを示唆している。

なお、本論文第 1 章は野上識、大矢禎一との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析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 (生命科学) の学位を授与できると認める。