

学位論文審査の結果の要旨

Summary of Doctoral Dissertation Examination

氏 名/Name	田部 卓磨
審査委員 Examining Committee	Chief Examiner 主 査 川向 誠 (印)
	Assistant Examiner 副 査 松尾 安浩 (印)
	Assistant Examiner 副 査 明石 欣也 (印)
	Assistant Examiner 副 査 阿座上弘行 (印)
	Assistant Examiner 副 査 戒能 智宏 (印)
題 目 Title	Analysis of genetic interaction between the cAMP/PKA pathway and the EB1 family protein Mal3 in <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
審査結果の要旨 (2,000字以内) /Summary of Doctoral Dissertation Examination (Within 1200 words)	
<p>単細胞のモデル生物である分裂酵母は、細胞外の環境の変化に対して素早く適応する必要があり、そのための応答経路の研究が盛んに行われてきた。主要な炭素源であるグルコースの認識は、生命維持にとって必要不可欠であり、その存在量に応じて生体内に様々な代謝変化を引き起こす。炭素源の応答は、数種類のシグナル伝達経路が関与するが、なかでもcAMP/プロテインキナーゼA(PKA)経路が主要な経路であり、酵母からヒトまで広く保存されている。</p> <p>分裂酵母におけるcAMP/PKA経路は、糖新生、有性生殖過程への移行、ストレス応答などに関与する。しかしながら、これまでの研究では、糖新生と有性生殖過程への移行以外の生体内機能はあまり明らかになっておらず、PKAの標的因子はほとんど同定されていない。一方で、PKA機能欠損株(<i>pkal</i>欠損株)は、塩化カルシウム、微小管重合阻害剤(有糸分裂期阻害剤)、DNA合成阻害剤などに感受性を示すことがわかっている。これらの事実から、PKAの下流には、明らかになっていない制御系が複数存在することが予想される。</p> <p>学位申請者は、<i>pkal</i>欠損株が示す微小管重合阻害剤感受性に着目し、この原因を明らかにするためマルチコピーサプレッサーとして単離されたEB1ファミリータンパク質Mal3に着目して、研究を推進した。Mal3は微小管結合タンパク質であり、微小管結合ドメインであるCHドメインとEB1ファミリータンパク質に高く保存されているEB1ドメインという2つのドメインから成り、形態形成や染色体分配に関与する。申請者は、Pka1とMal3の関連性の解析を切り口として、<i>pkal</i>欠損株の微小管重合阻害剤感受性の原因を解明するとともに、PKAの新たな制御系を明らかにすることを目的として研究を行った。</p> <p>初めに、<i>pkal</i>欠損株の微小管重合阻害剤に対する表現型について解析を行った。微小管重合阻害剤は有糸分裂期において作用するため、DAPI染色と染色体分配の解析を行った。その結果、微小管重合阻害剤存在下において、<i>pkal</i>欠損株は野生株と比較して、有意に染色体分配異常の頻度が増加した。また、<i>mal3</i>欠損株においても微小管重合阻害剤感受性を示すため、<i>pkal</i>欠損株との二重破壊株を作製し、スポットテストを行った。その結果、それぞれの単独破壊株よりも感受性が強くなった。このことから、<i>pkal</i>と<i>mal3</i>のそれぞれの欠損による感受性は異なる要因によって起こることが示唆された。</p>	

次に、Mal3 を 2 つのドメイン毎に断片化し、*pkal* 欠損株にそれぞれを発現させ、微小管重合阻害剤感受性の抑圧が引き起こされるかを解析し、Mal3 のそれぞれのドメインの機能を調べた。その結果、微小管結合と微小管安定化の機能をもつ CH ドメインを含む断片においてのみ、感受性を抑圧した。そこで、CH ドメインの微小管結合能に影響を与えるいくつかの変異体を解析し、この抑圧能は Mal3 の微小管結合能に依存していた。また、この機能が他の生物種で保存されているかを調べたところ、ほとんどの生物種においてこの機能が保存されていた。これらの結果から、*pkal* 欠損株の Mal3 による微小管重合阻害剤感受性の抑圧は、CH ドメインの持つ微小管安定化機能によって引き起こされていることが示唆された。

さらに、逆のアプローチとして、Pka1 が Mal3 機能に影響を与える可能性を解析した。Mal3 の過剰発現は、有糸分裂期における単極性紡錘体形成を伴う生育阻害を引き起こされる。この表現型を解析して、有糸分裂期における Mal3 機能の解明を試みた。断片化や変異体を用いた解析の結果、Mal3 による生育阻害は CH ドメインの微小管結合能と EB1 ドメインの両方が存在することで引き起こされていた。また、この単極性紡錘体形成は、*pkal* 欠損株で抑圧されていた。グルコースを制限することは Pka1 経路の機能低下を引き起こす。そのため、グルコース制限下でも解析したところ、*pkal* 欠損株と同様に表現型を抑圧していた。Mal3 高発現によって起こる表現型は *cut7-446* 変異体でも見られるため、同様の解析を行ったところ、*pkal* 欠損株とグルコース制限下で抑圧された。これらのことから、*pkal* 欠損株およびグルコース制限は、Mal3 もしくは微小管制御を介して、有糸分裂期進行を制御していることが示唆された。

上記の異なるアプローチの研究結果は、どちらも有糸分裂期において Pka1 が微小管もしくは Mal3 機能を制御していることを示しており、*pkal* 欠損株の微小管重合阻害剤に対する脆弱性の要因もこれによるものであることが考えられる。

これらの発見は、細胞外グルコース量の変動が、cAMP/PKA 経路を介して、微小管結合タンパク質 Mal3 と共に微小管機能に影響を与えるという新たな知見を示すものであることから、本論文は博士（農学）の学位論文に値すると認められる。