

# 論文審査の結果の要旨

氏名 樋口 徹

真核細胞のモデル材料として研究が進んでいる分裂酵母では、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 の濃度を規定し、ひいては cAMP 依存性プロテインキナーゼ(PKA)の活性を規定している。飢餓が引き金となって誘導される有性生殖と糖新生という二つの事象は、栄養の豊富な条件下では高い PKA 活性により抑制されている。PKA は、有性生殖に関係する多くの遺伝子のマスター転写因子の遺伝子 *ste11* と、糖新生の律速反応を触媒するフルクトース・ビスフォスファターゼの遺伝子 *fbp1* を、ともに転写レベルにおいて抑制する。PKA が欠損した変異株では *ste11* と *fbp1* の転写は恒常的になる。学位申請者樋口徹は、栄養源の情報や PKA の活性によって、*ste11* および *fbp1* 遺伝子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、その結果を本論文にまとめた。

申請者の所属する研究室において、PKA が構成的に活性化して有性生殖不能となった突然変異株を、過剰発現により抑圧して有性生殖可能にさせる遺伝子 *rst2* が得られていた。その産物 Rst2p は C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> 型 Zn-finger 転写因子で、*ste11* 遺伝子の転写誘導に必須であることも知られていた。申請者は本研究でまず、*fbp1* 遺伝子の転写誘導がやはり Rst2p に依存することを示した。PKA 欠損株でみられる *ste11* と *fbp1* の恒常的転写は、Rst2p を欠損させると消失し、Rst2p が PKA によって負に制御される転写因子である可能性が高いことがわかった。

申請者は *ste11* と *fbp1* の転写調節領域を比較検討し、両者に共通する 6 塩基の配列 (STREP と命名) をみつけ、その配列が Rst2p との結合に必須であることを証明した。STREP 配列を転写調節領域に組み込んだレポータ遺伝子を作製して分裂酵母内での発現を検討したところ、その転写活性は Rst2p に依存し、培地に高濃度のグルコースを加えたり、細胞内 PKA 活性を高めると抑制された。すなわちこの単純なシステムにより、Rst2p が飢餓条件では STREP 配列を介して *ste11* や *fbp1* を転写誘導し、栄養の豊富な条件下では PKA によってその活性が抑制されていることが確かめられた。

*rst2* 遺伝子の転写は、培地条件や PKA の活性変化によりほとんど影響を受けなかった。しかしその産物である Rst2p は、条件に応じて修飾状態が変化することがわかつ

た。Rst2p は、PKA によるリン酸化のコンセンサス配列を N 端に近い DNA 結合領域の近傍と中央領域との二箇所にもっていた。in vitro の実験で、Rst2p が PKA によりリン酸化され、リン酸化の部位はこの二箇所であることが確認された。PKA が活性化した株に、これらの部位に変異をもつため PKA によるリン酸化を受けない変異型 Rst2p を発現させたところ、ste11 の転写が回復し、有性生殖不能が抑圧された。したがって、Rst2p が PKA によって直接リン酸化されると、in vivo における Rst2p の活性が抑制されることがわかった。

培地条件や PKA が与える Rst2p の挙動の変化を調べた。Rst2p は、活性化を受けるグリセロール培地では、リン酸化を受けて電気泳動での移動度が明らかに小さくなっていた（高シフト型リン酸化）。この高シフト型リン酸化が起こるためには、PKA の活性低下に加えて、グルコース飢餓が PKA を介さない形でも関係していることもわかった。Rst2p の細胞内局在を調べたところ、Rst2p 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。また、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された。PKA によるリン酸化を受けない変異型 Rst2p は、高グルコース条件でも、PKA の活性が高い変異株においても、通常の Rst2p に比べ有意に高い核局在を示した。したがって、PKA によるリン酸化は Rst2p の核局在を阻害することが強く示唆された。

以上、樋口徹は栄養源の情報伝達に関わる分裂酵母の転写制御因子 Rst2p の活性制御機構を解析し、Rst2p が有性生殖および糖新生という二種類の栄養源飢餓応答反応に共通の転写因子として機能すること、6 塩基配列からなる STREP がその結合部位であること、Rst2p は PKA による直接のリン酸化を受けて活性を抑制されること、PKA によるリン酸化がない場合に他のプロテインキナーゼによって高シフト型のリン酸化を受けると、そして PKA によるリン酸化が Rst2p の核局在を抑制することを示した。これらの成果は、細胞がどのように栄養源に応答するかという分子機構、ならび cAMP-PKA が関与する情報伝達機構に重要な新知見をつけ加えるものであり、学位申請者の業績は博士（理学）の称号を受けるにふさわしいと審査員全員が判定した。なお本論文は渡辺嘉典、山本正幸との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析およ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、樋口徹に博士（理学）の学位を授与できると認める。