

氏 名 朴 俊 炫

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第687号

学位授与の日付 平成15年3月24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 A ubiquitin pathway associated with genome integrity
in fission yeast

論文審査委員 主 査 教授 池村 淑道
教授 荒木 弘之
教授 佐々木 裕之
助教授 角谷 徹仁
教授 東江 昭夫（東京大学）

論文内容の要旨

ユビキチン (ubiquitin) は分子量 8,600 のタンパク質で、すべての真核生物に共通して存在し、その構造上の保存性がきわめて高いことが特徴である。タンパク質のユビキチン化の作用のおもなものは、それが分解シグナルとして働き、ユビキチン化されたタンパク質が、巨大なプロテアーゼ (protease) 複合体であるプロテアソーム (proteasome) の標的となり、急速に分解されることにある。ユビキチン研究が分子遺伝学、分子生物学、細胞生物学の様々な分野から多大の興味を集めてきた。ユビキチンシステムの主要な役割であるタンパク質の分解は、従来の細胞内の不要物の除去機構としての負のイメージを脱して、逆に積極的な細胞機能の調節機構として再評価されるに至っている。その重要性は、細胞間相互作用、細胞周期、情報伝達、遺伝子発現制御など近年ますます多くの重要な生命現象へと拡大し、その分子レベルでの実体が確認されてきている。更に、最近では、ユビキチンによる翻訳後修飾がタンパク質の分解以外のシグナルとして作用し、ユビキチン化タンパク質の機能修飾や機能変換を通して、多様な細胞機能を調節すると考えられるケースが見つかってきたことは、ユビキチンシステムの機能制御系としての位置づけを更に確固たるものにしていく。

相同組換えは、原核生物および真核生物を問わず重要な生物学的機能であるが、無秩序な相同組換えはゲノムの不安定化を導くので、正確に制御されなくてはならない。二倍体真核生物では相同組換えは減数分裂に必須であるのに対して、有系分裂期には抑制されているが、この遺伝的組換えの制御機構の、分子レベルでの実体はほとんど未知に残されてきた。最近の研究により、組換えの関連タンパク質が、ユビキチン様のタンパク質である SUMO (small ubiquitin-related modifier) によって修飾されることが報告された。このように細胞内で様々な役割を果たすユビキチン化が、相同組換え活性の制御にはたして影響を与えているのかどうか、もしそうならば、その生物学的な意味を知ることは、興味深くまた重要な研究課題である。

本研究では、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) におけるユビキチン転移酵素 (ubiquitin-conjugating enzyme) の E2 分子種の組織的な検索とその機能を解析する過程で、特定の破壊株で、接合型のヘテロタリズム (heterothallism; 性的異質接合性) をホモタリズム (homothallism; 性的同質接合性) に転化させるものを見出ししている。分裂酵母のユビキチン転移酵素 Ubc7 を破壊することによって、相同組換えが高頻度に誘発されることが観察された。分裂酵母のヘテロタリック株 h^{+N} は *mat1* 座における *mat* 配列の重複配列によりヘテロタリズムの表現型を示すことが知られている。Ubc7 が欠損すると通常は接合型を変換しない h^{+N} 株が、高頻度にホモタリックの h^{90} に変換している。この変換は一倍体細胞内で、減数分裂には依存せずに、高頻度に接合能を有した h^{90} 株を生じ、且つ接合や胞子形成を効率よく行っている。この現像は *mat2*, *mat3* のサイレント部位での接合型情報を欠失したタイプのヘテロタリック株の h^{+s} 及び h^{-s} では観察されず、 h^{+N} 株に特異的であった。

遺伝子座の構造上の変化を調べたところ、ホモタリック株 h^{90} と同じ構造を示しており、*mat* 配列の重複配列が Ubc7 の破壊によってループアウトしていることが示唆

された。この組換えは *smt* (switching for mating-type) と関連する DSB (double strand break) と考えられる組換えの開始に依存することも示された。また、*ade6* 座での重複配列に対する相同組換えの頻度は、Rad2 (*hen-1*) 欠損による DNA の組換え能の獲得に依存して、Ubc7 欠損株では野生型より 10 倍以上に増加していた。更に、Ubc7 破壊株は DNA 損傷を誘導する紫外線と MMS (methylmethane sulfonate) の処理に対して野生型より抵抗性を示し、その抵抗性は真核生物の組換え遺伝子 RecA ホモログである *rhp51* の機能に依存していた。Ubc7 欠損株の多様な性質を明らかにする目的で、セントロメア領域に位置する *otr1R* 遺伝子座へ挿入した *ade6⁺* を指標に、遺伝子 silencing への効果を解析したところ、Ubc7 欠損株では部分的に silencing 能を失う現象を見出した。Ubc7 欠損株が相同組換え頻度を上昇させる分子機構のモデルの一つとして、クロマチン構造への影響が考えられる。

以上の結果を総合して、Ubc7 のユビキチン経路は、有糸分裂期の相同組換えの起こす開始とその後の組換え自体のステップにわけると、後者を抑制的に制御していると推定している。

論文の審査結果の要旨

ユビキチンシステムによるタンパク質の分解は、細胞内の不要物の除去機構としてのみでなく、細胞間相互作用・細胞周期・情報伝達・遺伝子発現制御など多くの細胞機能の調節に積極的に関与することが判明してきている。また、ユビキチンによる翻訳後修飾が分解以外のシグナルとしても作用し、ユビキチン化タンパク質の機能修飾や機能変換を通して細胞機能を調節する例も知られるようになってきた。朴氏は、このような研究の現状を考え、本研究において、組換え機構におけるユビキチンシステムの役割の解明を目指した。二倍体真核生物では相同組換えは減数分裂に必須であるのに対し、有糸分裂期には抑制される傾向にあるが、その制御機構には不明な点が多い。適正な制御のない相同組換えはゲノムの不安定化を導くので、正確に制御される必要がある。組換え関連タンパク質がユビキチン様のタンパク質である SUMO により修飾される報告があるが、朴氏は、ユビキチン化が相同組換え活性の制御に関与する可能性を解析した。研究の初期において、分裂酵母におけるユビキチン転移酵素の E2 分子種の検索と機能解析の過程で、ユビキチン転移酵素 Ubc7 を欠損させると相同組換えが高頻度に誘発されることを観察した。すなわち、特定の欠損株で、接合型のヘテロタリズム（性的異質接合性）をホモタリズム（性的同質接合性）に転化させるものを見出した。分裂酵母のヘテロタリック株 h^{+N} は交配型遺伝子の *mat1* 座における *mat* 配列の重複によりヘテロタリズムの表現型を示すことが知られているが、Ubc7 が欠損すると通常は接合型を変換しない h^{+N} 株が高頻度にホモタリックの h^{90} に変換することを見出した。この現象は *mat2*, *mat3* のサイレント部位での接合型情報を欠失したヘテロタリック株 h^{+s} 及び h^{-s} では観察されず、 h^{+N} 株に特異的であった。従って、Ubc7 の欠損により h^{+N} の *mat* 配列の重複配列が相同組換えにより欠失し、 h^{90} 株となったと考えられる。この接合型変換は一般に *smt* における二重鎖の切断に依存しているが、Ubc7 欠損株での h^{90} 株への変換でも同様であった。一方、*ade6* 座での重複配列に対する相同組換えの頻度は Ubc7 欠損株で変化しないが、Rad2(hen-1)欠損により DNA の組換え開始を起こしやすくすると、Ubc7 欠損株では野生型より 10 倍以上に増加した。このことから、Ubc7 のユビキチン経路が組換えの開始ではなくその後のステップを抑制的に制御すると推論している。Ubc7 欠損株は DNA 損傷を誘導する紫外線と MMS の処理に対して野生型より抵抗性を示し、この抵抗性は真核生物の RecA ホモログである Rhp51 の機能に依存していた。Ubc7 欠損株の性質を多様な側面から明らかにする目的で、セントロメア領域に位置する *otr1R* 遺伝子座へ挿入した *ade6+* を指標に、遺伝子 silencing への効果を解析したところ、Ubc7 欠損株では部分的に silencing 能を失う現象を見出した。Ubc7 欠損株が相同組換え頻度を上昇させる分子機構のモデルの一つとして、クロマチン構造への影響を推論している。

審査委員一同は、学位申請の本研究は、ユビキチンシステムの研究において興味深い分野を開拓し着実な成果をあげたと判断し、本学の学位授与に相応しいと判断した。