

氏名	伊 波 英 克
学位（専攻分野）	博士（理学）
学 位 記 番 号	総研大甲第38号
学位授与の日付	平成4年 9月28日
学位授与の要件	生命科学研究科 遺伝学専攻 学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Studies of Fission Yeast Homologues of a RAS Protein-Processing Gene of Baker's Yeast
論文審査委員	主 査 教 授 堀 内 賢 介 教 授 瀬 野 俣 二 教 授 石 濱 明 助教授 西 村 昭 子 教 授 東 江 昭 夫（東京大学）

論文内容の要旨

Anchoring to the inner surface of the plasma membrane is necessary for mammalian ras proteins and their counterpart, RAS1 and RAS2 proteins, of baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae* to be functional. Attachment of a hydrophobic moiety to the C-terminal region is the key reaction for this intracellular localization. Two allelic mutant genes, *dpr1* (defective in the processing of RAS proteins) and *ram1* (RAS protein and a-factor maturation function), have been independently identified in *S. cerevisiae* genome. In the mutant cells, RAS remains in cytosol in a precursor form, thus the signal transduction via RAS is no longer effective. In addition to the deficiency of RAS-processing activity, the *dpr1/ram1* causes a mating defect specifically in a cells, and a recessive temperature sensitive phenotype in both cell types. The *S. cerevisiae* genomic DNA clone which suppresses the *dpr1* mutation has been isolated and its nucleotide sequence has been determined. The *DPRI* gene encodes a hydrophilic protein of 431 amino acids. The C-terminal half of the *DPRI* shows high content of cysteine. *DPRI* also contains the active site motif of thiol protease. *CAL1* (allelic to *CDC43*) is an essential gene for the selection of budding site and nuclear division of *S. cerevisiae*. *CAL1* shows extensive similarity (especially in the C-terminal region) with *DPRI*, and over-expression of *CAL1* suppresses the temperature sensitive phenotype of *dpr1* mutant. From their similarities in function and deduced amino acid sequence, *CAL1* is regarded as a homologue of *DPRI*.

Since the expression of mammalian Ha-ras p21 in the *S. cerevisiae ras1 ras2* double mutant successfully rescued the lethal phenotype, the processing system of ras protein seemed to be conserved in eukaryotic cells and the *DPRI*-like gene might exist in higher eukaryotes. To elucidate the conserved function and structure of *DPRI* and *DPRI*-related genes, an attempt to isolate *DPRI* homologues from fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* was performed as follows. Utilizing a part of the DNA fragment of *DPRI* which

corresponds to the C-terminal region of its product, four clone groups have been isolated from the *S. pombe* genomic DNA library. These four clones were designated as pdh1 to pdh4 (*S. pombe* DPRI homologous clone). Northern blot analysis showed pdh1, 2 and 3 contain whole or a part of transcribed genes in cells at middle of logarithmic phase. Disruption of pdh1 locus, containing the region which gives the strongest signal during Southern blot analysis with *DPRI* probe DNA, caused lethality to *S. pombe* cell. Expression of *DPRI* or other *DPRI*-related genes (*CAL1* or *BET2*) of *S. cerevisiae* in pdh1⁻ cell did not complement the lethal phenotype. Screening with the DNA fragment of pdh1 gene as a probe, two positive clones (pdh1c10A-1 and pdh1c10B-2) were isolated from an *S. pombe* cDNA library. The nucleotide sequence of the 2.5 kb of pdh1c10A-1 showed an open reading frame encoding a hydrophobic polypeptide (pdh1.aal) of 226 amino acids with seven potential trans-membrane domains, characteristic for G-protein coupled receptor family. pdh1.aal showed the highest similarity with mas oncogene product in the Nterminal region. From the sequence analysis of pdh1gS.2, a 5.2 kb *S. pombe* genomic DNA fragment containing the entire 1.4 kb EcoRI fragment of pdh1, a short 14 base pair (bp) stretch which is identical to a part of *DPRI* probe DNA was found. In addition, the 14 bp stretch was also found in the 3' untranslated region of pdh1c10A-1. From these sequence data, it is unlikely that pdh1 locus encodes a *DPRI* homologue. The nucleotide sequence of the 1.8 kb *HindIII* fragment of pdh2 locus did not show any significant homology with *DPRI* either.

As an additional attempt to test if *S. pombe* carries homologous sequence to *DPRI*, we utilized the PCR technology. From the conserved region of *DPRI* family, PCR primers were designed. Amplified DNA fragments were obtained using *S. pombe* cDNA library as templates and the nucleotide sequences of two clones, #1-3 and #2-2-2, were determined. The similarities between *DPRI* and deduced amino acid sequences of #1-3 or #2-2-2 were 23.3% and 18.5%, respectively.

論文の審査結果の要旨

癌遺伝子 RAS はヒトから酵母にいたるまで広く真核生物に保存されているが、その機能と一次構造の類似性の程度は種によって異なる。RAS 蛋白質は、そのカルボキシル末端にファルネシル基が結合する等のプロセッシングを受けて初めて機能するが、同様のプロセッシングは他の重要な諸蛋白質にもみとめられることが明らかになっている。出芽酵母で RAS 蛋白質のプロセッシングを司る *DP R 1* 遺伝子が分離されているが、伊波氏は *DP R 1* と構造的類似性を持つ遺伝子を分裂酵母から分離することを試みた。まず *DP R 1* 遺伝子の一部をプローブとして、分裂酵母のゲノムライブラリーからプローブと相同性をもつクローンを多数分離し、制限酵素による解析からこれを 4 種類に分類して *p d h 1-4* と名づけた。*p d h 1-3* については、その *DP R 1* 相同部位が細胞内で転写されることが示された。このうち特に *p d h 1* について詳細な解析を進め、*p d h 1* 部位が分裂酵母の生存に不可欠なこと、*p d h 1* 部位の欠損が出芽酵母の *DP R 1* 或いはその関連遺伝子の発現によって相補されないことを示した。また、*p d h 1* DNA をプローブとして、分裂酵母の cDNA ライブラリーより *p d h 1* の cDNA クローンを分離し、その塩基配列の解析を行った結果、*p d h 1* がコードする蛋白質 (*p d h 1 . a a 1*) は 7 つの膜貫通領域を持った 226 アミノ酸残基から成る疎水性蛋白質で、*mas* 癌遺伝子との相同部位をもつことを示し、RAS または G 蛋白質に共役したりセプター蛋白であると推定した。この研究は、ある遺伝子から出発して、一次構造上の類似性をもった異なる蛋白質の遺伝子を探すという手法を用いて興味ある遺伝子を発見したものであり、博士論文としての条件を満たすものであることを、審査員全員一致で認めた。

なお、博士論文に関わる専門分野並びにその関連分野に関する学識、及び独立の研究者として必要なその他の能力について口述試験を行ったところ、伊波氏の応答は極めて満足すべきもので、この分野全般にわたって十分な知識をもつことが明かであった。この結果、審査委員全員一致して、伊波氏が学位授与に足る学識と能力を持つとの結論に達した。