

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

寺島 農

---

申請者氏名

細胞は、自身の恒常性を維持するために、外部環境からのストレスに対してさまざまな適応反応を有している。単細胞生物である酵母において、浸透圧ストレスに応答して活性化される情報伝達経路として HOG (High Osmolarity Glycerol) 経路が知られている。HOG 経路においては、MAP キナーゼ (MAPK) である Hog1p が中枢の構成因子として機能し、その活性化は浸透圧ストレス下における酵母の生育に必須である。これまでに HOG 経路の活性化機構は既知の 2 つの機構以外は存在しないと考えられてきた。本研究では Hog1p の活性化を従来よりも高感度に検出することにより、新たな活性化機構を見出し、その活性化がどのようにして起こっているのかを調べている。

序論では、研究の背景と目的を述べている。まず、HOG 経路における既知の 2 つの活性化機構である Sln1p 経路および Sho1p 経路に関して分かっていることを述べた後、経路の活性化がどのようにして浸透圧ストレス下における酵母の生育に寄与しているのかについてその分子機構に触れている。次に、細胞が浸透圧ストレスに適応した後の経路の不活性化について、プロテインホスファターゼによる機構を中心に説明している。さらに、経路が特異的に機能するためにそれを保障する機構がいくつか知られているが、それらに関して述べている。最後に、本研究の目的である新たな活性化機構を調べることになった経緯を述べている。

結果では、まず既知の 2 つの活性化機構が機能しない変異株である *SSK1 STE11* 二重破壊株でも、浸透圧ストレス依存的に Hog1p が活性化されることを示している。これはこの変異株が浸透圧ストレス耐性を示し、さらに Hog1p の活性をモニターするためのレポーター遺伝子、および従来よりも高感度な検出試薬を用いたウェスタン解析により、Hog1p の活性化を検出できたという結果に基づいている。続いて、この活性化に MAPK キナーゼ (MAPKK) である Pbs2p および MAPKK キナーゼ (MAPKKK) である Ssk2p が必要であることを示した後、2 つのモデルを提案し、検証している。1 つは、浸透圧ストレスに応答した Ssk2p および Pbs2p の活性化を介して Hog1p が活性化されるとするモデルで、これを支持する結果として、*in vitro* キナーゼアッセイにより Pbs2p がストレス依存的に活

活性化されることを見出している。もう 1 つは、Hog1p を不活性化するプロテインホスファターゼが、浸透圧ストレスに依存して阻害されることにより Hog1p が活性化されるとするモデルで、このモデルを支持する結果として、浸透圧ストレス依存的に活性が変化しない活性化型 Pbs2p 変異体を導入しても、Hog1p の活性化が浸透圧ストレスに依存して起こることを見出している。これらの結果は、これら 2 つのモデルに相当する活性化機構がいずれも存在していることを示唆している。

次に、この新たに見出した活性化機構の構成因子を探索している。まず、HOG 経路の構成因子や浸透圧応答関連因子から候補となる因子を推定して、それらが活性化機構に必要なかどうかを各遺伝子の破壊株を作製して調べている。1 つめのモデルに関しては、既知の活性化機構において Ssk2p を活性化するために必要なドメインと相同な領域をもつ Sln1p、もしくは Skn7p を候補因子として考えている。さらにこれまでの知見から Ssk2p の活性化に関与している可能性が考えられた polarisome の構成因子も 1 つめのモデルの候補因子として考えている。また 2 つめのモデルのプロテインホスファターゼに関しては Hog1p の主な負の制御因子であるチロシンホスファターゼ Ptp2p、またはセリン/スレオニンホスファターゼ Ptc1p を候補因子として考えている。しかし、いずれも活性化機構には必要ではなかった。

そこで、浸透圧ストレス依存的に Hog1p が活性化されない変異株を、高浸透圧感受性と Hog1p 活性化の消失を指標にスクリーニングし、約 40,000 クローンから新規遺伝子の変異株を 1 クローン取得している。この変異株は多重変異によるものであることを明らかにし、その原因遺伝子をクローニングすることにより、原因遺伝子の一つがユビキチンリガーゼ Rsp5p をコードするものであったと結論付けている。

最後に考察で、浸透圧ストレスに依存した Hog1p の活性化に Rsp5p が関与する機構と、この Hog1p の活性化の生理的意義に関して考えられることをいくつか提案し、論じている。

以上、本研究では、これまでに報告されていない Hog1p の新たな活性化機構を見出している。この機構は、真核生物で高度に保存されているストレス応答性 MAPK 経路の活性化機構に関してより深い知見を提供するものと考えられ、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。