

論文の要旨

氏名 椿山 諒平

論文題目 **Studies on the regulatory mechanism of cell growth and life span in budding yeast**
(出芽酵母の細胞増殖と寿命の制御機構に関する研究)

【緒言】真核生物細胞は様々な外界の変化に対応するために、それぞれの環境変化に対し、適切に応答機構を作動させる。この応答機構は多様なシグナル伝達経路を介して行われ、その制御機構は酵母などの単細胞生物からヒトを含む高等生物にまで高度に保存されている。細胞内シグナル伝達経路の研究により、免疫、発生、癌などの様々な生命現象の詳細が分子レベルで明らかにされてきた。癌を含む多くの疾患は、シグナル伝達経路における異常が原因であることが報告されており、シグナル伝達経路における知見は医薬品の発展にも貢献している。また、普遍的な生命現象である老化もシグナル伝達経路によって制御されていることが示唆されており、寿命制御のメカニズムが明らかになりつつある。しかし、シグナル伝達経路のもつ生理的な役割には不明な点が多く、多様なシグナル伝達経路間の機能的関係性もほとんど明らかになっていない。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、全ゲノム構造が解明されており、遺伝学的、分子生物学的な研究が容易であることなどから、ヒトなどの高等生物における生命現象を理解するうえで強力な解析ツールとなっている。そこで、本研究では単細胞モデル生物である出芽酵母を用いて、シグナル伝達経路の生理的役割を明らかにすることを目的とした。特に、シグナル伝達経路による細胞増殖および寿命の制御機構に焦点を当て、解析を行った。

第1章:PKAはWhi3のリン酸化により多様な生理現象を制御する(公表論文1)

我々は、ストレス応答経路であるHog1経路およびCa²⁺シグナルによる増殖制御機構の全容を明らかにするために、 $\Delta hog1$ 株が示すCa²⁺感受性を抑圧する変異株 *sgH* を多数取得し、その解析を行ってきた。遺伝的解析から、*sgH4* の原因遺伝子として、RNA結合タンパク質をコードする *WHI3* が同定された。Whi3は、細胞サイズならびに細胞周期G₁期を制御する因子として同定されており、G₁サイクリンである *CLN3* mRNA に結合することでCln3の阻害因子として機能することが明らかになっている。Cln3の阻害により、細胞サイズ、G₁/S期進行、偽菌糸形成や減数分裂といった細胞分化を制御することが報告されているが、様々なシグナル応答におけるWhi3の制御機構についてはほとんど明らかになっていない。そこで、本章ではWhi3の制御因子の同定、ならびにその機能制御を明らかにすることを目的に解析を行った。

翻訳後修飾のひとつであるリン酸化は、生体内において非常に重要な役割を果

たす。まず、Whi3 タンパクを脱リン酸化酵素で処理したところ、Whi3 はリン酸化されていることが明らかとなった。そこで、Whi3 のリン酸化に注目し、そのプロテインキナーゼを探索したところ、cAMP 依存性キナーゼである PKA が Whi3 をリン酸化することが明らかとなった。リン酸化模倣株 (Whi3-S568A)、非リン酸化模倣株 (Whi3-S568D)を用いた解析により、PKA による Whi3 の Ser-568 のリン酸化は Whi3 の機能を阻害する役割をもつことが示唆された。このリン酸化は G₁/S 期進行に必要であり、一方で細胞分化 (偽菌糸形成や胞子形成) への移行を阻害することがわかった。さらに、リン酸化模倣型 (Whi3-S568D)および高リン酸化型の Whi3 (*Δbcy1* バック)では、*CLN3* mRNA との結合が減少していることが明らかとなった。以上より、PKA は Whi3 のリン酸化によりその機能を制御し、PKA による Whi3 の制御は細胞運命の決定に重要な役割を担うことが示唆された。

第2章：出芽酵母における複製的寿命と Ca²⁺との関係 (公表論文2)

我々は、Ca²⁺シグナルが関わる生理機能を明らかにするために *Δzds1* 株が示す Ca²⁺感受性を抑圧する変異株 *scz* を取得し、原因遺伝子のひとつとして、ストレス応答や寿命制御に関与することが報告されている *SIR3* を同定した。しかしながら、Ca²⁺シグナル伝達経路と寿命制御との関係についてはほとんど知見がない。そこで、本章では Ca²⁺シグナルが関与する寿命制御機構を解明することを目的として解析を行った。

Ca²⁺シグナルと寿命との機能的関係を調べた結果、Ca²⁺の添加により野生株の複製的寿命 (RLS : Replicative Life Span)が有意に短縮することが明らかとなった。この結果から、細胞内 Ca²⁺の上昇ならびに、つづくカルシニューリン(CN : Ca²⁺/カルモジュリン依存性ホスファターゼ)の活性化によって寿命の短縮がもたらされることが示唆された。実際、細胞内 Ca²⁺レベルが上昇し、CN が活性化している *Δzds1* 株では、野生株に比べ寿命が短縮することがわかった。さらに、*Δzds1* 株の短命な表現型は CN の欠損によって抑圧されることが明らかとなった。また、CN 調節サブユニット *CNB1* の破壊株においても寿命の短縮が観察され、基礎レベルでの CN 活性が寿命の延長に重要であることが考えられた。以上の結果から、細胞内の Ca²⁺ホメオスタシスならびに Ca²⁺シグナル伝達が出芽酵母における寿命延長に重要であることが示唆された。

【総括】本研究では Ca²⁺シグナルによる生理機能の解明に全力を注いだ。第1章では、cAMP/PKA を介した Whi3 による細胞運命決定機構を明らかにし、Ca²⁺シグナル伝達経路と cAMP/PKA シグナル伝達経路との新たなクロストークが示唆された。第2章では、Ca²⁺シグナル伝達経路による寿命制御の重要性を明らかにし、Ca²⁺シグナルの新たな生理機能の発見につながった。

シグナル伝達経路と様々な疾患には密接な関係があることが報告されている。本解析の成果は、高等生物における複雑なシグナル伝達経路のネットワークの理解のみならず、疾患原因の究明、ひいては医薬品の研究開発、予防医学など多岐にわたる重要な研究分野の推進に寄与することが期待される。