

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 米山 京

細胞の増殖は、増殖因子などの増殖刺激に加え、栄養状態に応じて制御されている。細胞が栄養源を検知するための情報伝達経路において中心的な役割を果たし、細胞の成長を調節している情報伝達因子が、Target of Rapamycin、TOR である。免疫抑制剤、抗癌剤として知られるラパマイシンが、細胞の成長や増殖を阻害して、飢餓応答反応を引き起こすことから、その標的タンパク質として同定された。酵母、分裂酵母、線虫、ショウジョウバエ、哺乳類、シロイヌナズナなどの真核生物において、その構造と機能は高度に保存されている。酵母には Tor1p と Tor2p が存在し、Tor1p または Tor2p と、Lst8p、Kog1p からなる TORC1 と、Tor2p、Lst8p、Avo1, 2, 3p からなる TORC2 という2つの複合体を形成している。TORC1 はラパマイシンに感受性であり、タンパク質合成を制御すると示唆され、一方の TORC2 はラパマイシンに非感受性であり、アクチン細胞骨格形成を制御すると示唆されている。本論文は、TOR の活性を制御する機構を分子レベルで明らかにすることを目的に、酵母を用いて活性化型 TOR の単離とその解析を行い、これをまとめたものである。

第一章では、活性化型 TOR2 の単離について述べている。これまでの TOR 経路に関する研究は、ラパマイシン処理や機能欠損変異による TOR の活性低下に伴う効果を検討する手法が中心であった。しかしながらその手法では、飢餓条件下に置かれた細胞が引き起こす飢餓応答反応が、TOR を必ず介した TOR 依存的な反応であるのか、あるいは TOR が間接的・非制限的な役割を果たした反応であるのかについては、結論が出せていない。そこで遺伝学的解析の容易な酵母を用いて、栄養飢餓状態においてもその活性を失うことのない、TOR の機能獲得型変異体の取得を試みたことを述べている。本論文中に書かれている原理に従い、ラパマイシンに対する耐性を指標としてスクリーニングを行ったところ、活性化型の候補である変異型 TOR2 を15クローン単離することに成功したことを報告している。

第二章では、第一章で得られた変異型 TOR2 のプラスミドを用いた遺伝学的な解析について述べている。得られた変異型 TOR2 の15クローンの中から、最も活性が強いと思われる1クローン (TOR2-LM 変異体) を選択し、TOR2-LM と相同な変異を TOR1 に導入した TOR1-LM を作製して、これも加えて以降の解析を行っている。TORC1 の構成因子である Kog1p と、TORC1、TORC2 両複合体の構成因子である Lst8p は共に生存に必須のタンパク質であり、その機能を欠損すると

致死となる。2種の *kog1* 温度感受性変異株に、*TOR1*、*TOR1-LM*、*TOR2*、*TOR2-LM* プラスミドを導入し、これらの株の制限温度条件下における生育を回復できるかどうかを見たところ、*TOR1-LM* は両変異株の生育を回復させ、*TOR2-LM* は一方の変異株の生育を回復させた。また、*lst8* 遺伝子破壊株にも上記のプラスミドを導入したところ、*TOR2-LM* のみが破壊株の生育を回復させることができたことを報告している。この結果から、LM 変異体は低下した TOR 複合体の活性を回復させることができる変異体であり、活性化型である可能性が高いことを論じている。

第三章では、LM 変異を酵母のゲノムに組み込んだ変異株を作製し、この株を用いた生化学的な解析について述べている。Tor1p に LM 変異を持つ株は野生株に比して、貧栄養培地における生育が悪化し、窒素飢餓条件下における生存率が著しく悪化していた。窒素源飢餓条件下におけるグリコーゲンの蓄積という飢餓応答に欠陥があったことから、*TOR1-LM* 変異体は、栄養飢餓条件下にあっても活性を失わない、恒常的な活性を持つ可能性があることと示唆されることを論じている。このことを明らかにするために、分子レベルでの解析を行っている。TORC1 の下流因子を用いて TORC1 の活性状態を検証したところ、窒素源飢餓状態においても TORC1 の活性を維持していることを示し、さらにキナーゼアッセイを行うことにより、Tor1p と Tor2p の両 LM 変異体は、野生型の Tor1p と Tor2p よりもキナーゼ活性が亢進していること報告している。

考察では、本研究で単離した変異型 TOR が、あらゆる系を通じて、機能獲得型・活性化型 TOR 変異体の唯一の例であること、この変異体を用いることにより、栄養シグナルが実際に TOR の活性調節を介して種々の応答反応を引き起こしていることを示した最初の報告であることを述べている。さらに、本研究を通じて得られた結果から推測できること、今後の課題、展望について論じている。

以上、本論文は、TOR の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。