

学位論文の要旨

ストレスに応答したリボソーム生合成調節機構に関する研究

広島大学大学院生物圏科学研究科
生物機能開発学専攻
学生番号 D146752
氏名 矢吹 友佳理

序論

細胞が正常に増殖するためには、染色体の複製だけでなく、細胞壁や細胞膜、細胞内小器官など細胞を構成する様々な成分がバランスよく合成される必要がある。リボソームは、生体内において蛋白質を合成する唯一の翻訳装置であるため、あらゆる生物が有している細胞内小器官である。細胞はリボソーム生合成に莫大なエネルギーを費やしていることから、その生合成量は他の細胞内制御機構と連携し、厳密に制御されていると考えられる。

出芽酵母において、出芽時の膜合成に必須な分泌経路が遮断されると、rRNA 遺伝子、ribosomal protein (RP) 遺伝子群および tRNA 遺伝子の転写が特異的に、かつ顕著に抑制される。この応答は分泌経路のどの段階が遮断されても誘導されること、さらに、unfolded protein response (UPR) の主要な制御因子である *IRE1* の遺伝子破壊によって影響を受けないことから、小胞体ストレス応答とは異なる制御であると考えられる。これまでに、本シグナル伝達に関与する因子として、細胞膜のセンサー蛋白質である Wsc (*Wsc1*, *Wsc2* および *Wsc3*) およびプロテインキナーゼ C (*Pkc1*) が同定されていることから、分泌経路の停止は細胞膜ストレスとして Wsc に感知され、そのシグナルが *Pkc1* 依存的に核内へと伝達されていると考えられているが、その詳細な機構は未だ明らかにされていない。

本研究では、分泌経路遮断時のシグナル伝達に関与する因子を探索することにより、分泌経路遮断時のシグナル伝達経路を解明することを目的とした。

1. 分泌経路遮断時のシグナル伝達におけるスフィンゴ脂質の機能解析

スフィンゴ脂質は主要な膜脂質の一つであり、その合成と代謝は分泌経路に依存する。分泌経路の停止によって膜成分が供給されなくなることが引き金となってシグナル伝達が誘導されるならば、本シグナルにおいて細胞膜におけるスフィンゴ脂質のバランスの維持が重要である可能性が考えられる。この可能性を検証するために、スフィンゴ脂質合成の各ステップにおいて機能する因子の遺伝子変異株を用いて、分泌経路遮断時のシグナル伝達への影響を調べた。その結果、スフィンゴイド塩基 (LCB) の合成を触媒する *Lcb1* の遺伝子変異によって分泌経路遮断時のシグナル伝達に欠陥が生じたのに対し、下流の複合スフィンゴ脂質合成を触媒する因子の遺伝子変異は分泌経路遮断時のシグナル伝達に影響を及ぼさなかった。このことから、分泌経路遮断時のシグナル伝達において、*Lcb1* によって合成される LCB あるいはセラミドが重要な機能をもつことが示唆された。

LCB は、セリン/スレオニンキナーゼである *Pkh1/2* を介して (1) target of rapamycin complex (TORC) 1 の下流エフェクター *Sch9*、(2) TORC2 の下流エフェクター *Slm1/2* および *Ypk1/2*、(3) *Pkc1* を制御することが知られている。*Pkc1* は前述のとおり、シグナル伝達に関与することが報告されている。そこで、他の LCB-*Pkh1/2* 経路の下流因子に着目した。その結果、*sch9* 破壊株および *slm1-1 slm2Δ* 株において分泌経路遮断時の RP 遺伝子の転写抑制が弱まっていたことから、*Sch9* および *Slm1/2* が分泌経路遮断時のシグナル伝達に関与することが示された。*Sch9* は TORC1 の下流エフェクターであり、リボソーム生合成、寿命およびストレス応答に機能する。TORC1 依存的なリン酸化部位に変異を持つ *Sch9* 発現株を用いた解析により、分泌経路遮断時のシグナル伝達には、TORC1-*Sch9* 経路の活性が必要であることが示唆された。TORC1 および *Sch9* は液胞膜上に局在することから、液胞から核へとシグナルが

伝達される経路の存在が示唆される。しかしながら、液胞と核が近接する領域である NVJ の形成に関与する因子は、分泌経路遮断時のシグナル伝達に関与しないことが示された。

Slm1/2 は脂質に結合する PH ドメインをもち、PI(4,5)P₂ によってその活性が制御される。PI(4,5)P₂ 合成に機能する Mss4 もシグナル伝達に関与することが示されたことから、分泌経路遮断時のシグナル伝達において、PI(4,5)P₂-Slm1/2 経路が関与することが示唆された。

以上の結果から、分泌経路遮断時のシグナル伝達に LCB-Pkh1/2 経路、TORC1-Sch9 経路および PI(4,5)P₂-Slm1/2 経路が関与することが示された。一方、TORC1 機能欠損株および *sch9* 変異株において、熱ストレスによる RP 遺伝子の転写抑制に影響は認められなかった。Pkh 蛋白質も熱ストレスによる RP 遺伝子の転写抑制に関与しないことが報告されている。このことから、LCB-Pkh1/2 経路および TORC1-Sch9 経路を介した RP 遺伝子の転写抑制は、分泌経路遮断時に特異的であることが示唆された。細胞が活発に増殖する条件において、TORC1-Sch9 経路は転写抑制因子の制御を介してリボソーム生合成を促進する。TORC1-Sch9 経路がリボソーム生合成を抑制する機構についてはこれまでに報告はなく、TORC1-Sch9 経路の新規のターゲットあるいは制御機構の存在が示唆される。

2. 分泌経路遮断時のシグナル伝達における細胞骨格制御因子の機能解析

LCB-Pkh1/2 経路を介した Slm1/2 および Pkc1 の制御は、アクチン細胞骨格およびエンドサイトーシスを制御する。さらに、Lcb1 は End8 としても知られるエンドサイトーシス関連因子である。そこで、分泌経路遮断時におけるエンドサイトーシス経路および細胞骨格制御因子の関与について検討した。その結果、エンドサイトーシス関連因子として知られる Sla2 (End4)、Rvs161 (End6) および Arc35 (End9) が分泌経路遮断時のシグナル伝達に関与することが示された。

Arc35 は、アクチン細胞骨格の組織化に重要な機能を持つ Arp2/3 複合体の構成因子であるだけでなく、カルモデュリン Cmd1、 γ -チューブリン Tub4 およびカゼインキナーゼ 2 (CK2) と協調的に微小管細胞骨格の制御にも機能することが報告されている。Arp2/3 複合体の他の構成因子である Arp2 および Arp3 が分泌経路遮断時のシグナル伝達に関与することが示された。さらに、Cmd1、Tub4 および CK2 もシグナル伝達に関与することが示された。これらの結果から、分泌経路遮断時のシグナル伝達において、Arc35 はアクチンおよび微小管の両方の制御系を介して機能することが示唆された。

Cmd1 および Tub4 は、SPB の構成因子としても知られている。SPB には、これまでにシグナル伝達に関与することが示されているリボソーム生合成調節蛋白質 Rrs1 および Ebp2 を核膜に繋ぎ止めている Mps3 が局在している。Rrs1 および Ebp2 は、主に核小体に局在してリボソーム生合成に機能するだけでなく、一部は Mps3 の N 末端領域との相互作用依存的に核膜縁にも局在し、テロメアの恒常性維持や核形態の維持にも機能する。このことから、分泌経路遮断時のシグナル伝達において、SPB が細胞質から核内へのシグナルの中継地点として機能する可能性が考えられる。SPB が核内外のシグナル伝達に関与するという報告はこれまでになく、新たなモデルである。この可能性について検討するため、核膜縁に局在する Rrs1 および Ebp2 が本シグナル伝達に関与するかどうかを調べた。本研究では、野生株において Rrs1 および Ebp2 を核膜から遊離させた条件 (*MPS3-N*)、さらに *rrs1* 変異株 および *ebp2* 変異株において Rrs1 および Ebp2 を強制的に核膜に繋ぎ止めた条件 (*rrs1-124 RRS1-MPS3* および *ebp2-14 EBP2-MPS3*) を用いた。その結果、Rrs1 および Ebp2 は核膜縁において本シグナル伝達に機能するが、その際に Rrs1 および Ebp2 の自由な移動が必要であることが示唆された。

総括

リボソーム生合成は細胞内外の環境変化に応答して最適化されている。本研究において、スフィンゴ脂質合成系、エンドサイトーシス経路、および細胞骨格系の制御がリボソーム生合成と連携されることが示唆され、分泌経路の異常に応答したリボソーム生合成調節機構の一端が示された。また、リボソーム生合成系の欠陥は、ブラックファン・ダイヤモンド貧血、シュバツハマン・ダイヤモンド症候群、トリーチャー・コリンズ症候群をはじめとした多くの疾患を引き起こし、これらはリボソーム病と総称される。複雑に制御されるリボソーム生合成調節機構を解明することによって、これらの疾患の発症メカニズムの解明や治療法の確立に貢献できることを期待する。