

論文審査の結果の要旨

氏名 久保田 浩行

本論文は、マウスのインプリント遺伝子 Impact の機能解析の一貫として行われた出芽酵母ホモログ YIH1 (Yeast Impact Homologue 1)の機能解析に始まり、その過程で見い出された新規 GI ドメインの媒介する出芽酵母のアミノ酸飢餓応答 (GC システム) の制御機構の解析について述べられている。

YIH1 の機能解析の一環として YIH1 と相互作用する蛋白質を探索する目的でこれを bait とした 2 ハイブリッドスクリーニングを行い、YIH1 が出芽酵母における GC システムの中心的役割を果たす GCN1 と相互作用することを見い出した。そして、YIH1 の GCN1 との相互作用領域は原核細胞にまで高度に保存された C 末端領域ではなく、真核生物にのみ保存されている N 末端領域であることを明らかにした。次にこの領域に対するホモロジー検索の結果、この領域は Impact のみならず各種由来の GCN2 を含む様々なタンパク質と 3 種類のモチーフ様配列を共有していることを発見し、この構造を GCN2 と Impact 中に見い出されたとして GI ドメインと名付けた。

YIH1 と GCN1 の相互作用を司る GI ドメインが、GCN2 上にも存在するという知見は、GCN2 も同じく GI ドメインを介して GCN1 と直接相互作用する可能性を示唆する。これらの示唆から本論文は、酵母 2 ハイブリッドシステムと組み換え蛋白質を用いた *in vitro* 結合実験で GCN1 と GCN2 の相互作用に検討を加え、GCN2 の N 末端に位置する GI ドメイン (a.a. 1-125) が GCN1 の C 末端領域 (a.a. 2048-2382) に直接結合することを明らかにした。更にこの相互作用での GI ドメインの役割を検討する為、このドメイン中で高度に保存されているアミノ酸を置換した変異体 GCN2 を作製 GCN1 との結合能を同様の手法で検討したところ、いずれの変異蛋白質も GCN1 との結合能を欠くことが示された。同様なアミノ酸置換を持った YIH1 も GCN1 との結合能を失っていた。以上の結果は、GI ドメインが GCN1 との結合を媒介する必須最少要素であることを示している。更に本論文は、GCN1 の GCN2 結合能を障害する変異を 2 ハイブリッド法を応用した方法でスクリーニングし、3 つの変異体 GCN1 を得ている。

次にこの GI ドメインを介した GCN1-GCN2 相互作用の生物学的役割を検討するために、上記の実験で得られた相互作用を障害する GCN2-Y74A, GCN1-

F2291L 変異を酵母細胞内に導入した *gcn2-Y74A* 株ならびに *gcn1-F2291L* 株を作成した。これらの変異体は GCN2 の活性化そして GC システム作動の障害が予想される為、GC システム障害の指標として用いられる 3AT 感受性を検討した。その結果変異株は高感受性を示し、これらの株において GC システムが障害されていることを明らかにした。更にアミノ酸合成系遺伝子の発現を司る転写因子 GCN4 の翻訳脱抑制がこれらの変異株において作動しているか確認する為、この mRNA の 5'-UTR に *lacZ* を接続した翻訳レポーター遺伝子を用いて検討したところ、変異株では翻訳脱抑制が障害されていることが確認された。最近 GCN2 の活性化を介さずに GCN4 の翻訳を脱抑制する経路の存在が示されたので、最後に eIF2 α キナーゼである GCN2 の活性化をリン酸化 eIF2 α 特異的抗体を用いて検討した。その結果これらの変異体では eIF2 α のリン酸化が障害されていることが判明し、これにより酵母細胞唯一の eIF2 α キナーゼである GCN2 の活性化が障害されていることを明らかにした。以上の結果は、GI ドメインを介した GCN1 との結合が GCN2 の *in vivo* における活性化に必須であることを示している。

最後に、GC システムにおける YIH1 の生物学的意義を YIH1 の過剰発現により検討し、その結果全長または GI ドメインを含む N 末端領域では酵母細胞は 3AT 感受性を示したが、これを含まない C 末端の過剰発現では感受性を示さない事を明らかにしている。この結果は GCN1-GCN2 相互作用の重要性を支持するのみならず、YIH1 自身が GC システムの負の調節因子として機能し得る可能性も示唆している。

以上、本論文は出芽酵母の GC システムにおける、GI ドメインが媒介する GCN2 の GCN1 への結合が GCN2 の活性化ならびに GC システムの作動に必須である事を明らかにした。本論文はこれまで明らかにされていなかった GCN1 による GCN2 の活性化機構に重要な貢献をもたらすだけでなく、YIH1 によるこのシステムの負の制御機構の存在を提示し、更に新規タンパク質相互作用モジュール GI ドメインの発見はシグナル伝達研究全般への貢献をもたらすものと思われる。なお、本論文第 2 章は、伊藤 隆司・榊 佳之との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。