

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 梅田 達也

免疫抑制剤ラパマイシンの標的分子として同定された TOR は、翻訳制御をはじめとする飢餓応答反応への関与が強く示唆されているプロテインキナーゼである。しかし、環境の栄養状態によって TOR 自身の活性と機能がどのように制御されているかについては、これまで全く明らかにされていない。真核微生物である酵母にも TOR の相同蛋白質 Tor1p/Tor2p が存在し、哺乳類の TOR と同様な働きをしていることが示されている。本研究は、遺伝学的解析の容易な酵母をモデル系として、TOR の活性制御機構の解析を行ったもので、5章と総括より構成されている。

第 1 章では、序論として本研究の背景を述べ、この分野での位置づけを明らかにしている。

第 2 章では、栄養源の欠乏によっても不活性化されない恒常的活性化型 *TOR2* の単離の試みについて述べている。求める変異は得られなかったものの、ラパマイシンとの結合に必要なドメインとは異なった場所に変異を持ちながらラパマイシンに対して非感受性を示す、新しい変異型 *TOR2* を単離し、その非感受性獲得機構について論じている。

第 3 章では、TOR の標的因子である Tap42p に注目し、ラパマイシン非感受性型 *TAP42* の単離と解析について述べている。スクリーニングにより、高発現したときに限りラパマイシンに対する非感受性を付与する 18 種の変異を得ている。これらの変異は全て C 末端領域に欠失、もしくは点変異を持つという共通の特徴を有することより、この領域が TOR 経路による活性制御に重要な役割を担っていることが示唆された。また、これらのラパマイシン非感受性型 *TAP42* は、*tap42* 破壊株の致死性を相補することができなかった。このことから、変異型 *TAP42* の高発現によるラパマイシン非感受性は、ラパマイシンの存在下において Tap42p の活性を抑制する機構から、内在性の Tap42p を解放することによるというモデルを提案している。

第 4 章では、ラパマイシン非感受性型 *TAP42* を用いて TOR の上流因子のスクリーニングを行っている。ラパマイシン非感受性型 *TAP42* プラスミドを形質転換した株から、このプラスミドを失っては生育できなくなるような変異株を 18 株得ている。相補性試験などの結果から、これらの変異は全て劣性であること、相補性群は 5 以上あることなどを明らかにした。次に、得られた変異を相補する遺伝子のクローニングを試み、*LST8*、*DBF2*、および *TRS31* を同定した。Lst8p は WD-repeat からなる蛋白質で、アミノ酸トランスポーター Gap1p の栄養状態に応じたターゲティングに異常をきたす変異として同定されており、遺伝子破壊株は致死であることが知られている。また Dbf2p は細胞

周期の核分裂後期(anaphase/telophase)で働く Ser/Thr キナーゼであり、その破壊株は致死ではないと報告されている。さらに Trs31p は、ER から Golgi、および Golgi 間の小胞輸送における輸送複合体の構成因子で、その破壊株は致死であることが知られている。同定された3つの遺伝子のうち、*LST8* 遺伝子の産物に栄養因子情報伝達への関与が強く示唆される。

第5章では、TOR 経路活性化における Lst8p の機能の解明を行っている。*lst8* 破壊株を作製し解析したところ、ラパマイシン非感受性型 *TAP42* を高発現した場合に限り、この遺伝子破壊株の致死性が抑圧されることが判明した。このことは、Lst8p の欠損による増殖阻害が、Tap42p の活性化により回復することを示している。このことから、Lst8p が Tap42p の上流、おそらく TOR よりも上流で機能していることが示唆される。次に、温度感受性 *lst8* 変異株の単離を試み、19 株を得ている。得られた温度感受性 *lst8* 株を制限温度下に移し、Lst8p の機能が欠損した場合に TOR 経路の活性化状態に及ぼす影響を検討している。具体的には、TOR 経路に応答して量と活性が制御されているアミノ酸トランスポーター Gap1p、またリン酸化状態が制御されているオートファジー制御因子 Apg13p に及ぼす効果を指標に用いている。Gap1p は TOR の活性化状態では分解されて量が減少するが、栄養飢餓やラパマイシン処理により TOR が不活性化されると増加することが報告されている。温度感受性 *lst8* 株は、非制限温度下においても、また制限温度下においても Gap1p の量が増加していた。Apg13p は TOR が活性化状態にあるとリン酸化されているが、TOR が不活性化状態にあるとリン酸化レベルが低下するとされている。温度感受性 *lst8* 株は、制限温度下で若干の脱リン酸化が検出された。また、ラパマイシンの添加により Apg13p の量に大幅な減少が観察された。Gap1p、Apg13p いずれも、*lst8* 株において TOR 経路の活性状態が低下していると考えられる挙動を示したが、制限温度下に移したことによる劇的な変化を観察することはできなかった。Lst8p による TOR 経路への影響は複雑な機構によるものであると考えられる。

総括では、本研究の結果を要約して、成果を哺乳類を含む相同経路の解析へ展開する可能性について論じている。

以上、本論文は、TOR 経路の情報伝達因子の恒常的活性化型変異を単離し、これを用いてこれまで未知であった TOR の活性制御機構について解析したもので、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。