

論文内容の要旨

申請者氏名 マクスム ラジ

細胞周期進行の制御はG1, S, G2, M の各段階で行われている。中でもG1期およびG1/S境界における制御は細胞の増殖と分化（生殖細胞化）の岐路を決定する重要な機能である。出芽酵母はG1期が長いこと、形態変化が明瞭であり、G1期制御の研究の適していることから、多くのCDC(cell division cycle)変異が分離され、シグナル伝達系や転写制御のカスケードの理解が進んでいる。1980年代に多くのCDC変異が分離され、機能解析が行われているが、唯一cdc50-1変異はG1停止低温感受性変異として報告された後全く研究されていない。G1制御の未知のステップを解明することを目的に責任遺伝子の同定、クローニングと機能解析を行った。

cdc50-1の低温感受性増殖を相補する遺伝子をゲノムライブラリーからクローニング、ゲノムデータベースから、YCR094Wを推定、サブクローニングによって証明した。次いで、cdc50-1変異を同定したところ、YCR094WのORFのイニシエーションコドンにミスセンス変異が生じていた。同じフレームにATGコドンが近くに存在しないことから、変異は産物のない、いわゆるnull変異であることが推定された。このことはYCR094WのORFを破壊すると同じ低温感受性表現型を生じることで確認された。

Cdc50は391アミノ酸のタンパクで、既知のモチーフは全く存在せず、配列から機能を予想することは出来なかった。一方、データベースの探索から、出芽酵母ゲノムに2種類のパラログA,Bを発見した。これらの遺伝子を過剰発現すると何れもcdc50-1の変異を相補した。又単独では破壊しても温度感受性の変異を示さないが、cdc50-1変異と2重変異を作ると許容温度下でも増殖阻害が生じた。又、3重変異は致死的であった。以上のことからCdc50は2個のパラログとファミリーを構成し、共通の機能を分担している可能性を考えた。

cdc50-1及び Δ cdc50変異株は非許容温度で α -因子の作用点の近傍で細胞周期を停止した。このことは、Cdc50遺伝子産物が細胞増殖過程と接合過程の分岐を決定する調節因子であることを示唆している。そこで、Cdc50の変異を抑圧する遺伝子を探索したところ、cdc39遺伝子がマルチコピーで抑圧することを発見した。Cdc39は接合過程に係わる遺伝子群の転写を抑制する転写因子として知られているものであるから、これが選択的に抑制する遺伝子CYC1の転写に対するcdc50ファミリーの変異の影響を調べた。その結果予想通り、cdc50の破壊および、パラログとの2重破壊はCYC1の転写を著しく促進した。

以上の結果、cdc50遺伝子ファミリーは接合過程に係わる遺伝子群の転写を抑制する転写因子Cdc39の共抑制因子であると結論した。この遺伝子産物の欠失が調節機能を低温感受性にするという事実は、転写因子群が形成すると考えられている超タンパク複合体の構造と機能を理解する上で新しい視点を与える重要な発見と評価できる。

この研究は第一著者論文として専門誌Yeastに投稿し、2000年2月15日受理されている。

論文審査結果の要旨

申請者 マクスム ラジ

本論文は出芽酵母を用いて、細胞周期、特にG1期およびG1/S境界を制御する因子の機能を解析することによって、未だに不明な点が多い細胞増殖と細胞分化を決定する分子機構を明らかにすることを目的とした。

新規にcdc変異を分離する試みに失敗したので、既に分離されているが機能解析が行われていないcdc50を選び、責任遺伝子のクローニングと機能解析を行った。ゲノムライブラリーから得たクローンは出芽酵母ゲノムのデータベースとの照合によって、機能未知のORF (YCR094W)であること、更に2種類のパラログが存在することを明らかにした。元のcdc50-1変異株についてこのORFの変異を調べたところ、開始コドンだけにミスセンス変異を認めた。このことは遺伝子の完全破壊株がcdc50-1と同じ低温感受性であることを証明して、このORFがCdc50遺伝子であると決定した。この事実は酵母研究者間で承認され、98年にゲノムデータベースに登録されている。

2種のパラログが機能的にcdc50遺伝子のファミリーであることは詳細な遺伝的解析によって明らかにした。単独の遺伝子破壊によって温度感受性を示すのは、cdc50のみであることから、3つの遺伝子産物の共同作業において、Cdc50が中核的役割を担っていることを示した。

酵母ゲノム機能研究の発展によって、遺伝子産物の欠失によって細胞機能が高温又は低温感受性になることが発見され、新しい遺伝子機能として注目されている。そのような現象が起こる可能性として、当該の遺伝子産物が特定のタンパク複合体と相互作用し、細胞にとって異常な低温、高温において複合体を安定化するような機能が想定される。このような観点から、Cdc50タンパクに相互作用するタンパクをマルチサブレッサーの探索によって求めたところ、Cdc39遺伝子を発見した。面白いことにこの遺伝子は染色体上でCdc50に隣接している。

Cdc39は細胞を接合過程に進行させる遺伝子群の転写抑制因子であるので、勇気を得て転写活性をガラクトースとの融合タンパクによって発現を定量するシステムを研究室に初めて導入し、Cdc50及びそのパラログが予想通りCdc39の補助抑制因子であることを証明した。Cdc39は転写因子として複雑な複合体を形成することが提唱されており、それを裏付けると共に複合体の安定化に係わる因子の存在を示したことは高く評価できる。

このように、本論文は遺伝子のクローニングによる新しい細胞周期制御因子の同定、そのパラログ遺伝子の遺伝的解析、そして遺伝子産物と相互作用する因子の発見、と転写因子としての機能の証明、という一連の研究を見事に完成させたもので、分子生物学に初めて接して3年間の研究として優秀であり、博士論文として価値あるものと認められた。