

論文内容の要旨

申請者氏名 立橋 祐樹

当研究室では、酵母 *Saccaryomyces cerevisiae* による醸造や製パンなどの発酵生産過程におけるプロリンの様々な有用性について報告してきた。 γ -グルタミルキナーゼ (GK) は生物に広く保存されており、その活性はプロリン合成の初発反応を担うとともに、プロリンによるフィードバック阻害を受けることで合成量を制御する重要な酵素である。酵母の GK は触媒活性を示す N 末端側のキナーゼドメイン、C 末端側の PseudoUridine synthase and Archaeosine transglycosylase (PUA) ドメイン、および両ドメインを繋ぐリンカー領域から構成されているが、キナーゼドメイン以外の領域の役割については不明である。PUA ドメインは、多くの生物に保存される RNA 結合ドメインの一つであり、RNA 修飾酵素や真核生物の翻訳開始因子などのタンパク質に多く見出されるが、酵母の GK における機能や意義については不明であった。そこで、本研究では、酵母における GK の分子機能とストレス耐性獲得機構に関する解析を行った。

まず、キナーゼドメイン以外の領域が GK の酵素機能に及ぼす影響を調べたところ、活性にはキナーゼドメインだけでなく、リンカー領域も必須であること、PUA ドメインは必須でないが、その欠失により $V_{\max}$ 値が野生型 GK の約 1% にまで低下することが見出された。また、PUA ドメインは基質との親和性やアロステリック性には顕著な影響を及ぼすことなく、反応速度の制御に重要な働きを示すことも明らかになった。

次に、プロリン合成を介したストレス耐性機構の解明のため、プロリン合成に関連する変異株を用いて、ストレス下における表現型を解析した。その結果、GK をコードする *PRO1* 遺伝子の破壊はストレスに感受性を示したが、GK の下流に位置するグルタミルリン酸レダクターゼをコードする *PRO2* 遺伝子の破壊は感受性を示さなかった。また、PUA ドメインの欠失によりストレス感受性が上昇したが、触媒活性の消失はストレス感受性に影響を及ぼさなかった。これらの結果から、GK を介したプロリン合成には依存せず、PUA ドメインが特異的に関与するストレス耐性機構の存在が示された。

さらに、遺伝学的解析の結果から、脱ユビキチン化酵素として様々な細胞機能の調節に関与する Ubp3-Bre5 複合体と GK の間に相互作用があることが見出された。Ubp3-Bre5 複合体は窒素飢餓時にリボソームの選択的オートファジー (リボファジー) を促進するため、GK がリボファジーに及ぼす影響を調べた。その結果、GK がリボファジーに必須であること、その進行の制御には触媒活性が関与する可能性が示された。

本研究では、遺伝学的小および生化学的解析によって、酵母の GK において、PUA ドメインを含む C 末端領域が触媒活性に及ぼす影響を明らかにした。また、酵母の GK は、触媒活性に依存しないストレス耐性機構、およびリボファジーに関与する機能を有していることが新たに判明した。これらの結果から、酵母の GK に関して、分子機能の全容解明に資する新規な知見を得ることができた。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 立橋 祐樹

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、醸造や製パンなどに用いられる重要な微生物であるが、発酵環境における様々なストレスによって優れた発酵力が制限されてしまう。したがって、酵母のストレス応答機構を解明することで、ストレス耐性と発酵力が向上した酵母の育種に資することが期待される。これまでに申請者の所属研究室では、プロリンがストレス下における細胞保護物質として機能することを報告してきた。

そこで本研究では、酵母におけるプロリン合成を調節する鍵酵素であるγ-グルタミルキナーゼ (GK) の機能に着目し、その役割が不明であった C 末端領域が GK の酵素機能に及ぼす影響、および GK が有する新規な生理機能について解析を行ない、以下に示す新たな知見や重要な結果を得た。

- 1) 遺伝学的解析から、GK の触媒活性には N 末端側のキナーゼドメインと C 末端側に存在する機能未知の PseudoUridine synthase and Archaeosine transglycosylase (PUA) ドメインを繋ぐリンカー領域も必須であることを明らかにした。
- 2) 酵素学的解析により、PUA ドメインは触媒活性に必須ではないが、高い活性を発現するために重要な役割を果たすことを見出した。
- 3) GK を介した新規なストレス耐性機構の存在を見出した。また、その機構には GK の触媒活性 (プロリン合成能) とは独立して、PUA ドメインの機能が特異的に関与することを明らかにした。
- 4) GK と遺伝学的な相互作用を示す新規な因子として、リボソームの選択的オートファジー (リボファジー) に関わる脱ユビキチン化酵素の「Ubp3-Bre5 複合体」を同定し、GK がリボファジーに必須であることを見出した。また、リボファジーの進行の制御には GK の触媒活性が関与している可能性が示された。
- 5) リボファジーに欠損を示す *UBP3* 遺伝子、*BRE5* 遺伝子の各破壊株、および *PRO1* 遺伝子の破壊株は窒素飢餓に対して高い感受性を示したことから、リボファジーが窒素飢餓時における細胞の生存に重要な機構であることが示唆された。

以上のように、本研究では、遺伝学的および生化学的な解析によって、酵母の GK においてその役割が不明であった PUA ドメインを含む C 末端領域が触媒活性に及ぼす影響を明らかにした。また、酵母の GK は、触媒活性に依存しないストレス耐性機構、およびリボファジーに関与することが示され、プロリン合成以外に新たな生理機能を有していることを初めて見出した。

本論文は、酵母におけるストレス応答機構の一端を明らかにした上で、アミノ酸代謝酵素が自らストレス応答・栄養応答の調節に関わるという新規性の高い現象を提唱するものであり、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。