

論文の内容の要旨

論文題目 分裂酵母の栄養源飢餓に応答する転写因子の解析

氏名 樋口 徹

個々の細胞は、細胞外界の環境に適切に応答している。特に多細胞生物では、ホルモン・神経伝達物質・成長因子など、体内の他の細胞から発せられる細胞外の情報に対し、個々の細胞が適切に応答することにより、個体の発生や、神経伝達、恒常性などが制御されている。これまでに、細胞外からの情報が、受け取った細胞の中でどのように変換され、応答するかという情報伝達機構の解析が進んできた。そして、様々な環境応答について調べられた結果、細胞内ではいくつかの共通の情報伝達系を介して、遺伝子発現や生理活性が制御されていることがわかった。このような共通の情報伝達系の一つに、cAMP-cAMP 依存性キナーゼ(PKA)によるものがある。この情報伝達系は、肝細胞では糖代謝を制御したり、免疫細胞ではサイトカインの発現を調節したり、感覚細胞では感覚情報を送るなど、様々な細胞応答に用いられている。私はより単純な細胞を用いて研究することにより、この cAMP-PKA による制御機構を分子レベルで詳細に明らかにしたいと考えた。

遺伝学的・生化学的に解析が容易で、真核細胞のモデルとされる出芽酵母および分裂酵母細胞では、培地中の栄養源、とくにグルコースを主体とする炭素源の状態が、細胞内の cAMP の濃度に反映され、ひいては cAMP 依存性キナーゼ(PKA)の活性を規定する。分裂酵母においては、飢餓条件において誘導される有性生殖と糖新生は、栄養の豊富な条件で

は PKA の活性を介して抑制されている。有性生殖はそのマスター転写因子をコードする *stell* 遺伝子が発現することによって開始され、糖新生は *fbp1* にコードされるフルクトース・ビスフォスファターゼの発現が反応を律速する。*stell* および *fbp1* は、転写レベルにおいて PKA により抑制される。反対に、PKA が欠損した変異株では *stell*、*fbp1* の転写は脱抑制される。そこで、栄養源の情報や PKA によって、*stell*、*fbp1* がどのような機構で転写抑制されているかについて解析した。

PKA が恒常的に活性化している変異株は、有性生殖不能の表現型を示す。この表現型を過剰発現により抑圧して有性生殖を可能にする遺伝子として、 C_2H_2 型 Zn-finger 転写因子をコードする *rst2* 遺伝子が得られた。この遺伝子の破壊株は有性生殖不能の表現型を示し、*stell* の転写誘導に欠損を示した。また *rst2* 破壊株では、非発酵性のグリセロールを炭素源とする培地において、増殖能に欠損があり、*fbp1* の転写誘導が欠損していた。つまり、*rst2* は *stell*、*fbp1* の転写を活性化させる因子であることがわかった。また、PKA と *rst2* の両方を欠失させた株では、*stell* も *fbp1* も脱抑制されなくなった。したがって、*rst2* は PKA によって負に制御されている可能性が高いことがわかった。

stell と *fbp1* の転写調節領域には、Rst2p が結合する 6 塩基対の配列が見つかった。STREP と名付けられたこの配列は、独立な研究から *stell*、*fbp1* の転写誘導に必須な配列であることが示されていた。そこで、STREP 配列を転写調節領域に組み込んだレポータ遺伝子の転写活性を調べたところ、*fbp1* 遺伝子の転写と同様に、高グルコース培地で抑制され、グリセロール培地で誘導され、*rst2* 破壊株では活性がなかった。したがって、STREP に依存したレポータは、Rst2p の活性を反映していることがわかった。さらに、このレポータの活性は、PKA が活性化している株では抑制され、PKA の欠損株では脱抑制された。したがって、Rst2p が PKA に活性を負に調節されていることがより確実となった。つまり、Rst2p は、飢餓条件で STREP 配列を介して *stell*、*fbp1* を転写誘導し、栄養の豊富な条件下では PKA を介して抑制されていると考えられた。

PKA の活性を変化させる炭素源によって、*rst2* 遺伝子の機能発現の中でどの段階で制御されるのかを検討した。*rst2* の転写量は培地の炭素源条件を変えてもほとんど変化がなく、転写後における制御を受けていることが予想された。ウェスタン解析において Rst2p タンパクを検出すると、SDS-PAGE における泳動度が炭素源によって変化していることがわかった。フォスファターゼ処理の実験から、泳動度の変化はリン酸化によることが判明した。そして、Rst2p は、高グルコースの培地では低レベルの、グリセロール培地では高レベル

のリン酸化を受けていることがわかった。したがって、*rst2* はその産物のリン酸化レベルが炭素源によって制御されると考えられた。

炭素源によるリン酸化レベルの制御に、PKA が関わっているかどうかを検討した。Rst2p には PKA によるリン酸化のコンセンサス配列が存在していたので、直接のリン酸化による制御が予想された。Rst2p は *in vitro* で PKA によりリン酸化され、その部位は DNA 結合領域の近傍と、タンパクの中央領域との二つの箇所であることがわかった。

Rst2p は *in vivo* において PKA にリン酸化されているかを検証した。PKA は高グルコース条件で活性化するので、高グルコース条件で検出された低レベルのリン酸化が PKA によっている可能性が考えられた。しかし、*in vitro* でリン酸化された部位に変異を導入した Rst2-M3p でも、この低レベルのリン酸化は検出された。したがって、野生株で高グルコース条件で観察された Rst2p の低レベルのリン酸化は、PKA からのリン酸化を反映するものではなく、電気泳動による移動度の違いで PKA によるリン酸化を検出することには成功しなかった。

一方、グリセロール培地で観察された高リン酸化型 Rst2p は、PKA の欠失株や、PKA によるリン酸化部位に変異がある Rst2-M3p を発現する株では高グルコース培地においても観察された。反対に、PKA が恒常的に活性化している細胞では、野生型 Rst2p はグリセロール条においても高リン酸化に至らないが、Rst2-M3p を発現すると、リン酸化状態は、低レベルのリン酸化型のものから、高リン酸化型のものまで観察された。これらのことから、飢餓条件において見られる Rst2p の高リン酸化は、PKA による直接のリン酸化と間接的な関与の両方で抑制されることが示唆された。

野生型の Rst2p は、発現量を低レベルに抑えた場合、PKA が活性化した株の有性生殖不能の表現型を抑圧することはできない。しかし、PKA からのリン酸化を受けない Rst2-M3p を PKA の活性が高い株に同じレベルで発現したところ、有性生殖不能を抑圧でき、*ste11* の転写を回復した。したがって、Rst2p の PKA によるリン酸化は、*in vivo* において Rst2p の活性を抑制する上で重要であることがわかった。

転写因子である Rst2p の炭素源や PKA による機能抑制が、その細胞内局在を介しているかどうかを検討するため、蛍光タンパクや、抗原エピトープを付加した Rst2p を細胞内に発現させて、蛍光観察や抗体染色により Rst2p の局在を調べた。Rst2p の存在を示すシグナルは、高グルコースの条件では細胞質全体に拡散し、グリセロール培地に移すと核に集中した。細胞をグリセロール培地でしばらく培養した後、培地にグルコースを添加すると、

Rst2p のシグナルは速やかに核外に排出された。したがって、グルコースは Rst2p の核局在を、阻害することがわかった。

高濃度のグルコースによる Rst2p の核局在の阻害が、PKA を介しているかを検討した。Rst2p は、PKA の活性が高い変異株では細胞質に拡散し、PKA の活性がない変異株では核に強く濃縮した。つまり、Rst2p の核局在を PKA が阻害していることがわかった。また、PKA からのリン酸化を受けない Rst2-M3p の局在を観察すると、高グルコース条件において野生株でも、PKA の活性が高い変異株においても、通常の Rst2p に比べ有意に核内に局在していた。したがって、Rst2p の核局在の抑制には PKA によるリン酸化が関わっていることが強く示唆された。

以上のことから、Rst2p は、分裂酵母において有性生殖・糖新生という栄養源飢餓応答に必須な転写因子として機能し、PKA による直接のリン酸化によって、高リン酸化状態へ移行と、核局在が抑制を受けることで栄養源に応答した遺伝子発現を行っていることが示された。