

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 神谷 昌男

細胞は外界の栄養条件を検知して、細胞の成長と増殖を制御する機構を備えている。この機構で中心的役割を果たしている情報伝達因子が、TOR (Target of Rapamycin) である。TOR は、細胞内に取り込まれた栄養源によって活性化される一方、栄養飢餓状態、もしくは免疫抑制剤ラパマイシンを添加すると、TOR の活性は抑制され、細胞の成長と増殖は停止する。酵母 TOR には *TOR1*、*TOR2* の2つの相同遺伝子が存在し、TORC1 (TOR complex 1) 複合体と TORC2 (TOR complex 2) 複合体が形成されている。TORC1 はラパマイシン感受性で、アミノ酸トランスポーターの安定性制御、オートファジーの制御などを行っている。これに対して、TORC2 はラパマイシン非感受性で、アクチン骨格の制御に関与している。TORC1 と TORC2 の共通の構成因子である *Lst8p* の温度感受性変異株 (*lst8^{ts}* 株) を制限温度下におくと、TORC1、TORC2 の活性が低下することから、*Lst8p* が TORC1、TORC2 の活性化に必須の上流因子であることが報告されている。本研究は *Lst8p* と協調して TOR の活性制御に関わる新規因子を単離することを目的に、*lst8^{ts}* 株を用いてマルチコピーサプレッサー遺伝子のスクリーニングを行い、同定した *ALY1*、*ALY2* の機能解析を通じて TOR の活性制御機構の解明を目指したものである。本論文は序論、結果、考察からなっている。

序論では、研究の背景と目的を述べている。TOR の同定された経緯や構造について概説した後、TOR の生理的な役割や酵母 TORC1、TORC2 の制御するシグナル伝達経路について詳説している。酵母アミノ酸トランスポーターについて触れた後、ユビキチンリガーゼ *Rsp5p* による栄養源トランスポーターの制御について述べている。さらに、*Lst8p* による TOR の活性制御に関する知見を挙げ、*lst8^{ts}* 株のマルチコピーサプレッサー遺伝子を同定する意義について述べ、本研究の目的を明らかにしている。

結果は4章で構成されている。1章では、*ALY1*、*ALY2* の同定について示している。*lst8^{ts}* 株を用いてマルチコピーサプレッサー遺伝子のスクリーニングを行った結果、タンパク質の生理的機能が報告されていない遺伝子 *ALY2* (Arrestin-like protein in yeast 2) が同定された。また、*Aly2p* とアミノ酸配列で56%の相同性をもつタンパク質をコードする *ALY1* がゲノム上に存在しており、*ALY1* もマルチコピーで *lst8^{ts}* 株の生育阻害が回復したことから、*Aly1p*、*Aly2p* が類似した機能をもつ因子であると結論している。

2章では、*ALY1*、*ALY2* 破壊株と高発現株の解析について示している。いずれの株もアルギニン類似体 L-カナバニンに野生株より耐性を示し、¹⁴Cアルギニンの取り込み能も低下していた。さらに、各破壊株のアルギニントランスポーター *Can1p* のタンパク質量は野生株に

比べて減少し、Can1pのはっきりした細胞内局在も見られなかった。また、各破壊株の増殖は、細胞の生育に最低限必要な窒素源や糖類を含む最少合成培地のSD培地では野生株と同程度あったが、SD培地に13種類のアミノ酸と核酸塩基を加えた完全合成培地のSC培地では野生株より遅かったことから、Aly1p、Aly2pはアルギニンに代表される栄養の取り込みに関与する因子であると結論している。一方、高発現株では、Can1pのタンパク質量や細胞内局在に野生株と比べて顕著な変化は見られなかったものの、L-カナバニンに野生株より感受性を示し、¹⁴Cアルギニン取り込み能も亢進していた。各破壊株のエンドサイトーシスを脂溶性色素FM4-64で観察した結果、各破壊株では3個以上に細分化した液胞が見られた。このような細分化した液胞は、エンドソーム膜の形成が不十分になっている変異株で観察されており、Aly1p、Aly2pはエンドソーム膜の形成に関与していると結論している。

3章では、Aly1p、Aly2pのPXYモチーフの解析を示している。Aly1p、Aly2pのPXYモチーフをアラニンに置換した変異体を作製し、Rsp5pとの結合能を検討したところ、野生型タンパク質で見られたRsp5pとの結合が変異体では失われており、Aly1p、Aly2pはPXYモチーフを介してRsp5pと結合することが確認された。また、ゲノム上のALY1、ALY2を変異体に置換した株は、破壊株と同程度にL-カナバニン耐性を示し、¹⁴Cアルギニン取り込み能も低下していた。また、変異体をマルチコピーで導入しても*lst8^{ts}*株の制限温度下での生育障害は回復しなかったことから、Aly1p、Aly2pの機能にはRsp5pとの結合が必要であると結論している。

4章では、ALY1、ALY2高発現による*lst8*温度感受性変異抑圧の機構を示している。ALY1、ALY2をマルチコピーで導入した*lst8^{ts}*株の、制限温度下のアルギニン取り込み能を測定した結果、低下したアルギニン取り込み能が回復していた。さらに、ALY1、ALY2の導入により制限温度下で低下したTORC1の機能も回復していた。以上のことから、ALY1、ALY2高発現により細胞内の栄養状況が改善し、TORC1の活性が回復したため*lst8*温度感受性変異が抑圧されたと推測している。

考察では、本研究で同定したALY1、ALY2が*lst8*温度感受性変異を抑圧する機構についてモデルを提唱している。そして、Aly1p、Aly2pのアミノ酸トランスポーターの具体的な制御機構についてRsp5pの生理的機能および哺乳類アレスチンの知見と関連付けて考察し、最後にAly1p、Aly2pの酵母相同タンパク質について述べるとともに、今後の課題を提示している。

以上、本研究はAly1p、Aly2pの同定、機能解析を通して、現在まで不明であったAly1p、Aly2pの生理的機能の一部を明らかにしただけでなく、酵母アミノ酸トランスポーターの制御機構や、TORの活性制御機構について重要な知見を提供するもので、学術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。