

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 島山 理広

細胞が様々な外部環境に適応する上で、細胞膜タンパク質を柔軟かつ厳密に入れ替えることは重要である。タンパク質を速やかに細胞膜から除去する手段として、エンドサイトーシスを介して細胞内に取り込む機構が知られる。細胞膜タンパク質がエンドサイトーシスされるためにはユビキチン化修飾を受けることで積み荷として認識される必要があるが、ユビキチン化を受ける細胞膜タンパク質が選択される機構、およびユビキチン化が細胞の置かれた様々な状況に応答して制御される機構は多くの場合不明である。本研究ではユビキチンリガーゼアダプターとして働くと考えられている酵母アレスチン様タンパク質の 1 つ、Aly2 の機能解析を通してこれらの問題へアプローチしている。

背景・目的の章ではエンドサイトーシスとアレスチン様タンパク質の関連を中心に既存の知見について詳説し、本研究の目的（上記）を明らかにしている。

結果の章ではまず野生株と *aly2Δ* 株においてアスパラギン酸・グルタミン酸トランスポーター Dip5 の局在を観察している。その結果として *aly2Δ* 株では野生株と比較して細胞膜局在が顕著であり、さらに細胞を高濃度のアスパラギン酸またはグルタミン酸で刺激した場合に野生株ではほとんどの Dip5 が液胞へと輸送されるのに対し、*aly2Δ* 株では細胞膜上に留まることを示している。これらの観察から Aly2 は Dip5 の正常なエンドサイトーシスに必要であると結論づけている。

次に Dip5 のユビキチン化が *aly2Δ* 株で低下していることを示している。また *in vivo* における Aly2 とユビキチンリガーゼ Rsp5 の物理的な結合を共沈降実験によって示し、さらに Rsp5 と結合しなくなる変異を Aly2 に導入した株では Dip5 のエンドサイトーシスが正常に起こらないという結果から、Rsp5 との結合が Aly2 の機能に必須であることを示している。加えて Aly2 と Dip5 との共沈降も示し、Aly2 は Dip5 と Rsp5 とをつなぐアダプターとして機能すると結論づけている。

次に細胞をアスパラギン酸で刺激することで Aly2 と Dip5 との結合が亢進することを見出し、Aly2 は基質依存的に Rsp5 を Dip5 へとリクルートしてユビキチン化を促進することでエンドサイトーシスを誘導すると結論づけている。

さらに Dip5 のエンドサイトーシスは、栄養源応答に中心的な役割を果たす TORC1 経路の阻害剤であるラパマイシン処理によっても誘導されること、これにも Aly2 が必要であることを示している。TORC1 下流のキナーゼ Npr1 の遺伝子破壊株では Dip5 のエンドサイ

トーシスがラパマイシン処理によって正常に誘導されないことより、TORC1 が Npr1 を介して Dip5 のエンドサイトーシスを制御することを示している。また Aly2 の量がラパマイシン処理によって Npr1 依存的に増加することを見出している。さらに Aly2 の過剰発現は Dip5 のエンドサイトーシス誘導に十分であることを示し、従ってラパマイシン処理によって起こる Aly2 量の増加は Dip5 のエンドサイトーシス誘導に寄与していると結論づけている。

次に単一の細胞で Dip5 の局在を経時的に観察した結果より、M 期に集中してエンドサイトーシスされていることを示している。また Aly2 の量が M 期に増加することを見出している。さらに Aly2 の M 期特異的なリン酸化を見出している。以上から Aly2 は M 期特異的に量が増えるとともにリン酸化を受け、それが Dip5 のエンドサイトーシス誘導に寄与していると結論づけている。

考察の章では以上の結果を踏まえ、エンドサイトーシスの個別制御とグループ制御という概念を提唱している。過剰量の基質が存在する際には対応するトランスポーターが特異的にアレスチン様タンパク質との結合が促進される（個別制御）のに対し、広い意味での栄養源飢餓（TORC1 阻害）や細胞周期の進行に対してはアレスチン様タンパク質自体の機能が制御されることで、それが選択的に標的とする細胞膜タンパク質のエンドサイトーシスが一括して制御される（グループ制御）という状況に応じた制御機構の使い分けが合目的的であると論じている。

以上、本研究では Aly2 の機能解析を通して、エンドサイトーシスの積み荷選択性の分子基盤と環境に応答した制御機構の一端を明らかにすることに成功しており、学術上、応用上貢献するところが少なくない。従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。