

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	真田光彰
論文題目	Studies on the mechanisms of Gts1p-mediated cell aggregation and heat tolerance in yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> においてGts1pが引き起こす細胞凝集と熱耐性機構についての研究)		
(論文内容の要旨)			
<i>Gts1</i>は、酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> において、代謝リズムの制御、細胞凝集、熱耐性の獲得、タンパク質凝集などの多面的現象に関与する時計遺伝子であると推定されている。これまで、<i>Gts1</i>の誘導発現が引き起こす幾つかの現象に関してその生理的機能の解析が行われていたが、分子レベルでの詳細な解析は行われてこなかった。本研究では、この<i>Gts1</i>の誘導発現による多面的現象の生成メカニズムを、分子レベルで解析した。			
1. <i>Gts1</i> の誘導発現によるTup1/Cyc8の機能阻害とSwi/Snfによる遺伝子転写活性化機構			
DNAマイクロアレイによる網羅的な転写解析を行ったところ、<i>Gts1</i>の誘導発現により過剰生産されたGts1pにより転写活性化される遺伝子の多くが、通常の生育条件下で転写抑制因子Tup1/Cyc8により転写抑制されていることが予測された。そこで、アガロースゲル電気泳動を用いた解析を行ったところ、Tup1/Cyc8のサブユニットCyc8pが、Gts1pにより形成されるタンパク質凝集体に巻き込まれて、Tup1/Cyc8の機能が阻害され、転写活性化されていることを明らかにした。			
次に、<i>Gts1</i>の誘導発現による多面的現象の一つである細胞凝集と、クロマチンの構造変化（クロマチンリモデリング）の相関について解析した。遺伝子破壊がGts1pの引き起こす細胞凝集に与える影響を検証したところ、Gts1pによって転写活性化されていた<i>FL01</i>遺伝子が細胞凝集に必須であることがわかった。さらに、Micrococcal nuclease assayによってクロマチン構造を解析した結果、Gts1pは、クロマチン構造変換因子Swi/Snf依存的にクロマチンの構造変化を引き起こし、<i>FL01</i>遺伝子を転写活性化していることがわかった。			
2. Gts1pと相互作用するSsa1pとSsa2pを介して制御される熱耐性獲得機構			
熱耐性獲得は、<i>Gts1</i>の誘導発現による多面的現象の一つである。しかし、実際にGts1pと相互作用し、熱耐性獲得に関与する因子の存在は知られていなかった。そこで、免疫沈降法によってGts1pと新規に相互作用する因子を探索した結果、ヒートショックタンパク質70ファミリーのSsa1pとSsa2pを同定した。			
<i>SSA1</i>、<i>SSA2</i>それぞれ単独の破壊株において熱耐性は見られなかったが、二重破壊株ではGts1pによる顕著な熱耐性の向上が見られた。Ssa1pとSsa2pは、互いにアミノ酸配列において99%の相同性を持つホモログであり、重複した機能を持つと考えられる。そのため、Ssa1pとSsa2pのタンパク質の総量が、Gts1pの機能制御の強さに関係していると考えられた。そこで、<i>GTS1</i>を誘導発現した際のSsa1pとSsa2pのタンパク質量変化を、Western blottingで解析した結果、<i>SSA1</i>、<i>SSA2</i>それぞれの単独の破壊株で			

は、破壊された遺伝子のもう一方のホモログ（*SSA1*破壊ならば*Ssa2p*）のタンパク質量が顕著な増加を見せ、遺伝子破壊の影響を互いに補っていることを明らかにした。これらの結果から、*Ssa1p*と*Ssa2p*は互いに補完的に機能しながら、その*Gts1p*との相互作用を介して、酵母の熱耐性機構を制御していることを明らかにした。

3. *Gts1p*が形成するタンパク質凝集体の活性酸素発生とアポトーシスへの影響

アガロースゲル電気泳動を用いた解析の結果、*Gts1p*のPolyQ配列を欠失させた時、そのタンパク質凝集体の形成が抑制されたことから、*Gts1p*のタンパク質凝集体形成がPolyQ配列依存的であることを示した。さらに、*Gts1p*のタンパク質凝集体画分には、ヒートショックタンパク質、ミトコンドリアタンパク質、細胞質の翻訳伸長因子が取り込まれていたことから、*Gts1p*とアポトーシスとの関連性についてさらに検討した。*GTS1*の誘導発現株においては活性酸素量やアポトーシス発生率が上昇していたが、PolyQ配列を欠失させた株では親株と同程度までこれらの値が低下していた。この結果から、*Gts1p*のタンパク質凝集体に他のタンパク質が巻き込まれ、巻き込まれたタンパク質本来の機能が喪失し、その結果、活性酸素量やアポトーシス発生率が増大していることがわかった。

*Gts1p*のタンパク質凝集体画分に含まれていたミトコンドリアタンパク質*Yhb1p*と*Por1p*に着目して解析を行った。*YHB1*破壊株において*GTS1*を誘導発現すると、親株の場合と比較して、アポトーシス発生率や活性酸素量の顕著な増大が見られた。一方、*POR1*遺伝子は、破壊するだけで活性酸素量が顕著に増大していた。これらの結果から、*Gts1p*の引き起こす活性酸素量やアポトーシス発生率の増大に対して*Yhb1p*は防御的に働き、一方、活性酸素発生を抑制すると推察される*Por1p*は、*Gts1p*のタンパク質凝集体に取り込まれることで、その機能が阻害されていることが示唆された。

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。

(論文審査の結果の要旨)

Gts1pは、酵母*Saccharomyces cerevisiae*において、代謝リズム、細胞凝集、熱耐性の獲得、タンパク質凝集などの多面的現象をもたらすタンパク質である。本研究は、網羅的な転写解析に加え、タンパク質間相互作用に着目した分子レベルでの解析によって、Gts1pによる多面的現象の生成メカニズムの解明を行ったものである。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. DNAマイクロアレイによる網羅的な転写解析と、核内の相互作用の解析によって、Gts1pの形成するタンパク質凝集体が転写抑制因子Tup1/Cyc8を巻き込むことでその機能を阻害し、クロマチン構造変換因子Swi/Snf依存的にクロマチンの構造変化を引き起こしていることを示した。さらに、このクロマチンの構造変化が、Gts1pの多面的現象の一つである細胞凝集を引き起こしていることを示した。
2. 免疫沈降法により、ヒートショックタンパク質70ファミリーのSsa1pとSsa2pがGts1pと相互作用することを示した。さらに、Western blottingによるタンパク質量の解析によって、Ssa1pとSsa2pは、Gts1pの関与する熱耐性を互いに補完的に制御していることを示した。
3. タンパク質凝集体の解析により、Gts1pがそのアミノ酸配列中に含まれるPolyQ配列依存的にタンパク質凝集体を形成し、活性酸素量やアポトーシス発生率を増大させていることを示した。さらに、*GTS1*の誘導発現株における活性酸素量やアポトーシス発生率の増大は、Gts1pによって形成されるタンパク質凝集体に、ミトコンドリアタンパク質のPor1pとYhb1pが巻き込まれ、巻き込まれたタンパク質の機能が喪失した結果で起こる現象であることを示した。

以上のように本論文は、クロマチンの構造変化に依存する細胞凝集、酵母の熱耐性獲得、アポトーシスに至る多面的な現象の全てが、*Gts1*の誘導発現によるGts1pの形成するタンパク質凝集体に巻き込まれた、種々の活性タンパク質の機能・活性喪失に起因する現象であることを分子レベルで示したものであり、応用微生物学、制御発酵学および生体高分子化学に寄与することが大きい。

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23年4月14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