

# 論文審査の結果の要旨

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)タンパク質は真核生物に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。本研究において松尾朋彦は、下等真核生物の分裂酵母を用い、TOR タンパク質をコードする *tor1* ならびにその下流で機能する因子 *gad8* の機能と情報伝達における役割について解析を行った。

Tor1p は栄養源枯渇時に誘導される有性生殖の開始や、ストレス存在下での生育に必須であることが報告されていたが、Tor1p と同一経路で機能する因子は知られていなかった。申請者はそのような因子の単離を目的として、*tor1-g2* 変異株の示す有性生殖不能を多コピーで抑圧する遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、AGC (protein kinase A, G and C) ファミリーに属する新規 Ser/Thr キナーゼの遺伝子 *gad8* を単離した。*gad8* 破壊株は *tor1* 破壊株とほぼ同様の表現型を示した。また、Gad8p のキナーゼ活性は *tor1* 破壊株において著しく低下していることが分かった。野生株の細胞抽出液の SDS-PAGE を行うと、Gad8p には電気泳動度の遅い付加的バンドが観察されたが、このバンドは *tor1* 破壊株や、フォスファターゼ処理した場合は見られなかった。よって、*tor1* はリン酸化修飾を通じて Gad8p の活性を制御していると推測された。

AGC ファミリーの多くのキナーゼの活性化には、数カ所の保存された部位でのリン酸化修飾が重要な役割を果たしている。Gad8p においても対応するリン酸化部位、すなわち activation-loop 内の Thr389 および hydrophobic motif 内の Ser546 の周辺の配列が保存されていたため、これらの残基をそれぞれアラニンに置換し、Gad8p のキナーゼ活性および *gad8* 破壊の相補能を調べた。この結果、Gad8T387Ap 変異型はほとんど機能を持たず、一方、Gad8S546Ap 変異型は部分的に機能を失った変異型であると思われた。以上のことから、Gad8p においても AGC ファミリーキナーゼに見られる activation-loop および hydrophobic motif のリン酸化が活性化に必要なことが示唆された。

学位申請者は次に各種変異型 Gad8p の電気泳動度を測定した。Gad8S546Ap では、野生型や Gad8T387Ap とは異なり、移動度の遅いバンドが観察されなかった。*tor1* 破壊株では移動度の遅いバンドが見られないので、*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* 変異型を作製して *tor1* 破壊株に高発現したところ、それは野生型 *gad8* よりも *tor1* 破壊株の表現型を強く抑圧した。この結果は、*tor1* が S546 のリン酸化を通じて、Gad8p を活性化していることを支持した。

申請者は Gad8p の T387 のリン酸化制御についても解析を進めた。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以前に報告されていた。温度感受性の *ksg1-208* 変異株は、増殖が可能な非制限温度においても有性生殖は不能という表現型を示すが、*gad8* を高発現することにより、増殖の温度感受性と有性生殖不能の表現型は抑圧された。また、Gad8p のキナーゼ活性を測定したところ、*ksg1-208* 変異株においては培養温度によらず活性が低下していた。*in vitro* の実験では、Ksg1p は野生型の Gad8p をリン酸化したが、Gad8T387Ap をほとんどリン酸化しなかった。これらのことから、Ksg1p は Gad8p の T387 を直接リン酸化し、その活性を正に制御していると考えられた。

申請者は以上の実験結果をまとめて、Gad8p は Tor1p、Ksg1p 両キナーゼ依存的なリン酸化によって制御され、有性生殖およびストレス条件下での生育に必須の機能を担っていると結論した。分裂酵母で明らかになったこれら 3 つのキナーゼの相互関係は、哺乳類における 3 つのキナーゼ mTOR-PDK1-S6K1 の関係によく似ており、申請者の研究から、このような 3 キナーゼが真核生物において広く保存された情報伝達機構の基本ユニットの 1 つであることが推測された。

以上、松尾朋彦は分裂酵母の TOR 情報伝達系の解析を通じて、真核生物において広く保存された 3 キナーゼによる情報伝達モジュールの存在を支持する重要な知見を得た。本研究の成果は、分裂酵母のストレス応答や有性生殖に新しい知識をもたらしたのみならず、情報伝達の普遍的な分子機構の解明という観点からも高く評価できる。よって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、久保善哉、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、松尾朋彦に博士（理学）の学位を授与できると認める。