

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 金子 雅昭

---

細胞を取り巻く環境中には高浸透圧、UV、熱ショックなどといった刺激が満ちており、それらに応答し適応することは細胞にとって根源的な問題である。このような物理科学的ストレスに対する応答反応を統括する分子として、一連の MAPK 分子群がこれまでに同定されている。その中の一つ p38 は、昨今の研究結果から、多彩な生理現象への関与が示唆され、その研究成果は病理学的や薬理的にも有用な知見に繋がることが見込まれる。p38 の機能を解析する手段の一つとして、機能獲得型変異体を利用したものが挙げられ、現にこれまでにいくつかの p38 の機能獲得型の形質を示すと思われる変異体が単離されている。本研究は、機能獲得型変異体を取得する方針として、不活性化因子であるプロテインホスファターゼに着目し、これに耐性を示す変異体を探索することで目的の変異体を取得しようという独自のアプローチを試みたものである。本論文は序論と 2 部からなる。

序論では、研究の背景と目的を述べている。MAPK 一般について概説した後、p38 の生理的な役割や p38 に関する最近の知見などについて詳説し、さらに酵母における相同分子 Hog1p についてふれた。次に MAPK を負に制御するホスファターゼについて、その種類、特性を解説し、最後に機能獲得型変異体を取得する意義について述べ、現在までの関連する研究の報告を挙げつつ、本研究の目的を明らかにした。

第 1 部では、酵母における解析の結果と考察を示している。酵母における p38 のホモログは浸透圧応答経路の MAPK、Hog1p であり、Hog1p は p38 と同様に 2C 型セリン/トレオニンホスファターゼ Ptc1p、およびチロシンホスファターゼ Ptp2/3p により脱リン酸化され不活性化される。Ptc1p と Ptp2/3p の両方を遺伝子破壊すると、Hog1p の過剰な活性化により致死となる実験的事実に基づき、ホスファターゼに耐性を示す変異体を探索する手段としてホスファターゼの指向性の違いを利用したスクリーニング系を構築した。ランダムに変異を導入した Hog1p 変異体群に対し、このスクリーニング系を適用した結果、Ptc1p に対し特異的に耐性を示す Hog1p 変異体 V140A、I206T、F359L、F359S が単離された。一方で、Ptp2/3p 特異的に耐性を示す Hog1p 変異体は単離されておらず、その理由を考察した。Hog1p と p38 を含む他の MAPK のアミノ酸配列の比較から、変異の確認された残基<sup>140</sup>Val と<sup>206</sup>Ile は活性化ループを挟む位置にあることが予想され、MAPK に保存された機能に関わるアミノ酸残基であると推察される。これらの Hog1p 変異体が Ptc1p に対し特異的に耐性を示す直接的な証拠として、リン酸化 Thr およびリン酸化 Tyr に対する特異的抗体を用いた解析により、*in vivo* において Thr 残基のリン酸化が亢進することを確認した。また Ptc1p に対し特異的に

耐性を示すHog1p変異体として、V140A、I206T以外に、F359L、F359SといったHog1pのC末端領域に変異を有するものが取得されたことから、この理由を調べるべく、種々のHog1p C末端欠失変異体を作成し、解析に用いた。その結果、C末端の欠失のみによりPtc1pへの特異的な耐性の獲得につながることを示し、これを説明するモデルとして3つ提唱した。

第2部では、培養細胞における解析の結果と考察を示している。Hog1pにおける変異体(V140A、I206T)と相同な変異を導入したp38変異体(それぞれI146A、I212T)を作製し、培養細胞中でのリン酸化状態を調べたところ、I212TについてThr残基のリン酸化の亢進が顕著に見られ、また刺激応答後の脱リン酸化も遅延することを確認した。またプロテインホスファターゼに対する耐性について、p38に直接作用することが知られている2C型セリン/トレオニンホスファターゼPP2C $\alpha$ を用いた解析、具体的には*in vivo*において共発現、または*in vitro*において精製PP2C $\alpha$ を作用させるという2つのアッセイを行い、p38変異体はホスファターゼによる脱リン酸化に抵抗性を示すことを明らかにした。またp38の基質ATF2のリン酸化をモニターするルシフェラーゼアッセイにおいて、p38変異体は野生型に比べ高い活性を有し、この高いキナーゼ活性により、p38変異体は細胞毒性を示すことも確認した。これらの結果を踏まえ、本研究で取得されたp38変異体が機能獲得型の形質を示す理由について、各ホスファターゼの特性と関連付けて考察し、最後にこのp38変異体を用いての今後の展望について述べている。

以上、本研究はホスファターゼ耐性型Hog1pおよびp38変異体の単離・作出を通して、シグナル伝達機構の解析におけるツールを提供しただけでなく、Hog1pおよびp38の制御機構について新たな知見を得たものとして、学術上または応用上寄与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)の学位として価値あるものとして認めた。