

(別紙1)

論文内容の要旨

申請者氏名 大城 聡

細胞は生育環境における様々なストレスに応答して、適応するための機構を備えている。当研究室では真核生物のモデルであり、また各種発酵食品の製造に重要な出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を材料に、新しいストレス応答・適応の分子機構を明らかにすることを目的に研究を進めている。これまでに、高温・浸透圧ストレスに対して感受性を示す *Rsp5* 変異株 (*rsp5*^{A401E} 株) を取得し、*Rsp5* が細胞のストレス応答や耐性に重要な役割を担っていることを明らかにしてきた。また、ストレス下における *Rsp5* の機能を解析する過程で、*rsp5*^{A401E} 株の高温・塩化リチウム感受性を相補するマルチコピーサプレッサーとして、*POG1* (Promoter Of Growth) 遺伝子を単離している。しかしながら、*POG1* は一次構造上のオルソログが酵母にしか存在せず、その分子機構や生理的役割についてほとんど不明である。本研究では、ストレス下における *RSP5* と *POG1* の関係、および、*POG1* の分子機能と生理的役割を解析した。

酵母の野生型細胞においても *POG1* の過剰発現がストレス耐性を示すこと、および遺伝学的解析の結果から、*RSP5* と *POG1* は両者とも酵母のストレス応答に関与しているが、両遺伝子間に遺伝学的な相互関係はないと結論付けられた。次に、*POG1* 過剰発現株の表現型として報告されている「接合因子による G1 アレストの阻害」の確認を試みたが、再現性を得ることができなかった。一方で、興味深いことに、既知の報告とは逆に *POG1* の過剰発現株では細胞周期が G1 期で遅延することを見出した。また、*POG1* の過剰発現により、細胞が細長く伸長した形態異常を示すことも明らかにした。

次に、酵母ツーハイブリッド法を用いて *POG1* 産物 (Pog1) と相互作用するタンパク質として細胞周期のチェックポイントに関与しているユビキチンリガーゼ Dma2 を取得した。生化学的な解析から、Pog1 は Ser152 と Thr253 がリン酸化され、リン酸化された Thr253 が Dma2 の Forkhead-associated (FHA) ドメインと結合することを明らかにした。また、リン酸化予測プログラムにおいて、Cyclin-dependent kinase (CDK) が Thr253 をリン酸化することが示唆された。そこで、細胞周期依存的な Pog1 のリン酸化を解析した結果、G1 期で検出される Pog1 のリン酸化が細胞周期に伴って減少することが明らかとなった。また、Dma2 依存的に Pog1 の細胞内量が増加することも判明した。さらに、Pog1 は Dma2 との相互作用依存的にユビキチン化されること、および Dma2 が翻訳後修飾を介して Pog1 タンパク質量を制御している可能性が示唆された。

以上の結果から、*POG1* 遺伝子は細胞のストレス応答・適応に関与することが明らかとなった。また、Pog1 は細胞周期依存的にリン酸化され、リン酸化された Pog1 が Dma2 によって認識され、ユビキチン化された後、分解されるものと考えられた。さらに、Pog1 の生理的役割としては、リン酸化による修飾を介して細胞周期を制御することで、細胞のストレス応答・適応機構に関与している可能性が示された。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 大城 聡

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は発酵生産環境において、エタノール、浸透圧、冷凍、高温、乾燥、酸化等のストレスを複合的に受けている。申請者はユビキチンリガーゼ Rsp5 変異株 (*rsp5^{A401E}*) のストレス感受性を相補するマルチコピーサプレッサーとして単離した *POG1* 遺伝子の解析を行い、以下に示す新たな結果や重要な知見を得た。

- 1) 酵母の野生型細胞においても *POG1* の過剰発現がストレス耐性を示すこと、および遺伝学的解析の結果から、*RSP5* と *POG1* は両者とも酵母のストレス応答に関与しているが、両遺伝子間に遺伝学的な相互関係はないことを明らかにした。
- 2) *POG1* の過剰発現株では細胞周期が G1 期で遅延することを見出した。また、細胞が細長く伸長した形態異常を示すことも明らかにした。
- 3) 酵母ツーハイブリッド法を用いて、*POG1* 産物 (Pog1) と相互作用するタンパク質として細胞周期の制御に関与しているユビキチンリガーゼ Dma2 を取得した。
- 4) 生化学的解析、および LC-MS/MS 解析から Pog1 は Ser152 と Thr253 がリン酸化されること、また、Dma2 は Pog1 の Thr253 と相互作用することを明らかにした。
- 5) リン酸化予測プログラムおよび既知の報告から、Pog1 が Cyclin-dependent kinase (CDK) によってリン酸化される可能性を示した。また、G1 期で検出される Pog1 のリン酸化が細胞周期に伴って減少することを見出した。
- 6) Dma2 依存的に細胞内の Pog1 タンパク質量は変動することを見出した。また、Pog1 は Dma2 との相互作用依存的にユビキチン化されることを示唆する知見を得た。

申請者は、*POG1* 遺伝子がストレス応答・適応に関与することを明らかにした。また、G1 期にリン酸化された Pog1 がユビキチンリガーゼ Dma2 によって認識され、ユビキチン化された後、分解されることで、細胞内の Pog1 量が制御され、細胞周期の適切な進行に寄与するという Pog1 の新規な分子機能を提唱した。さらに、Pog1 の生理的役割として、リン酸化による修飾を介して細胞周期を制御することで、細胞のストレス応答・適応機構に関与している可能性を示した。細胞はストレス下で細胞周期を停止し、細胞がストレスに応答・適応できるようになると、再び細胞周期を進行することが知られている。*POG1* 過剰発現株が示すストレス耐性は、Pog1 が過剰蓄積していることで細胞周期を抑制し、予めストレスに応答・適応する機構が働いているためだと考えられる。したがって、Pog1 レベルや Pog1 の翻訳後修飾を人為的に制御することで、ストレス耐性の向上した有用な産業酵母が育種できる可能性が示された。

以上のように、本論文はこれまで機能未知であった *POG1* 遺伝子の分子機能および生理的役割の一端を明らかにしたものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。