






学位論文審査の結果の要旨

氏名	Dipali Rani Gupta
審査委員	主査 川向 誠 
	副査 中川 強 
	副査 森 信寛 
	副査 阿座上弘行 
	副査 戒能 智宏 
題目	Multistep regulation of protein kinase A upon glucose starvation in fission yeast
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>分裂酵母で栄養のシグナルは有糸分裂で生育するかあるいは減数分裂に入るかどうかを決定する最も重要なシグナルカスケードの1つを構成している。栄養シグナルは2つのシグナルカスケードで成り立っている。1つはグルコース感知 cAMP-PKA 経路、もう1つは窒素感知 TOR 経路である。栄養が豊富な条件下(高グルコースあるいは炭素源)では、分裂酵母は有糸分裂での増殖を継続するが、栄養飢餓状態下では G1 期で細胞周期が停止し4つの一倍体胞子を形成する過程へと進行していく。分裂酵母では cAMP-PKA 経路は減数分裂を負に制御している。cAMP 依存的プロテインキナーゼの触媒サブユニット (Pka1)は減数分裂の開始を制御している重要な転写因子である Ste11 の発現を誘導する転写因子 Rst2 をリン酸化する。一方、PKA の調節サブユニットである <i>cgs1</i> の破壊は分裂酵母の性分化を負に制御している。以前に栄養豊富な培地上で胞子形成する表現型を持つ9つの <i>sam</i> 変異体が単離されている。しかしながら、これまでこれらの変異体は完全に解析されていない。</p> <p>申請者は <i>sam</i> 変異遺伝子を同定するため、性分化に関与する可能性のある遺伝子の塩基配列を解析した結果、<i>sam6</i> 変異体を同定した。すべての <i>sam</i> 変異体が 1M KCl に感受性であり <i>pka1</i> 破壊株のように栄養豊富な培地上で高効率の接合を示した。<i>sam</i> 変異体が <i>pka1</i> 破壊株と同様の表現型を持っていたため <i>sam</i> 変異体が <i>pka1</i> のアレルかどうかを調べることにした。劣性 <i>sam</i> 変異体における <i>pka1</i> 遺伝子の塩基配列決定によって <i>sam6</i> 変異体が <i>pka1</i> 遺伝子のキナーゼドメイン上にナンセンス変異があり、<i>sam6</i> 変異体の表現型が <i>pka1</i> 遺伝子の高発現によって抑圧されることが明らかになった。</p>	

申請者が *sam6* 変異体上での *pka1* 遺伝子を野生株 *pka1* 遺伝子に導入したところ、最終的に得られた株は *sam6* 変異体と同じ表現型を示した。このようなことから、*sam6* 変異体が *pka1* 遺伝子の変異によるものであると結論づけた。また、Pka1 タンパク質が低グルコース条件下(細胞内では低 cAMP)で PKA の調節サブユニットである Cgs1 と相互作用することを示した。加えて、Pka1 タンパク質がグルコース飢餓状態でリン酸化されていること、Pka1 のリン酸化は調節サブユニットである Cgs1 に依存していることを示した。Pka1 タンパク質はグルコース飢餓状態に入って 6～8 時間後に核から液胞に移動し、12 時間後には細胞質に存在していることを示した。このように、グルコース飢餓は細胞質での Pka1-Cgs1 複合体の形成によって Pka1 の活性を低下させ、分裂酵母での性分化を正に制御していることを証明した。

次に、申請者は他の 2 つの *sam* 変異体 (*sam5* 及び *sam7*) を同定した。*sam5* 及び *sam7* 変異体での *pka1* 遺伝子の塩基配列解析は Pka1 のキナーゼドメイン上のポイント変異 (G441E あるいは G441R) を含んでいることを明らかにした。これらの変異体で Pka1 タンパク質は正常に合成されていたが、グルコース飢餓状態で Rst2 と Ste11 が核に局在していたことから不活性化型であることを明らかにした。グルコース豊富条件下で不活性化型の Pka1 タンパク質は細胞質に存在しているが、野生型の Pka1 タンパク質は核に存在している。さらに、不活性化型の Pka1 タンパク質は Cgs1 と相互作用せず高リン酸化によって誘導される飢餓は阻害されている。これらのことから、このアミノ酸残基が調節サブユニット (Cgs1) に近い表面に存在し、核局在のために Pka1 タンパク質の活性化のために要求されることが示唆された。Pka1 の活性ループ領域の 356 番目のスレオニンのリン酸化が活性のために重要であることが、アラニンへのアミノ酸置換による研究から明らかになっている。申請者は、Pka1 での 356 番目のスレオニンのリン酸化を再解析し、このリン酸化が核への局在と Cgs1 との相互作用に重要であることを示した。また、申請者は Pka1 と Cgs1 の相互作用が起こってから Pka1 の高リン酸化が起こることを解明した。さらに、変異型 Pka1 はグルコース飢餓状態で Cgs1 と相互作用できないため高リン酸化されないことを明らかにした。

この学位論文で申請者は 3 つの劣性 *sam* 変異体を解析し、それらが *pka1* 遺伝子の変異によるものであることを同定した。これらの *sam* 変異体の解析は Pka1 の活性化が Pka1 の核局在のために重要であり、Cgs1 が Pka1 の高リン酸化のために必要であることを見いだした。Pka1 は分裂酵母でグルコースシグナルとリン酸化によって空間的で物理的に制御されていることを明らかにした。

以上の結果は分裂酵母のプロテインキナーゼ A の制御機構を示した優れた研究成果であり、本論文は博士 (農学) の学位論文に値すると認められる。