

論文審査の結果の要旨

氏名 篠田 淳郎

本論文は2章からなる。第1章は、出芽酵母の HECT 型ユビキチンリガーゼ Rsp5 の結合タンパク質 Rod1 が Snf1 キナーゼ複合体によりリン酸化を受けることを分子生物学的手法を用いて立証したものである。Rsp5 はヒトの Nedd4 のホモログであり、細胞内輸送、エンドサイトーシス、ストレス応答など様々な局面において、基質タンパク質をユビキチン化することで中心的な働きをする。ユビキチン化は基質タンパク質を分解に導く不可逆反応であることから、その制御機構を明らかにすることは重要である。出芽酵母 *ROD1* はグルタチオンにより解毒される薬剤である *o*-dinitrobenzene 耐性を付与する遺伝子として単離され、その遺伝子産物は C 末端側に 2 カ所ある PY モチーフを通じて Rsp5 の WW ドメインと相互作用すること、さらに PY モチーフに変異を導入すると *o*-dinitrobenzene 耐性を付与しなくなることが明らかにされていた。

Rod1 が Snf1 キナーゼ複合体の γ サブユニットである Snf4 と免疫沈降実験において共沈すること、Rod1 が Snf1 キナーゼ活性依存的に翻訳後修飾を受けていることを見いだした。さらに、*snf1* 変異株も *o*-dinitrobenzene 感受性を示した。Snf1 は出芽酵母における AMP 活性型キナーゼであり、酵母細胞がグルコース飢餓状態に陥ると活性化され、転写因子などのリン酸化により、グルコース以外の炭素源を利用する為の遺伝子の転写を促す。Rod1 の翻訳後修飾がリン酸化であるかを調べる為に CIP アッセイを行い、ウェスタンブロッティングにおいて Rod1 のエクストラなバンドが消失したことから Rod1 はリン酸化を受けていることが分かった。Rod1 のアミノ酸配列中には、Snf1 のターゲットになりうる配列が 4 カ所存在したので、それぞれに変異を導入し、ウェスタンブロッティングを行った。その結果、447 番目のセリン残基をアラニンに置換した Rod1 (S447A) のみ、エクストラバンドが消失した。さらに、これらの変異 Rod1 の *o*-dinitrobenzene 耐性能を比較したところ、Rod1 (S447A) のみが野生型の Rod1 よりも強い耐性能を酵母に与えることが分かった。大腸菌で発現させ、アフィ

ニティー精製した Rod1 と、酵母から精製した Snf1 を用いて *in vitro* キナーゼアッセイを行ったところ、Rod1 (1-459) は Snf1 によりリン酸化されたが 447 番目のセリン残基を含まない Rod1 (1-444) は Snf1 によるリン酸化は見られなかった。従って Rod1 の 447 番目のセリン残基は *in vivo* においても *in vitro* においても Snf1 キナーゼによりリン酸化を受けることが分かった。

第 2 章では、Rod1 は G タンパク質共役型受容体 Gpr1 の C 末端と相互作用することを明らかにした。Rod1 は N 末側に高等生物のアレスチンと相同な領域 arrestin-N、C domains を持つ。アレスチンは、主に G タンパク質共役型受容体などの 7 回膜貫通タンパク質受容体がホルモンなどそれぞれに固有のリガンドを受け取ると、その受容体の細胞質ドメインに結合し、エンドサイトーシスを引き起こすことで脱感作することが知られている。また、経路によっては下流へシグナルを伝達する役割を果たす場合もある。

出芽酵母の G タンパク質共役型受容体である性ホルモン受容体 Ste2、グルコースセンサーであり、cAMP やカルシウムイオンの上昇に関与する Gpr1 の細胞質ドメインと Rod1 の相互作用を調べた。その結果、Gpr1 の細胞質ドメインであるテイル部分と Rod1 が結合することが分かった。また、Rsp5 も Rod1 と同様に Gpr1 の C 末端のテイル部分と複合体を形成することが判明した。さらに、*gpr1* 欠損株も *o*-dinitrobenzene 感受性を示した。これらの結果から、Rod1 は Gpr1 のシグナル伝達経路に働くアレスチンであり、ユビキチンリガーゼ Rsp5 との結合を橋渡しする因子であることが示唆された。最も重要な栄養源であるグルコースを細胞膜上で感知する Gpr1 の細胞質側の結合因子として Rod1 が同定されたことは大変重要な発見であると評価できる。

なお、本論文第 1 章は、菊池淑子との共同研究であるが、論文提出者が主体となって解析を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。