

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 田 岡 洋

真核生物の核は核膜によって細胞質と隔てられており、核と細胞質間を移動する物質の多くは能動的な輸送システムにより核膜孔を通過する。その典型的な輸送システムとして核移行シグナル (NLS) 依存的な核内輸送と核外移行シグナル (NES) 依存的な核外輸送が挙げられる。申請者が所属する研究室で発見されたレプトマイシン B (LMB) は、分裂酵母およびヒトの Crm1 の機能を阻害することが示されていたが、最近 Crm1 の機能が NES 受容体であることが明らかになった。核移行及び核外移行を受ける蛋白質には様々な因子が存在し、これらの細胞内局在の制御機構は多種多様であると予想されるが、その詳細は未だに明らかになっていないものが多い。本論文では分裂酵母 AP-1 様転写因子 Pap1 の細胞内局在制御機構について述べたものである。

(1) 分裂酵母 Pap1 は Crm1 によって負の制御を受けることが知られていた転写因子である。Pap1 の細胞内局在を観察するため Pap1 と GFP の融合蛋白質を発現させたところ細胞質に局在し、LMB の添加によって速やかに核に蓄積した。Pap1 の C 末端領域を欠失させたものは核に局在し、C 末端領域のみは細胞質に局在したことから、C 末端領域に NES が存在することが示された。NES として機能する最小領域を決定し Pap1 NES の必須アミノ酸残基を同定したところ、これまで知られていた NES と異なり、疎水性アミノ酸に加えてシステインが必要なユニークなものであった。Pap1 は酸化ストレスに応答した転写活性化を誘導し、さらに酸化ストレスの一種であるマレイン酸ジエチル (DEM) を添加すると Pap1 の核蓄積が観察された。DEM に対する応答は Pap1 NES のみでも十分であった。これらの結果から、Pap1 は酸化ストレス応答性の NES を持ち、Crm1 によって細胞質に輸送されることで転写因子としての機能を抑制され、酸化ストレスに応答して核に蓄積し転写を活性化するという制御機構が明らかとなった。

(2) Pap1 の酸化ストレス応答機構を解明するため、DEM と過酸化水素に対する応答機構を検討したところ、DEM に対する応答は Pap1 NES のみで十分なのに対し、過酸化水素に対する応答には Pap1 全長を必要とした。ストレス応答性 MAP キナーゼ Spc1/Sty1 の遺伝子破壊株では過酸化水素に対する応答は起こらないが、この株でも DEM には応答したことから、DEM と過酸化水素に対する Pap1 の応答機構は異なることが示唆された。DEM は細胞内の還元型グルタチオン (GSH) 濃度を低下させ酸化ストレスを誘導すると考えられるが、GSH 合成酵素変異株での解析から DEM の作用は GSH を介さずより直接的であることが示唆された。そこで Pap1 NES と DEM を *in vitro* で反応させたところ両者は共有結合した。DEM

はシステイン残基と反応性を持ち、Pap1 NES には活性に重要なシステイン残基が存在することから、Pap1 NES は DEM の様にシステイン残基と反応性を持つ親電子性物質に対するセンサーとして機能している可能性が考えられた。

(3) Crm1 の Cys529Ser 変異株は LMB に対して完全に耐性となるが、Pap1 依存的な遺伝子発現が構成的に活性化していた。そこで各種 NES の輸送活性を検討したところ、典型的な疎水性 NES の輸送は正常であるのに対し Pap1 NES の輸送活性が特異的に低下していた。Cys529 の周辺領域は種間で高度に保存されており、これを **central conserved region (CCR)** と命名し、この領域に各種点変異を導入した株を 15 株構築した。これら CCR 変異株では LMB 感受性が様々に変化したほか、疎水性残基の置換により疎水性 NES の輸送活性の低下が見られた。しかし CCR 領域に依存せずに Crm1 依存的に輸送されと考えられる Sbp1 は CCR 変異株でも輸送活性に影響は見られず、この領域の疎水性残基が疎水性 NES を認識していると考えられた。Crm1 Cys529Ser 変異株では Pap1 を輸送できないが、Cys529Ala 変異株では Pap1 を輸送することができた。しかしこの株でもシステイン変異型 Pap1 を輸送できないことから、Pap1 の核外輸送には Pap1 分子内だけでなく、Pap1 と Crm1 の間の分子間にシステイン同士の相互作用が存在する可能性が示唆された。

本研究では分裂酵母転写因子 Pap1 に酸化ストレス応答性の NES が存在することを明らかにし、さらにその応答機構について明らかにしている。また Crm1 による Pap1 や一般の NES の認識機構についても解析している。本研究は、核細胞質間物質輸送の制御機構の一つとして、酸化ストレス応答という生物にとって非常に重要な分子機構が関与することを明らかにしており、この分野に新知見をもたらした研究として意義がある。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あるものと認めた。