

# 論文審査の結果の要旨

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が形成され、この外側の膜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)と融合する。そして内側の膜に囲まれた小胞がリソソーム中に放出されて分解される。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。

学位申請者が研究で用いた分裂酵母は、単相・単細胞の真核生物であり、窒素源の存在下 (+N 条件)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られない窒素源飢餓条件下 (-N 条件)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うと、接合・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。学位申請者は、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果たす役割を解析し、以下の結果を得た。

分裂酵母の野生株は-N 条件で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の遺伝子 (*ATG* 遺伝子)の、分裂酵母における相同遺伝子 (*atg* 遺伝子)を破壊した株はほとんどこの分解活性を示さなかった。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が-N 条件下で機能していることが示唆された。続いて *atg* 遺伝子破壊株の表現型を解析したところ、-N 条件で接合しなかったことから、オートファジーは-N 条件下で適切に飢餓適応を実行するために重要であると考えられた。しかし *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し、オートファジーの役割は、-N 条件におかれたときに、タンパク質分解を通して細胞に飢餓応答を果たすための窒素源を供給することだと考えられた。

分裂酵母のオートファジーは-N 条件下で活性化されるが、+N 条件にうつす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と予想された。申請者は、この制御機構

を探るために以下の実験を行った。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 キナーゼ以外に関与している分子は不明であった。この機構に関与する新規因子を単離する目的で、窒素源飢餓で誘導される *isp6* 遺伝子の転写活性を指標にした遺伝学的スクリーニングを行った。*isp6* 遺伝子はオートファジーに重要なプロテアーゼをコードし、転写活性が+N 条件では非常に低く、-N 条件で速やかに上昇する。スクリーニングの結果、*isp6* 遺伝子の転写活性を上げるものとして転写因子をコードする *gaf1* 遺伝子が得られた。さらにその遺伝子産物 Gaf1 と同じタイプの転写因子を解析した結果、新規因子 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。

Gaf1/Gaf2 の機能について解析したところ、*gaf1 gaf2* 二重破壊株は完全培地では正常に増殖するものの、最少培地では全く増殖しないという表現型を示した。最少培地に多種類の窒素化合物 (アミノ酸) を添加した培地上では *gaf1 gaf2* 二重破壊株は増殖したため、最少培地上で増殖しないのは窒素化合物不足が原因と考えられる。この表現型から、転写因子 Gaf1/Gaf2 の機能は、最少培地で得られる窒素源 (通常  $\text{NH}_4\text{Cl}$  など一種類の窒素源) を、様々な種類の窒素化合物 (アミノ酸など) に変換するために必要な酵素群の転写活性化であると予想された。実際に野生株を完全培地から最少培地に移すと、 $\text{NH}_4\text{Cl}$  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、*gaf1 gaf2* 二重破壊株ではこのような現象が観察されなかった。

以上、幸田俊希は本研究において、オートファジー機構は -N 条件でタンパク質分解を通じて窒素源を供給し、飢餓応答を保証する役割を果たしていること、また新規転写因子 Gaf1/Gaf2 が -N 条件で代謝酵素の転写活性化を通じて、得られる窒素源を多種類の窒素化合物に変換する役割を果たし、細胞の増殖を保証していることを示した。これらの研究成果は、細胞が栄養源飢餓に適応する分子機構の理解に対する重要な寄与であり、学位申請者の業績は博士 (理学) の称号を受けるにふさわしいと審査員全員が判定した。なお本論文は田仲加代子、許斐麻美、佐藤眞美子、大隅正子、山本正幸との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、幸田俊希に博士 (理学) の学位を授与できると認める。