

学位審査報告書

（ふりがな） 氏名	たるもと ゆうすけ 樽本 雄介
学位（専攻分野）	博士（生命科学）
学位記番号	論生博第 号
学位授与の日付	平成 25 年 9 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
（学位論文題目） 分裂酵母を用いた低容量ストレス応答機構の解析	
論文調査委員	（主査） 石川 冬木 教授 西田 栄介 教授 上村 匡 教授

(続紙 1)

京 都 大 学	博 士 (生 命 科 学)	氏 名	樽 本 雄 介
論 文 題 目	分 裂 酵 母 を 用 いた 低 容 量 ス ト レ ス 応 答 機 構 の 解 析		
(論 文 内 容 の 要 旨)			
<p>生物は、生体内外の環境変化を要因とする種々のストレスにさらされている。そのようなストレスの多くは、種類や強度が時間とともに変動し、単独では細胞が明確な表現型を示さない低容量のものである。しかし、従来の研究は、細胞死などの表現型観察が容易な比較的高容量のストレスを用いた解析が多く、低容量ストレス応答の分子機構の研究は進んでいない。細胞が備える適応応答の1つとして、低容量ストレスにさらされた細胞が、一過的に異なる種類の高容量ストレスに抵抗性を獲得する現象は、交差耐性として知られている。変動する環境への応答であるこの現象の分子機構は不明な点が多いが、低容量ストレス応答の表現型を、続く高容量ストレスへの抵抗性として客観的に観察できることから、申請者は、本現象を低容量ストレス応答のモデル実験系として利用した。</p> <p>本研究で、申請者はまず、分裂酵母を用いた交差耐性に欠損を示す変異株のスクリーニング系を構築し、交差耐性に重要な因子の1つとしてCpc2を同定した。Cpc2は真核生物間で高度に保存された蛋白質であり、シグナル伝達時の足場蛋白質として機能すること、翻訳制御に関与することが他の生物種の解析により報告されている。cpc2破壊株に様々な強度のストレスを処理したところ、比較的低容量のストレスに対して感受性が高かったことから、本研究で企図されている交差耐性を指標とした低容量ストレス応答解析が有効であることが示唆された。次に、Cpc2がストレス応答に機能する分子機構を検討するため、まず、アミノ酸飢餓ストレス応答を中心とした翻訳制御機構の解析を行った。ストレス誘導性の翻訳開始因子eIF2αのリン酸化は、細胞全体の翻訳量を減少させると同時に、ストレス応答に必要な蛋白質の翻訳効率上昇を引き起こす。申請者は、cpc2破壊株がeIF2αキナーゼであるGcn2の活性化(自己リン酸化)に欠損を示すこと、それによってリン酸化eIF2αの減少、アミノ酸飢餓ストレス感受性といった表現型を示すことを明らかにした。これらの結果から、申請者は、Cpc2はGcn2の制御を介して、ストレス応答時の翻訳調節に重要であると結論づけた。Cpc2とeIF2αキナーゼは、哺乳類においても保存されている。従って、申請者は、本研究の成果が、哺乳類細胞における低容量ストレス反応の分子機構の解析に貢献する可能性があることを指摘している。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、四章から構成されており、第一章序論においては、本研究で解析されている交差耐性について紹介した後、これまでに、研究が進んでいるストレス反応であるeIF2 α キナーゼによる翻訳制御について述べている。第二章において、本研究で用いられた実験材料・方法を述べた後、第三章結果において、本研究で得られた実験結果を記載している。すなわち、分裂酵母変異株の網羅的スクリーニングによって、交差耐性に異常を示す変異体の原因遺伝子として*cpc2*が同定されたこと、Cpc2がアミノ酸飢餓等のストレスによるeIF2 α キナーゼGcn2の活性化に重要であることを明らかにした。また、分裂酵母Gcn2の活性化機構を詳細に解析し、その818番目および823番目アミノ酸であるスレオニンの自己リン酸化が活性化に必要であることを見いだした。さらに、リン酸化スレオニン818を特異的に認識するモノクローナル抗体を作成し、アミノ酸飢餓によって誘導される同スレオニンのリン酸化が、野生株に比べて*cpc2*欠損株では著しく低下していることを明らかにした。申請者は、分裂酵母より調製したリボソームを、ショ糖密度勾配遠心法を用いて分画し、Gcn2がリボソームに結合することを生化学的に明らかにした。さらに、このリボソームとGcn2の相互作用は、野生株と*cpc2*欠損株のあいだで差が見られなかったことから、*cpc2*欠損株におけるGcn2の活性化阻害は、Gcn2とリボソームの結合制御を介しているのではないことを示唆した。第四章においては、以上の実験結果をもとに、低容量ストレス反応としてのCpc2の役割に関する考察を行っている。近年、Cpc2/RACK1は、リボソーム結合蛋白質としての機能が重視されていることから、eIF2 α リン酸化に関するCpc2の役割が、リボソーム上にあるGcn2を直接的に制御する可能性をあげている。一方、リボソームと独立してCpc2/RACK1が機能していることを示す報告もあることから、Gcn2が一過的にリボソームから解離した後にCpc2の制御を受ける可能性があることも指摘している。さらに、申請者は、*cpc2*欠損株が、交差耐性のみならず、長期間にわたる低強度ストレスに対して感受性を高いことも明らかにしており、本研究で示された低容量ストレス反応機構が、長期にわたる環境変動においても重要な役割を果たしている可能性を指摘している。

低線量放射線の生体効果、ホルメーシス現象など、低容量ストレスに対する生体反応の理解は重要でありながら、ほとんど何も知られていない。本研究は、その一端を遺伝子レベルで明らかにしたものであり、分裂酵母のみならず、ヒトを含めた多くの生物における低容量ストレス反応の分子機構の解明に資するものである。

以上のことから、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。また、平成25年7月29日に論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、申請者を合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成 年 月 日