

京都大学	博士（生命科学）	氏名	村井朋香
論文題目	Genetic Dissection of the Signaling Pathway Regulating the Nutrient Response by the use of the Dominant Active Mutants of Rheb GTPase —the Branches of the Signaling Pathway below Rheb— (優性活性型変異Rheb GTPaseを用いた栄養応答シグナル伝達経路の遺伝学的解析 —Rhebの下流でのシグナル伝達経路の分岐—)		
(論文内容の要旨)			
栄養源が枯渇すると、生物は矮小化や休眠により、飢餓状態に耐える。また、栄養源枯渇が配偶子形成の引き金になり、次世代へ子孫を継承する場合もある。このように、生物は晒された環境に対応するために劇的な変化を引き起こす。そのメカニズムのひとつがTsc-Rheb-Tor経路による細胞内のシグナル伝達である。この経路はインスリン刺激によって細胞成長の誘導と栄養飢餓応答の抑制を促すシグナルを細胞内に伝達する。また細胞外アミノ酸濃度の変化に対してもこの経路が働くことが報告されている。RhebはRasファミリーの低分子量GTPaseであり、このシグナル伝達経路のON/OFFをつかさどる分子スイッチとして機能する。この経路は生命維持に非常に重要な経路であるにも関わらず、Rhebの上流・下流のシグナル伝達メカニズムについては未解明な点が多い。そこで、遺伝子操作が容易な分裂酵母をモデル生物として用い、Rhebを取り巻くシグナル伝達経路の解明を目的として研究を行った。 点変異導入法により、Rhb1(Rhebの分裂酵母ホモログ)の優性活性型変異体(Dominant Active mutant)を作製した。優性活性型変異体とは、低分子量GTPaseが恒常的に活性型として機能する変異体である。カナバニンという生育阻害剤を用いたスクリーニングにより、2種類の変異体 <i>rhb1-DA4</i>, <i>rhb1-DA8</i> を単離することに成功した。<i>rhb1-DA4</i>は、Rhb1のGTP/GDP結合に関わる部位にある17番目のアミノ酸残基がバリンからアラニンに(V17A)変異していたことから、グアニンヌクレオチドの結合状態に関わらず常に活性型として機能すると予想された。この変異体では、アミノ酸豊富時のアミノ酸取り込み能の低下や、アミノ酸枯渇時の成長停止・減数分裂誘導の遅延が起こった。これらの異常はRhebのGAPであるTsc2の遺伝子破壊株でも同様に見られたことから、アミノ酸豊富時のアミノ酸取り込み抑制や、アミノ酸枯渇時の成長停止・減数分裂誘導はともに、RhebのGTPase活性によって制御される現象であることが示唆された。一方、<i>rhb1-DA8</i>はGTPaseのエフェクター結合に関わるとされている部位にある52番目のアミノ酸残基がグルタミンからアルギニンに(Q52R)、76番目がイソロイシンからフェニルアラニンに(I76F)置換された変異体であった。この変異体は<i>rhb1-DA4</i>同様、アミノ酸取り込み抑制には異常を示したが、<i>rhb1-DA4</i>で見られた成長停止・減数分裂誘導の異常は示さなかった。Rhb1はアミノ酸取り込みと、成長停止・減数分裂誘導を独立に制御していることが示唆された。成長停止・減数分裂誘導の制御にはRhb1の唯一既知の下流因子Tor2 (mTORの分裂酵母ホモログ)が関与することが報告されている。アミノ酸取り込みの制御におけるTor2とRhb1との遺伝学的相互作用を検証した結果、相互作用は認められなかった。さらに、哺乳類培養細胞を用いたRheb-DA4,Rheb-DA8のタンパク質の機能解析により、Rheb-DA4はmTORを恒常的に活性化する変異タンパク質であり、Rheb-DA8はmTORに対して異常な活性化を引き起こさないタンパク質であることが示された。 これらの結果より、Rhb1は、Rhb1を分岐点として複数の下流経路をそれぞれ独立に制御していることが示唆された。また、特にアミノ酸取り込みは、Tor2の活性化を伴わない、Rhb1の新規下流経路によって制御されていることが明らかとなった。			

(論文審査の結果の要旨)

申請者は、栄養応答について分裂酵母をモデル生物としたTsc-Rhb1-Tor2シグナル伝達経路の研究を行った結果、Rhb1の下流でのシグナル伝達経路の分岐を明らかにした。

Tsc-Rhb1-Tor2シグナル伝達経路において経路の活性のON/OFFを司る分子スイッチとしてはたらく低分子量GTPase Rhb1に、ランダムに変異を導入することによって優性活性型となる変異体をスクリーニングし、表現型解析を行った。その結果、得られた2種類の変異体の表現型が異なることがわかり、Rhb1は複数の下流経路を独立に制御している可能性が示唆された。さらに、Rhb1の既知の下流因子Tor2と、優性活性型Rhb1変異体が示す表現型との関係を遺伝学的に検証した結果、栄養源飢餓時の細胞成長・減数分裂誘導の制御にはRhb1によるTor2の活性が関与している一方で、アミノ酸取り込みはTor2を介さないRhb1の新規下流経路によって制御されていることが明らかになった。また、ヒト培養細胞を用いて変異Rhebタンパク質によるmTORの活性を評価した結果、分裂酵母を用いた表現型解析の結果と一致して、2種類の変異体によるmTORの活性は異なることがわかった。

申請者は、これまでにRhb1-Tor2を介した一本筋のシグナル伝達経路しか明らかにされていなかったTscの下流経路について、Rhb1の下流にTor2を介した経路だけではなくTor2を介さない新規経路が存在することを明らかにした。Tsc経路は、細胞外の栄養環境に応じて、細胞内でのタンパク質合成や代謝、オートファジーといった多岐に渡る適応反応を引き起こすための、生命維持に重要な経路であるが、Tscの下流でシグナル伝達経路がどのように分岐し、このような様々な応答を制御するのかはほとんど明らかになっていない。そのシグナル伝達経路の分岐において、新規下流経路を明らかにした本研究は、生物学的に非常に意義のあるものである。また、ヒトでは、TSC遺伝子の異常は皮膚や神経系に良性腫瘍を引き起こす結節性硬化症の原因となることが知られているが、Tscの下流経路に対する知見が乏しいためにその治療法はいまだ確立されていない。TSCの下流での新規経路の存在を明らかにした本研究は、治療の可能性を広げる上で医学的にも注目度が高く、意義のあるものである。

よって、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23年1月24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。

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： 年 月 日