

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 二 井 勇 人

カルパインは、哺乳類細胞に普遍的に存在するカルシウム依存性システインプロテアーゼで、タンパク質を限定分解し機能修飾するモジュレーター・プロテアーゼであると考えられているが、その生理機能はこれまで明確になっていない。本論文は、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のカルパイン様プロテアーゼ Cpl1p と Znフィンガー型転写因子 Rim101p からなるシグナル伝達経路 (*CPL1-RIM101* 経路) の生理機能に関する解析を行った成果をまとめたものである。

第1章では、研究の背景としてこれまでに明らかになっている *CPL1-RIM101* 経路の概要について述べている。すなわち、Rim101p がアルカリ環境に応答して Cpl1 依存的にプロセッシングを受け活性化され、アルカリ適応反応を引き起こすというものである。

第2章では、はじめに、糸状菌 *Aspergillus nidulans* の相同経路に関する知見をもとに、*CPL1-RIM101* 経路の新規な構成因子の同定について述べている。アルカリ環境への感受性、Rim101p のプロセッシング不能、活性化型変異 *RIM101<sup>N531\*</sup>* (C末端を欠損したプロセス型変異体) によるアルカリ感受性の抑圧の3つを指標に、Rim8p (YGR045-046w)、Rim9p、Rim20p (YOR275c)、Rim30p (YNL294c) が *CPL1-RIM101* 経路の構成因子であることを示した。さらに、酵母 two-hybrid 法により Rim101p と Rim20p の相互作用を見出し、さらにこの相互作用がプロセッシングに直接的な役割を果たすことを示唆する結果を示している。

次に *CPL1-RIM101* 経路により転写を制御されるターゲット遺伝子のスクリーニングを行っている。ゲノムDNAへの *lacZ* 挿入ライブラリーを用い、活性化型変異体 Rim101<sup>N531\*</sup>p により誘導される遺伝子を検索した結果、*ENA1* (Na<sup>+</sup>などの排出を行う P-type ATPase)、*STV1* (液胞型 H<sup>+</sup>-ATPase 100k サブユニット)、*PHO8* (液胞アルカリホスファターゼ) など、細胞内イオン環境の調節もしくは外部イオン環境への応答に関わる遺伝子群を見出した。塩ストレス応答に重要な *ENA1* などがターゲット遺伝子に含まれることから、*cpl1*、*rim101* 遺伝子破壊株の表現型を再検討し、Na<sup>+</sup> や Li<sup>+</sup> などの1価の陽イオンストレスに対して感受性を示す事を明らかにした。これにより *CPL1-RIM101* 経路が塩ストレス適応時にも機能する事が明らかになった。

第3章では、カルシニューリン経路と *CPL1-RIM101* 経路との関連を解析している。酵母の塩ストレス応答にカルシニューリン (カルシウム・カルモジュリン依存性プロテインホスファターゼ) を介した

経路が重要な働きをしていることが知られている。塩ストレス下でのRim101pの活性化状態をウェスタンブロッティングにより検討し、プロセシングに加えて脱リン酸化を検出した。この脱リン酸化はカルシニューリン破壊株では見られず、さらに *in vitro* でカルシニューリンがRim101pを脱リン酸化することを示し、この脱リン酸化がカルシニューリンによるものであることを明らかにした。また、活性化型カルシニューリン変異体を用いた解析から、この脱リン酸化は単独でRim101pの活性化を引き起こすことを示した。これらの結果から、プロセシングと脱リン酸化は独立して起こり、別々にRim101pを活性化するという結論を得ている。さらに、GFP融合タンパク質を用いた解析から、プロセシングがRim101pの核への移行を引き起こす事を示した。

第4章では、哺乳類における *CPL1-RIM101* 相同経路の解明に向けたCpl1pの哺乳類ホモログ分子の同定について述べている。ESTデータベースから見出した部分配列からホモログ分子の全長cDNAをクローニングし、PalBH (PalB homologue) と命名した。PalBH mRNAは組織普遍的に発現しており、PalBHが細胞における基本的かつ必須の機能に関与することが示唆された。また、COS細胞に発現したPalBHが核に局在することから、核における機能を持つことが示唆された。

以上、本論文は、酵母のストレス応答経路である *CPL1-RIM101* 経路の構成因子、標的遺伝子の同定を通じて、本経路の塩ストレス応答における重要性、さらにはカルシニューリン経路とのクロストークを明らかにし、加えて哺乳類PalBHを同定することでその成果を哺乳類にまで展開する道を開いたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値のあるものと認めた。