

[別紙 2]

審査の結果の要旨

氏名 塚原 克平

本研究は高等哺乳動物細胞の分化開始機構を明らかにするため、分裂酵母の接合を細胞分化開始のモデル系として、これに関わる新規 RNA 結合蛋白質 Nrd1 の同定と機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 分裂酵母 *pat1* 変異株の致死性を多コピーで抑圧する遺伝子をスクリーニングした結果、新規遺伝子 *nrd1*⁺の単離に成功した。*nrd1*⁺は 529 アミノ酸からなる新規蛋白質をコードし、4つの RNA 結合ドメインを持つことから RNA 結合蛋白質であると考えられた。N 末端からの deletion 解析の結果、第一番目の RNA 結合ドメインが活性に必須であることが示された。また FLAG タグを用いた免疫沈降実験により、Nrd1 蛋白質が実際に poly(U)に結合することが示された。
2. Nrd1 蛋白質は MAP キナーゼによりリン酸化されうる 2つのスレオニン残基を有する構造をしていた。変異導入解析の結果、126 番目のスレオニン残基をアスパラギン酸に置換した Nrd1 蛋白質をコードする変異 *nrd1* 遺伝子は *pkal*⁺欠損時に *pat1* 変異を抑圧できなかったことから、Nrd1 蛋白質がスレオニン残基のリン酸化により活性制御を受けうることを示された。
3. *nrd1*⁺遺伝子の生理的役割を明らかにするために、*nrd1* 破壊株を作製し、その表現型を検討したところ、栄養源枯渇に対する感受性が上昇しており、野生株が接合しない条件でも接合を開始してしまうことが示された。また、逆に *nrd1*⁺

遺伝子の過剰発現により接合が阻害されることが示された。

4. 接合に関わる遺伝子群の発現解析を行った結果、転写因子 *Ste11* によって誘導される遺伝子群、特にその発現誘導に接合フェロモンを必要とする遺伝子である *sxa2*⁺ および *repl*⁺ の発現が *nrd1* 破壊株において顕著に亢進していることが示された。また、接合フェロモンを用いた実験から、これらの発現誘導が、*nrd1* 破壊株によって亢進した接合の結果ではないことが示された。さらに、*nrd1*⁺ 遺伝子の過剰発現により *mei2*⁺ の発現が抑制されることが示された。
5. 既存の分化開始制御系との関連を明らかにするために二重変異株を用いた上位下位検定を行った。まず *pat1* 変異と *nrd1* 破壊株もしくは *pkal* 破壊株との二重変異株を作製し解析した結果、*nrd1* は *pat1* 抑圧に *pkal*⁺ を必要とせず、逆に *pkal*⁺ も *nrd1*⁺ を必要としなかったことから、*nrd1*⁺ はグルコース-cAMP-Pka1 系とは別経路であることが示された。次に *wis1* 欠損変異株の接合不能形質が *nrd1* 破壊により部分的に回復されたことから、ストレス MAP キナーゼ経路の完全な下流因子ではないことが示された。さら *rcd1* 破壊株の接合不能形質も *nrd1* 破壊により部分的に回復されたことから、窒素源シグナル系とも別経路であることが示された。

以上、本論文では新規 RNA 結合蛋白質 *Nrd1* を同定し、この因子が *Ste11* 誘導性遺伝子群の発現抑制により、細胞を取り巻く条件が整うまで分化開始を抑制するという新しい制御機構の存在を明らかにした。また、*Nrd1* には哺乳類ホモログが存在し、分裂酵母の場合と同様に動物細胞の分化制御因子であることがその後の研究により明らかとなっている。本研究はこれまで未知に等しかった、高等哺乳類細胞の分化開始制御機構解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。