

論文題目の要旨

分裂酵母におけるオートファジーの生理的役割と制御機構の解析

(Analysis of physiological roles and regulatory mechanisms of autophagy in fission yeast.)

氏名；幸田 俊希

オートファジーは真核生物に広く保存されたタンパク質分解機構であり、栄養源飢餓時に誘導される。オートファジーが誘導されると細胞質の一部を囲い込んだ二重膜に包まれた構造体（オートファゴソーム）が形成され、このオートファゴソームがタンパク質分解酵素を豊富に含むリソソーム（酵母・植物では液胞）に融合する。そして内側の膜で包まれた細胞質（オートファジック・ボディ）がリソソーム中に放出されて分解されるという過程を経る（図 1）。オートファジーは、その形式から大規模かつ無差別のタンパク質分解機構という特徴を持っている。

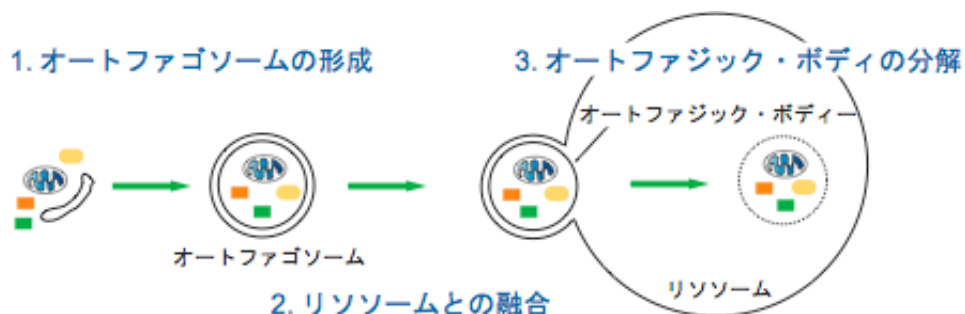


図 1. オートファジー機構の概略図

分裂酵母は単相・単細胞の真核生物であり、分裂により増殖する。図 2 に示すように、窒素源が存在する条件（図 2 の+N; N は Nitrogen を示す）では分裂により増殖するもの

の、外部環境から窒素源を得ることができない窒素源飢餓条件下におかれると細胞周期を G1 期で停止する。この段階で異なる接合型の細胞と出会くと、接合し減数分裂を経て孢子を形成するという有性生殖過程へ移行する (図 2 の-N)。他のモデル生物における解析から、オートファジーは栄養源飢餓時に誘導されることが知られていたため、本研究では、分裂酵母において窒素源飢餓により誘導されるこれらの飢餓適応過程に、オートファジーがどのような役割を果たしているかを解析することを目的とした。

分裂酵母の野生株は窒素源飢餓条件下におかれた時に強いタンパク質分解活性を示すが、オートファジーに必要な出芽酵母 *ATG* 遺伝子 (*AuTophaGy*) の相同遺伝子 (*atg* 遺伝子) を破壊した株はほとんどタンパク質分解活性を示さないことが明らかとなった。また電子顕微鏡を用いた観察で、分裂酵母におけるオートファジーの中間体を捉えることができた。これらの結果から分裂酵母においてもオートファジー機構が窒素源飢餓条件下で機能していることが示唆された。続いて、*atg* 遺伝子破壊株を完全に窒素源の存在しない条件におくと、両接合型の細胞がそろっていても接合できないことが明らかとなった。従って、オートファジー機構は、窒素源飢餓条件下におかれたときに適切に飢餓適応を実行するために重要であるといえる。しかし意外なことに *atg* 遺伝子破壊株は、少量だけ窒素源が存在する条件下では正常に飢餓適応を完了できた。従ってオートファジーの役割は、外部環境から窒素源を得られない条件下におかれたときに、タンパク質分解を通して細胞に「窒素源」を供給することだと考えられた (図 2)。

QuickTime[®] C²
à l'ifÉVÉçOÉâÉÀ
Ç™Ç±ÇÃÉsÉNÉ ÉÉÇ%â@ÇÉÇÇÇ%Ç...ÇÖiKóvÇ-ÇiAB

図 2. オートファジー機構が分裂酵母において果たす生理的役割

続いて分裂酵母オートファジーの制御機構について解析した。分裂酵母のオートファジーは窒素源飢餓により活性化されることを前述したが、窒素源飢餓により誘導されたオートファジーは、窒素源を加えると速やかに抑制された。従ってオートファジー機構の ON/OFF は、外部環境の窒素源量をモニターする機構によって厳密に制御されていることが予想された。オートファジー機構が、窒素源の有無に敏感に反応することと対応するように、オートファジー関連分子も窒素源の有無により挙動が変化する様子が観察された。*atg1* はキナーゼをコードする遺伝子であるが、*Atg1* は窒素源存在下から窒素源飢餓条件に移ることで部分的な脱リン酸化を受け、キナーゼの活性が上昇する様子が観察された。また *Atg13* は窒素源存在下で高度にリン酸化を受けているものの、窒素源飢餓条件に移ると速やかに脱リン酸化された。

このような実験的経緯から本研究では、外部環境の窒素源をモニターする機構がオートファジーを制御する分子機構に興味を持って以降の実験を行った。「外部環境の窒素源をモニターする」機構には、真核生物において広く保存された TOR (Target Of Rapamycin)キナーゼが関与していることが明らかにされていたが、TOR 以外に関与している分子は全く不明であった。そこでこの機構に関与する新規因子を単離するための遺伝学的スクリーニングを行うこととした。オートファジーに関係する液胞プロテアーゼをコードする *isp6* 遺伝子は、その転写活性が窒素源の有無に影響を受け、窒素源存在下では低く、窒素源飢餓条件で速やかに上昇する。この *isp6* 遺伝子の ORF をマーカー遺伝子に置き換えた株を作製し、*isp6* 遺伝子の転写活性を正に制御する因子を探索した結果、転写因子をコードする *gaf1* 遺伝子が得られた。その後 *Gaf1* と同じタイプの転写因子を解析した結果、*Gaf2* も *isp6* 遺伝子の転写活性制御に役割を果たしていることが明らかとなったので、これらの因子の機能について解析した。

解析の結果 *gaf1 gaf2* 二重破壊株は、窒素源の豊富な YE 培地などでは正常に生育したものの、単一種の窒素源のみを含む EMM+NH₄Cl 培地などでは全く生育しないという表現型を示した。このことから *Gaf1* と *Gaf2* は単一種の窒素源、例えば NH₄Cl のみしか得られない条件で、その窒素源を様々な種類の窒素源 (アミノ酸など) に変換するために必要な因子であると予想された。実際に野生株を YE から EMM+NH₄Cl 培地に移すと、NH₄Cl を代謝する酵素群やアミノ酸を合成する酵素群の転写活性が上昇するが、*gaf1gaf2* 二重破壊株ではこのような現象が観察されなかった。従って *Gaf1* と *Gaf2* は、外部環境に存在する窒素源が限られている条件で、その窒素源を多種類のアミノ酸に変換するために重要な役割を果たす因子であると考えられる。

本研究で得られた結果をまとめると、図 3 に示したような概念図を描くことができる。まず、オートファジー機構は外部環境から窒素源を得られない条件で、タンパク質分解

を通じて細胞内に窒素源を供給し、飢餓応答を保証する役割を果たしている。Gaf1/Gaf2 は単一の窒素源しか得られない条件で、代謝酵素の転写活性化を通じてその窒素源を多種類の窒素源に変換する役割を果たし、細胞の生育を保証している。オートファジー機構と Gaf1/Gaf2 は共にその関与するレベルは異なるものの、外部環境の窒素源の状況に対して適切な対応をとることに重要な役割を果たしていると言える。

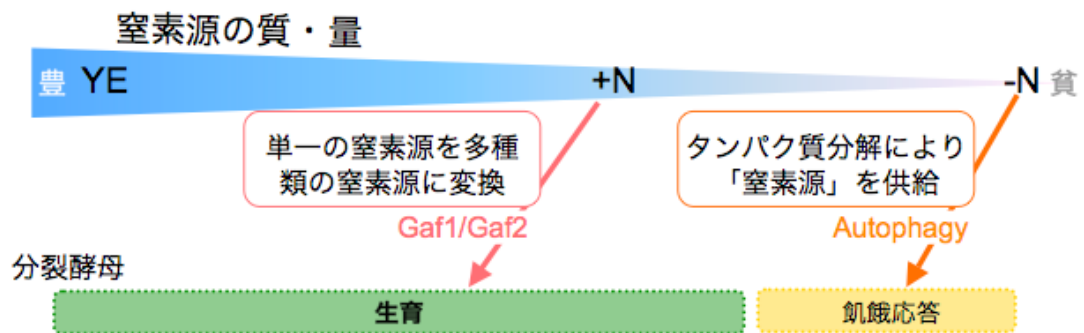


図 3. オートファジー機構と Gaf1/Gaf2 の窒素源代謝における役割