

論文内容の要旨

申請者氏名 堀裕治

出芽酵母を用いて細胞周期の進行、中でも複製開始と連携したG1/S 及びS 期進行制御に係わる因子の発見と機能解析を行った。

1. 開始点結合たんぱく複合体の機能。出芽酵母染色体の複製開始点ARS に結合する6 種類のたんぱくで構成するOrc 複合体の存在が報告されていたが、その機能は全く不明であった。吉川研究室では世界に先駆け、Orc1 遺伝子をクローニングしていたので、その機能を調べた。Orc1 遺伝子は必須遺伝子であることが判明したので、Gal1-10 プロモーターによる発現誘導型遺伝子を作成、機能たんぱくの欠乏に伴う細胞周期、複製開始の変化を詳細に調べた。その結果40 分の半減期でたんぱくは消失、複製開始は徐々に減少、複製は150分で停止した。面白いことに複製停止にも関わらず、細胞は急激に死滅した。以上のことから、Orc1 が複製開始に必須の因子であることを初めて証明したばかりでなく、S期進行のチェック機能にも関わっていることを示唆することができた（論文発表済み、第一著者）。

2. 複製開始の時間的調節とS期進行制御との連携の証明。1) の研究から、S 期進行のチェック制御機構に興味を持ち、細胞周期進行のチェックに係わることが知られている遺伝子群とOrc について、遺伝子変異が複製の開始と進行に与える効果を詳細に調べた。特にS 期における複製開始順序が明らかになっている第6 染色体右腕上の4 つの複製開始点を対象に解析した。その結果、DNA 傷害剤であるMMS の添加によって細胞がチェック機能を発揮し細胞周期の進行をS 期で停止するとき、初期複製開始点は正常に働いているが、複製の進行が遅延し、後期複製開始点の働きが完全に抑制されることが判明した。この伸長の遅延と開始の抑制はrad53-1 とorc2-1 変異によって解消された。更に、これらの変異によって、DNA 傷害のない正常な細胞周期において、複製開始の順序が大幅に乱れることが判明した。このことはRad53 やOrc2 などのタンパクが染色体上の開始点の開始活性を選択的に抑制することによって複製開始のタイミングを決定しており、後期複製開始点の強い抑制によって、DNA 傷害などによる異常事態に対応してS期進行を遅延させることが明らかになった（論文発表済み、第二著者）。

3. Orc2-1 変異を抑圧する新規細胞周期遺伝子Hod1 はヒトDSS1のホモログである。

Orc2-1 のチェック機能を解析するため抑圧変異を分離する過程で、元の変異株に第二の変異が存在することを発見、変異を分離同定し、クローニングしたところヒト遺伝病原因変異DSS1 (Deleted in split hand/split foot) と相同性の高いホモログであることが判明した。Homolog of DSS1 (Hod1) と名付けた遺伝子の破壊株は35.5 度以上で高温感受性を示すが、30-35.5 度の間ではOrc2-1 の高温感受性を抑圧することが判明した。元のorc2-1 株に内在していた変異hod1-1 はORF 内の12 個連続するA のランにA が一個付加した変異であり、実際には少量の正常なたんぱくが合成されていた。その結果35.5 度温度感受性は示すものの、orc2-1 変異を抑圧することはできなかった。

Hod1 は89 アミノ酸をもつ極めて親水性、酸性の小型のタンパクで、酸性アミノ酸に富む3 つのドメインを核に酵母からヒトまで広く高度に保存されている。各種欠損部位の作成の結果、ドメインを2 つ以上持ち、一定の長さがあれば機能を持つことが分かった。遺伝子破壊株 Δ hod1は制限温度下で、2N 染色体、垂鈴型の細胞で細胞周期を停止し、チェック機能は働いていた。したがってHod1 はG2/M 期の進行を制御する因子であると結論した。 Δ hod1 株と種々の細胞周期関連遺伝子変異との相互作用を調べたところ、orc2-1 変異は30-35.5度 の間で抑圧され、Anaphase promoting complex と関連するsic-1 の欠損変異、cdc27-1 の高温感受性変異とそれぞれ合成致死を示すことが判明した。これらの結果から、Hod1 はorc2 (或いはOrc 複合体) を核とする複製開始複合体の分解に係わる因子である可能性を想定し、核内物質の核外輸送について専門家に解析を依頼したところ、出芽酵母のmRNA の核外輸送がhod1の破壊株では著しく阻害されていることが明らかになった。現在、この点の解析を待つ論文発表を準備している（第一著者）。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 堀裕治

堀裕治の論文は3部より構成されている。第一部はそれまでARSに結合する以外は機能が不明であったOrcが予想どおり、複製開始に必須であることを遺伝子破壊株に誘導遺伝子を組み込んで証明し、さらにOrcがS期進行のチェック機能を持っていることを示唆したもので、この分野の先駆的な研究として評価できる。この研究は修士の期間に独自で行ったもので、第一著者としてMol. Biol. Cellに発表済みである。第二部は最近注目されてきた細胞周期のS期チェックが複製開始の制御とどのように連携しているかを明らかにするために行ったもので、これは本研究室で、出芽酵母第6染色体上の9個の複製開始点の複製開始頻度と複製開始タイミングについての解析が展開した結果である。堀はDNA傷害に伴う細胞周期の進行の遅延が主としてS期の遅延と停止によることを確認したのち、第6染色体の右腕の逐次的な複製にたいするチェック制御の働きとそれに対する種々の遺伝子の変異の影響を解析した。その結果、S期の遅延と停止は後期複製の著しい遅延と後期複製開始点の選択的な阻害によることを明らかにした。さらに、rad53とorc2の変異によって、DNA傷害に伴う遅延も停止も起こらず細胞が死滅すること、傷害がないときには複製順序が乱されることが明らかになった。この研究は真核細胞染色体上に存在する複数の開始点の複製順序を決定する機構とS期進行の制御が、後期複製開始点の選択的な抑制によって連携していることを初めて明らかにしたもので高く評価された。Nature誌への発表は第二著者であるが、白髭助手の指導を受けたものの、実験の殆どは堀によって行われたものである。以上のように第一、第二部は既に発表され、評価も確定しているから、審査は主として、未発表の第三部について行われた。

第三部はS期チェック機構に複製開始タンパクであるOrc2自身が係わっているという意外な発見を発展させることを目的に、orc2-1変異を抑圧する遺伝子変異の探索を始めた。その過程で、orc2-1株に付加変異が存在し、その遺伝子の破壊がorc2-1変異を抑圧すること、更に、その遺伝子が酵母からヒトまで広く、高度に保存され、ヒトでは指と足の形成異常に係わる原因遺伝子であることが判明した。そこで、遺伝子(Hod1)の機能解析を行ったところ、核に局在し、G2/M期の進行を制御する新規の細胞周期制御遺伝子であることを明らかにした。更に、細胞分裂の進行に深く関与するAPCの関連遺伝子であるsic1とcdc27の変異と合成致死を起こすことを発見した。これらのことからhod1がG2/M期の進行に伴う複製開始複合体の崩壊に係わる可能性を考え、核内分子の核外輸送の解析を共同研究で行ったところ、mRNAの輸送が破壊株で著しく阻害されることを見いだしている。この研究は出発材料であるorc2-1変異株に付加変異が内在していたこと、クローニングした遺伝子が89アミノ酸という小型のたんぱくで（勿論酵母ゲノムデータベースにも登録されておらず）しかも3つの保存ドメインの中のどの2個でも機能するという特殊なタンパクであるという困難を克服して、新規遺伝子を発見したという経過が先ず評価された。更にこの研究はオリジナリティーが高く、細胞周期制御に関わる遺伝子群の発現制御にRNA輸送やタンパク質輸送が重要な役割を果たしている可能性を示唆する結果を得ていること、ヒトを含む哺乳動物では発生の過程での器官形成にも重要な役割を果たしている遺伝子の機能解析に道を開いたことなど、高く評価された。

以上3課題の研究を総合して、博士論文として価値あるものと評価された。