

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	野村 亘
論文題目	Methylglyoxal-induced activation of protein kinase C through phospholipase C and TORC2 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> におけるホスホリパーゼCとTORC2を介したメチルグリオキサールによるプロテインキナーゼCの活性化機構)		
(論文内容の要旨)			
<p>メチルグリオキサール (MG) は解糖系から派生する2-オキソアルデヒドである。従来から高濃度のMGは、あらゆる細胞の増殖を停止させることが知られている。本論文では、そのメカニズムの解明を目的として出芽酵母<i>Saccharomyces cerevisiae</i>をモデル生物として解析を行った。本論文の内容は以下のように要約できる。</p>			
<ol style="list-style-type: none">1. 本論文ではまず、MGがタンパク質合成に及ぼす影響について検討した。MGによるタンパク質合成の阻害機構について、翻訳開始因子eIF2αに注目して解析した結果、MGはeIF2αキナーゼであるGcn2を活性化し、eIF2αのリン酸化を介してタンパク質合成を減衰させることを明らかにした。また、bZIP転写因子Gcn4はアミノ酸枯渇などのストレス条件下での遺伝子発現に関与するが、低濃度MGへの曝露により細胞が獲得するMGに対する適応にGcn4が重要な役割を担うことが分かった。2. 一般的に、Gcn2の活性化にはアミノアシル化されていないtRNA (uncharged tRNA)が必要とされているが、MGはuncharged tRNAレベルの上昇を引き起こすことなくGcn2を活性化し、翻訳開始因子eIF2αのリン酸化を引き起こすことを見いだした。一方、rapamycinによるタンパク質合成阻害も、uncharged tRNAレベルの上昇を伴わないeIF2αのリン酸化を介した機構である。しかしながら、MGはrapamycinとは異なり、TORC1(target of rapamycin complex 1)経路の不活性化を引き起こさなかったことから、MGによるGcn2の活性化機構はTORC1経路に非依存的であることを示した。3. MGによる増殖停止に関し、オルガネラの輸送を伴う極性成長に着目した。<i>S. cerevisiae</i>では細胞増殖の際に母-娘細胞方向に極性が形成される。この極性成長に伴い、母細胞から娘細胞へのオルガネラの輸送が起こる。本論文では、MGが核の輸送、すなわち核分裂を阻害することを見いだした。極性成長ならびにオルガネラの娘細胞への輸送には、アクチン細胞骨格が重要であることから、MGがアクチン細胞骨格に及ぼす影響を検討した。その結果、MGはアクチン細胞骨格の脱極性を引き起こし、細胞の極性を消失させた。さらに、酵母CキナーゼであるPkc1のドミナントポジティブ型変異体 (Pkc1^{R398P}) の発現は、MGによるアクチン細胞骨格の脱極性を抑圧し、MG存在下での核分裂を回復す			

ることを見いだした。また、MGがサイクリン依存性キナーゼCdc28のTyr19のリン酸化を出芽酵母Wee1キナーゼであるSwe1依存的に引き起こすことを見いだした。Swe1欠損株ではMG存在下での核分裂が回復したことから、Cdc28のリン酸化がMGによる核分裂阻害に関与することを明らかにした。Swe1欠損株にPkc1^{R398P}を発現させることで、MG存在下での核分裂がさらに回復したことから、MGによる核分裂の阻害機構においてPkc1とCdc28は独立に作用することを示した。MGは核以外のオルガネラの娘細胞への輸送には影響を与えなかったことから、MGが核分裂を特異的に阻害した要因について検討を行った。その結果MGは、染色体分配に重要なスピンドル極体の正しい配向性を決定する因子の一つであるKar9の局在変化を引き起こし、スピンドル極体の配向性を崩壊することを見いだした。

4. アクチンの組織化に関与するPkc1-Mpk1経路へのMGの影響を検討した。その結果、MGはMAPK(mitogen-activated protein kinase)であるMpk1のリン酸化を引き起こすことを見いだした。MGによるMpk1のリン酸化は、Mpk1 MAPKカスケードの構成成分、ならびにPkc1の欠損により起こらなくなったことから、MGはPkc1-Mpk1 MAPKカスケードの活性化を引き起こすことを示した。さらに、MGによるPkc1-Mpk1 MAPKカスケードの活性化機構は、既知の経路とは異なり、ホスホリパーゼC、ならびにTORC2 (target of rapamycin complex 2)を介した新奇な経路であることを明らかにした。MGによるホスホリパーゼCならびにTORC2を介したPkc1-Mpk1経路の活性化には、Pkc1のジアシルグリセロール結合領域に含まれる四つのCys (Cys442、Cys445、Cys512、ならびにCys515)、およびTORC2による推定リン酸化部位 (Thr1125とSer1143) が重要であることを見いだした。また、Pkc1ならびにMpk1欠損株は高いMG感受性を示したことから、Pkc1-Mpk1経路はMGへの耐性獲得に必要であることを明らかにした。さらに、Pkc1のThr1125のリン酸化を模倣したGlu置換体 (Pkc1^{T1125E}) ではMpk1の基礎リン酸化レベルが上昇し、野生株に比べ高いMG耐性を示すことを見いだした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせ

て、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は解糖系で生成されるにもかかわらず、細胞の増殖を阻害するメチルグリオキサール (MG) の増殖阻害機構について、出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* をモデル生物として解析したものである。評価される点は以下のとおりである。

1. MGによる細胞の増殖阻害の一つの要因として、本論文ではMGが翻訳開始因子であるeIF2 α のリン酸化を介してタンパク質の合成を減衰させることを明らかにした。さらに、低濃度MGでの前処理によって獲得されるMGに対する適応には、bZIP転写因子Gcn4が重要な役割を担うことを明らかにした。
2. MGによるキナーゼGcn2の活性化を介したeIF2 α のリン酸化機構は、TORC1経路に非依存的であることを明らかにした。
3. MGがサイクリン依存性キナーゼであるCdc28のリン酸化を引き起こすことを明らかにした。また、MGはアクチンの脱極性を引き起こし、核の娘細胞への輸送(核分裂)を特異的に阻害することを見いだすと同時に、MGによる核分裂の阻害にCdc28のリン酸化も関与することを明らかにした。さらに、MGが核の娘細胞への輸送を特異的に阻害する一つの要因として、スピンドル極体の配向性に関与するKar9の局在性への影響があることを明らかにした。
4. MGがアクチンの脱極性を引き起こしたことから、アクチンの組織化に関与するPkc1-Mpk1 MAPKカスケードに注目した結果、MGがMpk1-MAPKカスケードの活性化をPkc1依存的に引き起こすことを明らかにした。MGによるMpk1-MAPKカスケードの活性化機構の解析の結果、MGが新奇な経路でPkc1の活性化を引き起こすことを明らかにし、上流因子としてホスホリパーゼC、ならびにTORC2が関与することを見いだした。さらに、Pkc1-Mpk1経路の因子の欠損株を用いた解析から、Pkc1-Mpk1経路がMGへの耐性獲得に必要であることを示した。

以上のように本論文は、MGのタンパク質合成、細胞周期、ならびにアクチン組織化に関与するシグナル伝達経路への影響を明らかにするとともに、ホスホリパーゼCとTORC2が関与する新奇なPkc1-Mpk1 MAPKカスケードの活性化機構を見いだしたものであり、微生物分子生物学、分子細胞生物学、ならびに細胞生化学の発展に寄与するところが大きい。

よって、本論文は博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、平成22年2月18日、論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果、博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認められた。

注) Webでの即日公開を希望しない場合は、以下に公開可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降