



Title	A series of single and double disruptants of protein phosphatase genes and their functional analysis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Author(s)	作本, 直子
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43475
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	ま 作 本 直 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (工 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 1 0 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 14 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 工学研究科応用生物工学専攻
学 位 論 文 名	A series of single and double disruptants of protein phosphatase genes and their functional analysis in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 全プロテインホスファターゼ遺伝子単一および二重遺伝子破壊株の構築と機能解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 原 島 俊
	(副査) 教 授 下 田 親 教 授 関 達 治 教 授 室 岡 義 勝 教 授 卜 部 格 教 授 福 井 希 一 教 授 小 林 昭 雄 教 授 塩 谷 捨 明 教 授 吉 田 敏 臣 教 授 金 谷 茂 則 教 授 二 井 將 光

論 文 内 容 の 要 旨

本論文は、*Saccharomyces cerevisiae* (出芽酵母) における全プロテインホスファターゼの細胞生理的役割についての研究成果をまとめたものであり、序文、本文3章および総合考察からなっている。序文では、ゲノムの全塩基配列が決定された *S.cerevisiae* のプロテインホスファターゼ (PPase) 遺伝子について本研究の背景をなす知見を概説し、本研究の目的と意義を明確にした。

第1章では、ゲノムの塩基配列から推定された32個全ての PPase 単一遺伝子破壊株を構築し、それらの表現型を調べた。増殖に必須な遺伝子は3個 (*GLC7*、*CDC14*、*SIT4*) であった。機能未知の *ycr079w* 遺伝子破壊株がカフェイン感受性を示した。また、*Yvh1* が低温での増殖に関与していることを明らかにした。

第2章では、PPase の機能重複を調べるために、PPase 二重遺伝子破壊株を構築し、その表現型を調べた。本章では標準株の一つである W303株を親株に用いた。単一破壊の結果、増殖に必須な遺伝子は2個 (*GLC7*、*CDC14*) であった。これらを除く30遺伝子の全ての組み合わせ (435通り) で二重遺伝子破壊株を構築した結果、全ての二重破壊株が生存可能であった。破壊株の表現型解析の結果、435個のうち4個の二重遺伝子破壊株が合成的表現型を示した。*pph21 pph22* (両者 PP2A family) 破壊株と *ppz1 ppz2* (両者 PP1 family) 破壊株の表現型は以前の報告と同様に増殖遅延を示した。*msg5 ptp2* (DSP family と PTP family) 破壊株が CaCl_2 感受性を示し、*msg5 ptc2* (DSP family と PP2C family) 破壊株が NaCl と CaCl_2 に感受性を示した。

第3章では Two-hybrid 法により *Yvh1* と結合するタンパク質 *Yph1* (Yeast Pescadillo Homolog 1) を同定した。*Yph1* はタンパク質間相互作用に関与するといわれている BRCT (BRCA1 C-terminus) モチーフを持つが、この領域が *Yvh1* の活性触媒領域と結合する事を見出した。また *YPH1* の多コピープラスミドは *yvh1* 遺伝子破壊による増殖遅延と胞子形成に必要な *IME2* 遺伝子の転写誘導の低下を抑圧したことから、*Yph1* は *Yvh1* の下流で働き、増殖だけでなく胞子形成にも関与することが明らかになった。

また、*Yvh1* の活性触媒領域が *Yph1* と結合することから *Yph1* が *Yvh1* の基質タンパク質である可能性が考えられた。

総合考察では、得られた知見をまとめ、今後の課題について述べた。

論文審査の結果の要旨

個々の生命現象の理解の積み重ねから生命を理解するという従来の考え方ではなく、生命の全体像を丸ごと理解しようとする新しい考え方、すなわち、「ゲノムサイエンス」が、生命科学の新しい discipline として認識されつつある。本研究は、出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を真核生物のモデルに、そうした生命の全体像にせまるゲノムプロジェクトの一環として行われたものである。

ゲノムプロジェクトによって明らかにされた出芽酵母の約6,000の遺伝子のうち、約250がリン酸化されるタンパク質をコードすることが知られている。リン酸化タンパクの全てが必ずしも可逆的なリン酸化・脱リン酸化による活性制御を受けているわけではないが、それらがどのようなプロテインキナーゼ (PKase) によってリン酸化され、どのようなプロテインホスファターゼ (PPase) によって脱リン酸化されるかについてはほとんど知見がない。一方、ゲノムの全塩基配列情報によって、出芽酵母には117種の PKase、32種の PPase 遺伝子の存在が推定されている。リン酸化、脱リン酸化をうけるタンパク質は、これらの PKase と PPase のいずれか、あるいは複数によって制御を受けていると期待される。従って、これらの全てを網羅的に解析することによって、タンパク質のリン酸化による細胞生理プロセス制御の全体像について、従来の遺伝学や生化学による個別の研究では得られなかった有用な情報が得られることが期待される。しかし、細胞に多数存在する PKase や PPase には機能重複の問題があり、単一の遺伝子を破壊しても表現型が見られない場合が多々あることが、欧米の出芽酵母全遺伝子単独破壊プロジェクトによって明らかになっている。

本論文は、こうした PPase の機能重複の問題を考慮して、32個の PPase 遺伝子の単独破壊株だけでなく、単独破壊株が致死である2個を除いた30個について、全ての組合わせの二重破壊株 (全ての破壊株が致死でなければ435通り) を、世界に先駆けて構築し、その表現型を網羅的に解析したものである。本論文の成果を要約すると次の通りである。

- (1) 出芽酵母の32個全ての PPase について、単一破壊株を作成し、その表現型を網羅的に解析して、増殖に必須の PPase、高温あるいは低温感受性増殖、カルシウム感受性、塩感受性、カフェイン感受性など様々な表現型を見い出している。
- (2) 単一破壊株が致死でない30個の PPase について、全ての組み合わせ (435通り) の二重破壊株を構築し、全ての二重破壊株が致死でないことを見い出している。
- (3) さらに、それら435株について、様々な表現型を解析した結果、4組の二重破壊株で、それぞれの単独破壊株で見られない表現型を見い出している。また、それらのうち2組については、PPase の異なるファミリーに属するもので表現型が現れることを見い出している。
- (4) 破壊株が低温感受性増殖を引き起こすことを見い出した Yvh1 を取り上げ、これと結合するタンパク質として Yph1 を同定している。結合領域の限定実験から、タンパク質間相互作用に関与するといわれている BRCT モチーフのある Yph1 の領域が、Yvh1 の活性触媒領域と結合すること、および、*YPH1* の多コピープラスミドが *yvh1* 遺伝子破壊による増殖遅延と胞子形成に必要な *IME2* 遺伝子の転写誘導の低下を抑圧することから、Yph1 は Yvh1 の下流で働き、増殖だけでなく胞子形成にも関与することを明らかにしている。また、Yvh1 の活性触媒領域が Yph1 と結合することから Yph1 が Yvh1 の基質タンパク質である可能性を提示している。

以上のように、本論文は、出芽酵母の全ての PPase について、単独破壊株のセットを作成するだけでなく、単独破壊株が致死でない30個の PPase については全ての組合わせの二重破壊株のセットを世界に先駆けて作成し、今後の出芽酵母のゲノムプロジェクトにおける非常に有用なリソースを構築している。また、そうした破壊株を構築しただけでなく、実際に破壊株の表現型を網羅的に解析することにより、今まで明らかにされていなかった細胞生理における PPase の機能を明らかにしている。さらに、破壊株の解析を通じて、異なるファミリーに属する PPase に機能重複が見られるなど、PPase の機能について新しい概念を提示している。これらの成果は、ゲノムプロジェクトにおける貢献のみならず、PPase の分野についても寄与するところが大きい。よって、本論文は博士論文として価値のあるものと認める。