

論文の内容の要旨

論文題目 An RNA binding protein Nrd1 negatively controlling differentiation
in fission yeast

分裂酵母の分化を負に制御する RNA 結合蛋白質 Nrd1

氏名 塚原克平

細胞周期の G1 期は、細胞が DNA 複製を開始し分裂増殖するか、または、ある機能を果たす細胞へと分化するかを決定する重要なポイントである。近年の分子遺伝学的研究により、細胞周期の開始機構については多くの役者が同定され、その制御機構が明らかになりつつある。しかしながら分化の開始という概念に目を転じると、そこに存在する普遍的な制御機構についてはほとんどわかっていないのが現状である。私は細胞分化の開始機構を明らかにする目的で、分子遺伝学的手法が使える分裂酵母を用い、真核細胞分化のモデルと考えられている酵母の性分化に関わる新規遺伝子の同定を試みた。本論文は分裂酵母の分化を制御する新規遺伝子についての研究である。前半で、分裂酵母変異株を用いた分化制御遺伝子クローニング法と、その結果得られた RNA 結合蛋白質 Nrd1 の構造および生化学的機能を示し、後半で、*nrd1⁺* 遺伝子の生理的役割に関する遺伝学的解析結果について述べる。

分裂酵母は栄養豊富な培地中では一倍体で栄養増殖しているが、培地中の栄養源が枯渇すると、異なる性を持つ細胞同士が接合し一過的に二倍体細胞となった後、減数分裂過程を経て孢子形成を行う。この接合から孢子形成へ至る過程は、分裂酵母の性分化とよばれ、真核細胞の分化モデルと考えられている。私は分裂酵母の性分化開始に関わる遺伝子を解析することが、高等動物の

細胞分化を考える上で重要なヒントを与えるに違いないと考え、性分化開始に異常を持つ変異株を宿主とした機能相補クローニングによる新規遺伝子の単離を試みた。

私が選択した変異株は *pat1* と呼ばれる温度感受性変異株である。分裂酵母は栄養豊富な培地中で盛んに増殖している時には、プロテインキナーゼ Pat1 が減数分裂開始因子 Mei2 をリン酸化することにより不活化し、減数分裂の開始を阻止している。温度感受性 *pat1* 変異株は、制限温度下に置くことにより、一倍体にも関わらず減数分裂を開始してしまい致死となるという興味深い形質を示す。この表現型は、*mei2* 変異、もしくは *mei2⁺* の発現に必須の HMG box 型転写因子 *ste11* の機能喪失変異により完全に抑圧される。私は、このような Pat1 不活化による強制的な減数分裂開始を多コピーで抑圧する新規遺伝子として、*nrd1⁺* (Negative Regulator of Differentiation 1) を単離した。

nrd1⁺ 遺伝子は 529 アミノ酸をコードする ORF を持っていた。推定される Nrd1 蛋白質は RNP1, RNP2 という 2 つの保存されたアミノ酸配列を含む RNA 結合ドメイン(RRM)を 4 つ持つという特徴を有していた。RRM は、出芽酵母の Poly(A) binding protein、ショウジョウバエの神経分化に関わる *elav*、ヒトのスプライシング因子 U2AF などに存在することが知られており、分裂酵母においては、上述の Mei2 が 3 つの RRM を持つ RNA 結合蛋白質である。私は *nrd1⁺* の機能ドメインに関する知見を得るために deletion analysis を行い、少なくとも最初の RNA 結合ドメインが *pat1* 変異抑圧に必須であることを見出した。また、Nrd1p は MAP キナーゼによりリン酸化を受けうる 2 箇所のスレオニン残基を持っており、このコンセンサス配列中の 126 番目のスレオニン残基をアスパラギン酸に置換した変異 *nrd1* 遺伝子は、*pat1^{ts}* 抑圧に *pka1⁺* 遺伝子を必要とすることから、このスレオニン残基が Nrd1 の機能に重要であることが明らかとなった。さらに、FLAG-tagged Nrd1 を用いた免疫沈降実験により、Nrd1 蛋白質は、実際に RNA ホモポリマーである poly(U) に結合することが明らかとなった。以上のことから、*nrd1⁺* は細胞内で RNA 結合蛋白質として機能していること、また、リン酸化による制御を受けている可能性があることが示唆された。

次に、*nrd1⁺* 遺伝子の生物学的機能を知るために、*nrd1* 破壊株を作製した。*nrd1* 破壊株は、野生株と全く同じ様に増殖可能であった。私は、*nrd1⁺* 遺伝子の機能が性分化開始の制御にあると考えて、*nrd1* 破壊株が分化しやすくなっているかどうかを調べた。この結果、*nrd1* 破壊株は、培地中の栄養源を段階的に減らしていくと、野生株が分化を開始しない条件でも分化をスタートしてしまうことがわかった。すなわち、*nrd1* 破壊株は、培地中のグルコース量を 2% から 0.5%

に下げるだけで接合を開始してしまう。この時の細胞の形態を観察すると、あたかも増殖しながら、分化の窓口のみが開いているという、増殖そのものにはまったく影響がないと考えられる phenotype であった。また、グルコース枯渇のみならず、窒素源枯渇に対しても、野生株に比べて非常に接合しやすくなっていた。さらに、*nrd1⁺* 遺伝子の過剰発現により、野生株の分化開始はマイルドに阻害された。以上のことから、*nrd1⁺* 遺伝子は、培地中の栄養が豊富な状態の時に性分化を開始してしまわないように監視制御する機能を持つことが明らかとなった。また、窒素源や炭素源といった特定の栄養源シグナルを伝達するのではなく、培地中の栄養状態全体に対する反応の閾値を決める役割を担うことが考えられた。

次に、*nrd1* 破壊株がなぜ接合を開始してしまうのかを調べるために、接合に関わる遺伝子について、mRNA の発現変化を解析した。分裂酵母における性分化の開始には、分化開始のマスター転写因子である Ste11 の発現誘導と、これによって転写誘導される一群の分化関連遺伝子群が関わっている。後者は、性フェロモンがなくても十分に転写誘導されるもの(*mei2⁺*等)と、フェロモン存在下で転写が大きく誘導されるもの(*sxa2⁺*, *rep1⁺*, *fus1⁺*等)の2種類に大別される。これらの遺伝子について、*nrd1* 破壊株が接合を開始してしまう条件、すなわち、培地中のグルコース量を4分の1にしたときの転写量の違いについて、野生株と *nrd1* 破壊株を比較した。この結果、*nrd1* 破壊株では、Ste11 の下流因子の発現が脱抑制されていることが明らかとなった。この傾向は、特に *ste11⁺* と接合フェロモンの両者によって発現が誘導される遺伝子群において顕著であった。従って、*nrd1⁺* 遺伝子の機能を喪失すると、栄養が十分ある条件にも関わらず、接合関連遺伝子群が発現され、分化を開始してしまうという機序が考えられた。また、*nrd1⁺* 遺伝子の過剰発現により、*mei2⁺* の発現が抑制されることから、*pat1* 変異抑圧のメカニズムは、この *mei2⁺* 発現抑制に起因していると考えられた。以上のことから、*nrd1⁺* 遺伝子は、栄養豊富な時に、HMG-box 型転写因子 Ste11 の下流遺伝子群の遺伝子発現を抑制し、十分に栄養が枯渇するまで分裂増殖を維持する役割を担っていることが明らかとなった。

さらに、分化の開始を制御することが知られている遺伝子との関連を調べるために、二重変異株を用いた遺伝学的解析を行った。まず、グルコースおよび窒素源のシグナル伝達に関わる cAMP-Pka1 経路については、*nrd1* 破壊株の接合が cAMP により完全に阻害されることから、*nrd1⁺* の機能が cAMP の上流または別経路である可能性が考えられたが、*nrd1* による *pat1* 変異抑圧に A キナーゼ *pka1⁺* を必要としないこと、逆に *pka1⁺* による *pat1^{ts}* 変異抑圧に *nrd1⁺* を必要としないことから、両者は別経路であると結論した。次に、ストレス MAP キナーゼキナーゼである Wis1 経路との関連を調べた。*wis1* 破壊株は接合不能であるが、同時に *nrd1⁺* 遺伝子を破

壊した二重破壊株は、部分的に接合可能となった。しかしながらこの抑圧は完全ではなかったことから、別経路であることが示唆された。さらに、窒素源シグナルを特異的に伝達する *rcd1⁺* についても、*rcd1* 破壊株の接合不能が *nrd1* 破壊により弱く抑圧され、完全ではなかったことから、同一経路における上位下位の関係ではないことが明らかとなった。

以上述べてきたように、本研究により、*nrd1⁺* 遺伝子は、Ste11 によって誘導される遺伝子の発現を抑制することにより、栄養豊富なときには分化が開始しないように、その閾値を決めている機能を有することが明らかとなった。最近 *nrd1⁺* 遺伝子のヒトホモログが単離され、分裂酵母と同様に、血球細胞の分化開始を制御する因子であることが明らかとなったことから、*nrd1⁺* 遺伝子が進化的に保存された普遍的な分化制御因子であることが示唆された。このことにより、分裂酵母の性分化制御機構解明を突破口とし、高等哺乳動物細胞の分化開始機構に迫るという方法論が、細胞分化の普遍的メカニズム解明に極めて有用であることが証明された。したがって、この方法論を用いることにより、高等真核細胞の分化制御機構に中心的な役割を果たす遺伝子群が次々と同定され、複雑で難解な細胞分化の全体像が明らかになっていくものと期待される。