

氏名(本籍)	小 <sup>こ</sup> 森 <sup>もり</sup> 加代子 <sup>かよこ</sup> (埼玉県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博乙第1,305号		
学位授与年月日	平成9年7月25日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
審査研究科	生物科学研究科		
学位論文題目	Studies on Mitochondrial DNA Topoisomerase II of <i>Dictyostelium discoideum</i> . (細胞性粘菌ミトコンドリアのDNAトポイソメラーゼIIに関する研究)		
主査	筑波大学教授	農学博士	田仲可昌
副査	筑波大学教授	理学博士	猪川倫好
副査	筑波大学教授	理学博士	平林民雄
副査	筑波大学助教授	理学博士	漆原秀子

### 論文の内容の要旨

真核生物の核内DNAは、ねじれを持った折り畳み構造をとっており、その構造がDNAの様々な事象に深く関わっていると考えられている。このようなDNAのねじれを変える酵素としてDNAトポイソメラーゼIIが知られている。この酵素は細胞増殖に関する分野では広く研究されているが、遺伝子発現との関係についてはあまり調べられていない。しかし、この酵素を介したDNAの構造変化が遺伝子発現を調節している可能性が考えられる。一方、細胞性粘菌は発生・分化の過程が極めて単純であり、また増殖期と発生・分化期が時間的に分離しているため、発生・分化に伴う遺伝子発現の調節機構を調べるための良いモデル系である。本研究は、細胞性粘菌を用いて、遺伝子の発現とDNAトポイソメラーゼIIとの関係を明らかにすることを目的としている。

まず、細胞性粘菌のDNAトポイソメラーゼII (TopA) をコードしている遺伝子 (*topA*) をクローン化した。構造解析の結果、コア領域は他の真核生物のDNAトポイソメラーゼIIと似ているが、C末端側が約260~300アミノ酸短く、逆にN末端側が約70~80アミノ酸程長かった。発生・分化期の様々な段階のmRNAとタンパク質のレベルを調べたが、両レベル共に発生・分化期に入ると減少し、TopAと細胞性粘菌の発生・分化との関連性を示す結果は得られなかった。次に、このタンパク質の細胞内分布を調べるために核画分とミトコンドリア画分についてウエスタンブロットで局在を検討したところ、TopAがミトコンドリアに局在することがわかった。そこでアミノ酸配列をよく検討したところ、N末端の領域がミトコンドリア移行シグナルと似た両親媒性の $\alpha$ ラセン構造を取り得ることがわかった。また、TopAの細胞内での機能を調べるために、粘菌では高頻度で行える相同性組換えを用いて遺伝子破壊を試みたが、*topA*欠損株は得られなかった。TopAも他の真核生物のDNAトポイソメラーゼIIと同様に生存に必須であるために、*topA*欠損株は致死となっている可能性が高い。

現在までに知られている真核生物のDNAトポイソメラーゼIIは核に局在する酵素がほとんどで有るため、その情報は核型の酵素に関するものに片寄っており、ミトコンドリア型に関するものは殆ど得られていない。そこで、TopA局在を更に詳細に調べた。間接蛍光抗体染色法を用いて、TopAの局在を調べたところ、予想通りミトコンドリアに局在することが分かった。さらに、ミトコンドリア局在へのN末端領域の関与を明らかにするために、N末端領域(82個のアミノ酸)を欠いたTopAを導入した株( $\Delta$ N246)と、コントロールとして完全長のTopAを導入した株(WT)を作成し、間接蛍光抗体染色法とプロテナーゼK消化実験で両者の局在を調べた。その結果、完全長のTopAはミトコンドリアに局在出来るが、N末端領域を欠いたTopAはミトコンドリアに局

在出来ず細胞質のみに存在した。すなわち、N末端領域の82個のアミノ酸配列の中にTopAのミトコンドリア移行シグナルが存在することが明らかになった。DNAトポイソメラーゼⅡで、また細胞性粘菌のタンパク質でミトコンドリア移行シグナルの存在が確認されたのは、本研究が初めてである。また、TopAと核との関係についても免疫沈降実験を行って調べた。その結果、TopAはミトコンドリアに特有なタイプで、核には別にDNAトポイソメラーゼⅡが存在することが示された。

### 審 査 の 結 果 の 要 旨

粘菌は生物の発生分化や細胞運動の研究の優れたモデル生物である。本研究は、この興味深い生物のDNAトポイソメラーゼⅡ遺伝子をクローン化し、この酵素の細胞内局在について、以下の様な新しい発見をしたことで、高く評価できる。1) 現在までに報告されている真核生物の核に局在するDNAトポイソメラーゼⅡとアミノ酸配列で良く似ているにもかかわらず、細胞性粘菌のこの酵素はミトコンドリアに局在していること、2) この酵素のN末端領域の82個のアミノ酸を欠いた変異型酵素はミトコンドリアに局在できず、細胞質にとどまることが分かったことから、この部分にミトコンドリア移行シグナルがあることを明らかにしたこと。これらの知見は、DNAトポイソメラーゼⅡの分子進化に関して、また、細胞性粘菌の分類学的位置についても、重要な知見を提供したものである。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。