

(別紙様式第7号)

学位論文審査の結果の要旨

氏名	大渡 康夫
審査委員	主査 川向 誠 (印)
	副査 中川 強 (印)
	副査 戎能 智宏 (印)
	副査 松下 一信 (印)
	副査 森 信寛 (印)
題目	分裂酵母の有性生殖過程における <i>msa2</i> および <i>sam4</i> の機能解析
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>分裂酵母 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) は、生育に必須な栄養源が豊富にある環境下では、通常1倍体で体細胞分裂を行い、1回の細胞周期で二分裂を繰り返しながら増殖を行う。しかし、栄養源が枯渇した場合、それを細胞が感知すると細胞周期をG1期で停止させ、細胞のなかで、再び細胞周期を回転するか、停止したままG0期(静止期)に移行するか、あるいは別の細胞と接合して二倍体細胞を形成したのち有性生殖過程へと移行するか、いずれかの運命決定をおこなう。この運命決定を司るのが、細胞内シグナル伝達系である。分裂酵母の場合、有性生殖過程への移行には主に4つのシグナル伝達系が関与している。一つは、グルコース(炭素源)の有無を伝えるcAMP-PKA経路、二つ目は窒素源などの栄養を感知するTOR経路、三つ目は温度、浸透圧、栄養源枯渇などのストレスを伝えるストレス応答性MAPK経路、四つ目は異性間で発するフェロモンを感知するフェロモン応答性MAPK経路である。これら複数のシグナル伝達系がそれぞれ個々に、あるいはクロスリンクしながら有性生殖過程への移行を正確に制御している。以前、栄養源の枯渇を必要とせずに孢子形成する9つの変異株(<i>sam</i>: skip the requirement of starvation for mating)が単離されている。本研究ではこの<i>sam</i>変異株を用いて、分裂酵母の有性生殖過程の制御に関わる因子を同定し、機能解析を行った。</p> <p>まず、筆者は有性生殖過程への移行を負に制御するMsa2の機能解析について調べた。Msa2は<i>sam1</i>変異株の表現型を抑圧するマルチコピーサプレッサーとして単離された因子で、配列中にRNA認識モチーフ(RRM)を4つもった典型的なRNA結合タンパク質をコードしていた。このMsa2と相互作用する因子としてCpc2タンパク質(WDリピート構造を有する)を同定し、Cpc2が有性生殖過程への移行を促進する正の制御因子であることを示した。この負と正の二つの因子による相互作用は、分裂酵母の有性生殖過程への移行を決定する新しい制御機構であると考えられる。Msa2タンパク質は、栄養源枯渇の条件下においてリン酸化修飾を受けることが分かった。</p>	

Msa2 のリン酸化は、フェロモン MAPK をコードする *spk1* 遺伝子に依存しており、リン酸化された Msa2 タンパク質は、機能の低下が確認された。また、RRM 領域に変異を加えると、同様に機能の低下がみられた。加えて、*cpc2* 遺伝子を欠損した細胞では有性生殖に必須の転写因子である Ste11 タンパク質の翻訳が顕著に低下していることが分かった。さらに、Msa2 タンパク質は、通常は細胞質に局在しているが、栄養源の枯渇（特にグルコースの枯渇）によって細胞質内で顆粒状の局在へと変わった。この局在は Stress Granule (SG) の構成因子である Pabp (Poly(A)-binding protein) と共局在することを確認した。これらの結果は、細胞が栄養源枯渇のシグナル伝達を受けると、Msa2 は活性化したフェロモン応答性 MAPK (Spk1) によってリン酸化修飾を受け、その結果 Msa2 の機能が低下し、細胞は有性生殖過程への移行を円滑に進行させることを示唆している。

次に、筆者は *sam4* 変異株の原因遺伝子の同定を行った。遺伝学的な解析から、*sam* 変異株は *sam3* および *sam9* が優性変異、それ以外は劣性変異に分かれる。解析の結果、*sam* 変異株は孢子形成昂進の性質以外に、すべての株で KCl 感受性がみられ、また一部の株には CaCl₂ 感受性も示すものがあることが分かった。さらに、*sam4* は UV 感受性も併せ持っていた。*sam4* 変異株の表現型が 14-3-3 タンパク質をコードする *rad24* 欠損と類似していたため、*sam* 変異株における Rad24 タンパク質の発現を解析したところ、*sam4* 変異株でのみ、発現していなかった。さらに、RT-PCR による *rad24* mRNA の発現解析も検出されなかった。シーケンス解析の結果、*sam4* の *rad24* 遺伝子 ORF 中の 615 番目のシトシン (C) がチミン (T) に変わっており、終止コドンに置き換わるナンセンス変異であることを確認した。*sam4* 変異株に *rad24* のプラスミドを形質転換し外部から発現させると、孢子形成、KCl 感受性、CaCl₂ 感受性、UV 感受性の表現型が抑圧された。さらに、*rad24* 遺伝子ともう一つの 14-3-3 タンパク質 *rad25* 遺伝子の高発現は、*sam4* のみならず *sam1* 変異株の孢子形成、KCl 感受性の表現型を抑圧した。これらの結果は、*sam4* の原因遺伝子が *rad24* であることを 9 つの *sam* 変異株のなかで初めて同定したものであり、また分裂酵母の有性生殖過程への移行における制御機構に 14-3-3 タンパク質が重要であることを示した。

本論文は、分裂酵母の有性生殖過程に関与する 2 つの遺伝子 (*msa2*, *sam4*) の機能解析を通して、新たな制御系の存在を提唱した優れた研究成果であり、本論文は博士 (農学) の学位論文に値すると認められる。