

論文の内容の要旨

論文題名： 分裂酵母の有性生殖およびストレス下での生育に必要な
Tor1-Gad8 キナーゼカスケードの解析

氏名： 松尾 朋彦

フォスフォイノシチドキナーゼ様のキナーゼである TOR (target of rapamycin)タンパク質は、酵母から線虫、ハエ、植物、ヒトまで幅広く保存されており、主に栄養源の有無に関わる情報伝達を制御していると考えられている。TOR についてはこれまで、主に出芽酵母や哺乳類培養細胞を用いての解析が行われてきたが、TOR が関わる情報伝達経路の詳細はよく分かっていない。本研究では分裂酵母を用い、TOR タンパク質をコードする *tor1* およびその下流で機能する因子 *gad8* の機能と情報伝達機構における役割について解析を行った。

分裂酵母は、栄養源が豊富な培地では分裂を繰り返し増殖するが、窒素源枯渇などの条件下に移すと、まず細胞周期を G1 期において停止し、接合、減数分裂、胞子形成を行う有性生殖過程へと入る。この過程に関わる機構を探るため、まず、当研究室で先に単離された、窒素源が枯渇しても G1 期停止を行えず、有性生殖不能の変異株 *gad2-1* を解析したところ、この変異は *tor1* の新規アリルであることが分かった。*tor1* は、分裂酵母の TOR オーソログの一つをコードし、有性生殖過程だけではなく、ストレス存在下での生育においても必須な機能を持つことが報告されている。しかし、*tor1* と同一経路で機能する因子についてはこれまで報告がない。そこで、*gad2-1* 変異株の有性生殖不能を多コピーで抑圧する因子のスクリーニングを行い、単離された新規遺伝子 *gad8* が *tor1* 経路上で機能している可能性について解析を行った。

gad8 は AGC (protein kinase A, G and C) ファミリーに属する Ser/Thr キナーゼをコードしていた。*gad8* を破壊しその表現型を観察したところ、*tor1* 破壊株と同様に、有性生殖不能や高温、高浸透圧感受性の表現型を示し、*gad8* が *tor1* と同一経路で機能していることが示唆された (図 1A)。*tor1 gad8* の二重破壊

株も同様の表現型を示し、これを支持した。また、*gad8* の高発現が、*tor1* 破壊株のストレス存在下での生育不能を抑圧できたのに対し、*tor1* の高発現は *gad8* 破壊株の表現型を抑圧できず、*gad8* は *tor1* の下流で機能する因子であると考えられた。そこで、Gad8p のキナーゼ活性を *tor1* 破壊株において測定したところ、野生型における活性と比べ、著しく低下していることが分かった (図 1B)。また、野生型株における Gad8p では、SDS-PAGE で電気泳動度の遅いバンドが観察されるが、このバンドは *tor1* 破壊株や、フォスファターゼ処理した cell extract では見られなかった。このことから、*tor1* は Gad8p のリン酸化修飾を通じて、活性を制御していると思われた。Gad8p をフォスファターゼ処理すると、キナーゼ活性が低下したことから、Gad8p の活性制御においてリン酸化修飾が重要な役割を果たしていることが確かめられた。

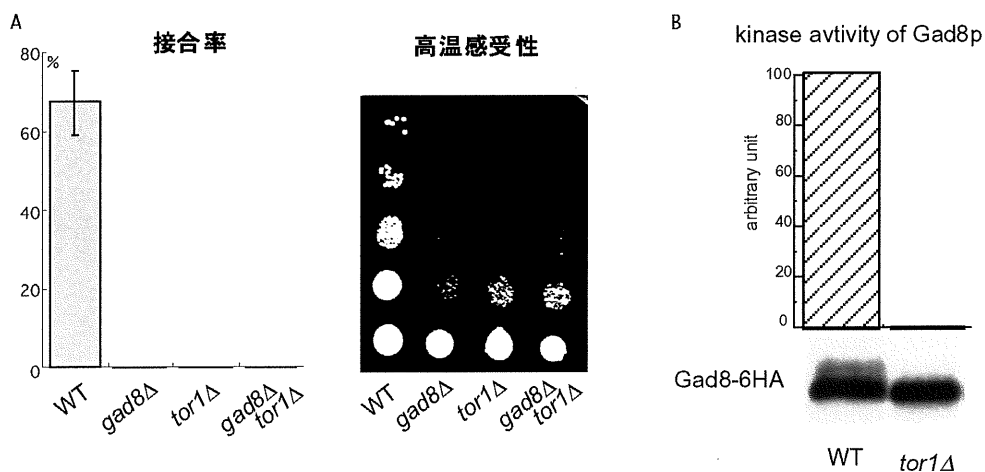


図 1 *gad8* は *tor1* と同一経路の下流で機能している因子である。A *gad8* 破壊株、*tor1* 破壊株、および *gad8 tor1* 二重破壊株の有性生殖不能と高温(36°C)感受性の表現型。3破壊株とも同様の表現型を示した。B Gad8p を野生株および *tor1* 破壊株から精製し、ペプチド crosside を基質としてキナーゼ活性を測定した。下段は Western Blotting により検出した Gad8p。

そこで次に、Gad8p のどの部位のリン酸化がキナーゼ活性に必要なかを調べた。AGC ファミリーに属する多くのキナーゼの活性は、主に二カ所のリン酸化によって制御されていることが知られている。一つは触媒領域内にある activation-loop であり、もう一つは触媒領域より C 末側に位置する、hydrophobic motif と呼ばれる領域内のリン酸化である。*gad8* においても、これらリン酸化部位周辺の配列は保存されていたため、予想リン酸化部位である activation-loop 内の T389、および hydrophobic motif 内の S546 をそれぞれアラニンに置換し、その機能を見た。*gad8* 破壊株にこれら変異型 *gad8* を発現させると、*gad8*T387A 変異型はキナーゼ失活型の *gad8* 同様、有性生殖不能、高温、高浸透圧感受性の表現型を全く抑圧できず、ほとんど機能を持たないことがわかった。*gad8*S546A 変異型も有性生殖不能や、弱い高浸透圧感受性を示したが、こちらの場合は高温感受性は示さず、部分的に機能を失った変異型であると思われた。変異型 Gad8p のキナーゼ活性を測定したところ、*gad8* 破壊株への抑圧能の実験と相関する結果が得られた。すなわち、Gad8T387Ap はキナーゼ失活型の Gad8p 同様ほとんど活性を示さず、Gad8S546Ap はわずかの活性を保って

いたが、野生型 Gad8p よりは明らかに活性が低かった。以上のことから、Gad8p においても、AGC ファミリーキナーゼに保存された activation-loop および hydrophobic motif のリン酸化が、機能や活性に重要であることが示唆された。

変異型 Gad8p の電気泳動度をみたところ、Gad8T387Ap は野生型とほぼ同様の泳動パターンであったのに対し、Gad8S546Ap では、リン酸化修飾による移動度の遅いバンドが観察されなかった。*tor1* 破壊株においても、移動度の遅いバンドが見られなかったことを考えると、*tor1* は S546 のリン酸化を制御している可能性が考えられた。そこでリン酸化型を模倣するために、S546 をアスパラギン酸に置換した *gad8S546D* 変異型を作成し、*tor1* 破壊株に高発現した。この結果、*gad8S546D* は野生型 *gad8* に比べ、有性生殖不能、高温、高浸透圧感受性のいずれにおいても、*tor1* 破壊株の表現型をより強く抑圧できた。このことは、*tor1* が S546 のリン酸化を通じて、Gad8p を活性化していることを示唆している。しかし、*gad8S546A* 変異型は活性を完全に失っておらず、*tor1* 破壊株や *gad8* 破壊株よりも弱い表現型を示したことから、*tor1* は S546 以外を介しても Gad8p の活性を制御していると思われる。Gad8p の活性が、Tor1p により直接制御されているのかを調べるために、*in vitro* のリン酸化測定を行った。この結果、酵母細胞から精製した Tor1p は、野生型の Gad8p をリン酸化したが、Gad8S546Ap 変異型に対するリン酸化も観察された。このことから、Tor1p は Gad8p を直接リン酸化している可能性が高いと思われたが、S546 が直接のリン酸化部位であるという証拠は得られず、S546 以外にもリン酸化部位があると疑われた。現在のところ、この部位については不明である。

Gad8p の T387 のリン酸化制御についても解析を行った。多くの AGC ファミリーキナーゼの activation-loop は、PDK1 様キナーゼによって直接リン酸化されることが知られている。分裂酵母の PDK1 様キナーゼをコードする *ksg1* は、増殖や有性生殖に必要な遺伝子であることが報告されている。*ksg1* が T387 のリン酸化、活性化に関わっているのかを調べた。*ksg1* 破壊株は致死なので、まず、温度感受性の *ksg1-208* 変異株における Gad8p のキナーゼ活性を測定した。*ksg1-208* 変異株は増殖可能な非制限温度においても、有性生殖不能の表現型を示す。Gad8p のキナーゼ活性は、*ksg1-208* 変異株において、非制限温度、制限温度に関わらず低下していた。また、*ksg1-208* 変異株の示す、有性生殖不能、高温感受性の表現型は、*gad8* を高発現することにより抑圧された。このことは *in vivo* において、*gad8* が *ksg1* の下流で機能していることを示唆している。大腸菌から精製した Ksg1p と Gad8p を用いて、*in vitro* のリン酸化測定を行ったところ、野生型の Gad8p は Ksg1p によってリン酸化されたのに対し、Gad8T387Ap はほとんどリン酸化されなかった (図2)。このことから、Ksg1p は Gad8p の T387 を直接リン酸化しているキナーゼだと考えられた。また、Gad8S546Dp は Ksg1p により強くリン酸化されることもわかった。いくつかの AGC ファミリーキナーゼでは、hydrophobic motif がリン酸化されると、PDK1 との結合や activation-loop へのリン酸化が促進することが報告されており、これと同様なことが Ksg1p-Gad8p においてもおきていると思われる。

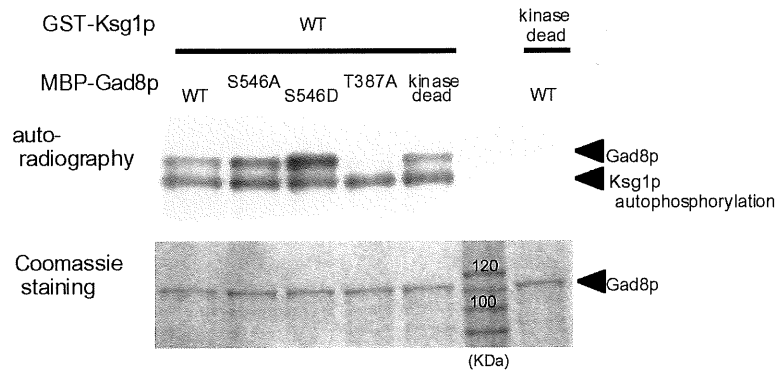
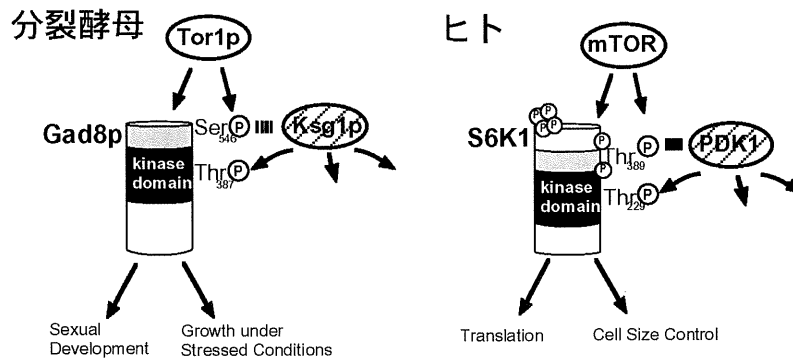


図2 Ksg1p はGad8p のT387を直接リン酸化する。大腸菌を用いてGST-Ksg1 およびMBP-Gad8 を発現、精製し、*in vitro* リン酸化測定を行った。Ksg1p は野生型 Gad8p、Gad8S546A 変異型をリン酸化するのにに対し、Gad8T387A 変異型へのリン酸化はほとんど見られなかった。

以上、Gad8p は Tor1p、Ksg1p 両キナーゼの下流で機能し、有性生殖およびストレス存在下での生育に必須の機能を持っていることが明らかになった。また Tor1p、Ksg1p は、それぞれ hydrophobic motif、activation-loop へのリン酸化を通じて、Gad8p の活性を制御していることが示唆された (モデル図)。哺乳類 S6K1 (p70 S6 kinase1) は AGC ファミリーに属するキナーゼの1つで、哺乳類 TOR である mTOR、および PDK1 によって活性が制御されていることが知られている。mTOR は主に hydrophobic motif のリン酸化、PDK1 は activation-loop へのリン酸化により S6K1 を制御している。哺乳類における mTOR-PDK1-S6K1 は、分裂酵母の Tor1p-Ksg1p-Gad8p の関係に類似しており、この3つのキナーゼからなる機構は、真核生物において広く保存されている情報伝達機構の1つだと思われる。



モデル図 分裂酵母 Gad8p は Tor1 と Ksg1p により、それぞれ hydrophobic motif の Ser546 および activation-loop の Thr387 のリン酸化を通じて、活性が制御されている。哺乳類 S6K1 も複数の部位にリン酸化を受けており、hydrophobic motif の Thr389 は mTOR に、activation-loop の Thr229 は PDK1 によって制御されている。キナーゼ領域を黒で、hydrophobic motif 周辺配列をドットで示した。