

氏名	たの うえ だい すけ 田 上 大 祐
学位(専攻分野)	博 士 (生命科学)
学位記番号	生 博 第 50 号
学位授与の日付	平成 17 年 7 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	生命科学研究科高次生命科学専攻
学位論文題目	酵母 Ypk1/Sli2 の下流シグナルの解析に関する研究

論文調査委員 (主査) 教授 小堤保則 教授 山本憲二 教授 根岸 学

論 文 内 容 の 要 旨

プロテインキナーゼ(キナーゼ)は真核生物における多種多様なシグナル伝達経路に関与しており、ホスファターゼと共役して働くことで、遺伝子発現、細胞骨格形成、細胞接着、細胞周期の進行、そして細胞分化などの細胞内現象を制御している。申請者の研究室によって、免疫抑制物質 ISP-1 の耐性遺伝子として単離された *YPK1/SLI2* はセリン/スレオニンキナーゼをコードしており、Ypk1 は酵母 AGC キナーゼファミリーに属していることが知られている。そして、ISP-1 が細胞内スフィンゴ脂質量を減少させることによって細胞死を誘導することから、Ypk1 はスフィンゴ脂質シグナル伝達経路に関与しているキナーゼであると考えられている。

この Ypk1 の属する AGC キナーゼファミリーは、その内部に高度に保存された 2ヶ所のリン酸化サイトを共通して持つことが知られており、一方は T-loop として知られている activation loop 内に、そして、もう一方は C 末端の hydrophobic motif 内に存在している。そして、これら 2ヶ所のリン酸化サイトが共にリン酸化されることによって、Ypk1 はその最大活性を得ることが想定されている。しかし、Ypk1 を含む AGC キナーゼ全般において、hydrophobic motif site のリン酸化による活性化を通じた下流シグナルの関連性は解明されていない。そのため、下流シグナルイベントとして、細胞増殖、エンドサイトーシス、ISP-1 耐性、といった複数のイベントを持つことが既に明らかにされている Ypk1 は、hydrophobic motif site を通じた下流シグナルイベントの関連性を解明するための非常に有効なモデルであると考えられる。

そこで、hydrophobic motif 内リン酸化サイトの機能解析を行うために、まず、点変異の導入によって、リン酸化サイトの Thr を Glu に置換することでリン酸化を模倣した変異体、または Ala に置換することで非リン酸化を模倣した変異体を作製した。そして、その他に知られている Ypk1 変異体である、キナーゼ機能欠損変異体、エンドサイトーシス機能欠損変異体、そしてもう一方のリン酸化サイトである activation loop 内へのリン酸化、非リン酸化を模倣した変異体を作製し、それぞれの Ypk1 変異体を *ypk1* 欠損株にて強制発現させた。この *ypk1* 欠損株はそのフェノタイプとして、細胞増殖抑制、エンドサイトーシス抑制、ISP-1 感受性が知られているため、それらの状態を調べることで、導入した Ypk1 変異体の持つ機能解析を行った。

その結果、hydrophobic motif 内リン酸化サイトの非リン酸化を模倣した Ypk1 変異体は、*ypk1* 欠損株の細胞増殖抑制、及びエンドサイトーシス抑制を回復できるが、ISP-1 感受性は回復できないことが分かった。この結果より、hydrophobic motif 内リン酸化サイトへのリン酸化は、細胞増殖やエンドサイトーシスには必ずしも必要ではなく、ISP-1 耐性に対してのみ必須であることが推測された。そして、この結果は、Ypk1 の下流に存在する 3つのイベントの内、ISP-1 耐性イベントが他の 2つのイベントとは異なる活性化経路を持つ可能性を示唆するものと考えられる。また、今回得られた *ypk1* 欠損株の復帰変異株である *ypk1* 欠損 (rev) 株の解析により、*ypk1* 欠損 (rev) 株は *ypk1* 欠損株の細胞増殖抑制のみが回復していること、また、Ypk1 の下流シグナルに位置するとされている Exg1 の強制発現による解析によって、Exg1 は *ypk1* 欠損株の細胞増殖抑制のみを一部回復できることが分かった。この結果から、Ypk1 の下流に存在する 3つのイベントの内、

細胞増殖イベントが他の2つのイベントとは異なる活性化経路を持つ可能性が示唆された。

hydrophobic motif内リン酸化サイトは、未だその上流キナーゼが同定されておらず、activation loop内リン酸化サイトに比べて、その機能や下流シグナルとの関連性の解析が遅れているが、ここで得られた結果は、AGCキナーゼの活性化、及び下流シグナルとの関連性を解明するための有用な知見であると考えられ、哺乳動物細胞におけるスフィンゴ脂質シグナル伝達経路の観点からも、今後の更なる発展が期待される。

論文審査の結果の要旨

近年スフィンゴ脂質は細胞増殖やエンドサイトーシス等のシグナル伝達において重要な役割を持つことが明らかにされている。申請者の所属する研究室では、これまでに免疫抑制物質であるISP-1を、細胞内スフィンゴ脂質を減少させるツールとして用い、スフィンゴ脂質シグナル伝達経路に関連する遺伝子の単離を行ってきた。

これらの遺伝子の中、SLI2は遺伝子配列解析の結果YPK1として知られている遺伝子と同一であった。YPK1はAGCキナーゼファミリーに属する分子量約76kDaのヤリン/スレオニンキナーゼをコードしている。AGCキナーゼファミリーは、その内部に高度に保存された2ヶ所のリン酸化部位を共通に持つことが知られている。2ヶ所のリン酸化部位の一方はactivation loop内に、もう一方はC末端のhydrophobic motif内に存在する。

AGCキナーゼファミリーには哺乳動物細胞におけるPKB, SGK, PKCなどが属しており、様々な観点からその機能解析がなされているが、これらのリン酸化部位と下流シグナルとの関連は十分には明らかにされていない。申請者は下流シグナルイベントとしてISP-1耐性、細胞増殖、エンドサイトーシスの3つを持つことが知られている酵母Ypk1を用いて、そのリン酸化部位変異体を作製し、リン酸化と下流シグナルとの関連を明らかにした。評価すべき点は以下の通りである。

1. Ypk1のhydrophobic motif内のリン酸化部位における非リン酸化体を模倣したT662Aの強制発現は、*ypk1*欠損株に見られる表現型の内、細胞増殖抑制及びエンドサイトーシス抑制を回復するが、ISP-1耐性は示さないことを明らかにした。また、その強制発現は、野生株酵母のISP-1への感受性を逆に高めることを示した。これらの結果により、hydrophobic motifのリン酸化は、Ypk1の下流シグナルの内、ISP-1耐性にのみ必須であることが明らかにされた。このことはISP-1耐性を獲得する経路が他の細胞増殖やエンドサイトーシスとは異なることを示唆している。

2. *ypk1*欠損株の中から細胞増殖抑制が回復している復帰突然変異株を得た。この復帰突然変異株はISP-1耐性及びエンドサイトーシスに対して、*ypk1*欠損株と同様の表現型（ISP-1に対する高感受性、エンドサイトーシス抑制）を示すことを明らかにした。これらの結果は、Ypk1下流シグナルの内、細胞増殖に関する経路が他のISP-1耐性やエンドサイトーシスとは異なることを示唆している。

これらの研究は、AGCキナーゼであるYpk1の下流シグナルにおけるリン酸化部位の役割に新たな知見を与えるとともに、スフィンゴ脂質の関与したシグナル伝達に有用な情報を提供するものであると考えられる。

以上より本論文は博士（生命科学）の学位論文として価値あるものと認めた。更に、平成17年5月23日、論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果合格と認めた。