

|              |                                                                                                                                                               |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Regulation of intracellular localization and transcriptional activity of transcription activator Gln3 by dephosphorylation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| Author(s)    | 沼本, 穂                                                                                                                                                         |
| Citation     |                                                                                                                                                               |
| Issue Date   |                                                                                                                                                               |
| Text Version | ETD                                                                                                                                                           |
| URL          | <a href="https://doi.org/10.18910/52145">https://doi.org/10.18910/52145</a>                                                                                   |
| DOI          | 10.18910/52145                                                                                                                                                |
| rights       |                                                                                                                                                               |
| Note         |                                                                                                                                                               |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

## 論文内容の要旨

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |                                                                                                                                                                                                               |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名 ( 沼本 穂 )                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                               |
| 論文題名                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Regulation of intracellular localization and transcriptional activity of transcription activator Gln3 by dephosphorylation in <i>Saccharomyces cerevisiae</i><br>(出芽酵母転写活性化因子Gln3の脱リン酸化による細胞内局在と転写活性能制御機構の解析) |
| 論文内容の要旨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |                                                                                                                                                                                                               |
| <p><b>第1章 諸言</b></p> <p>タンパク質の可逆的リン酸化は様々な細胞生理を制御する重要かつ普遍的な機構である。当研究室では、これまで、プロテインホスファターゼ (PPase) <i>SIW14</i> の破壊株がカフェイン (Caf) 感受性を示すこと、<math>\Delta siw14</math>株のCaf感受性は転写活性化因子 <i>Gln3</i>の破壊によって緩和されること、<i>Siw14</i>は<i>Gln3</i>の標的遺伝子群の発現制御に関与していることを明らかにしてきた。窒素源が豊富な培地で培養した時、<i>Gln3</i>は高リン酸化状態で細胞質に存在する。一方、Caf添加時において、<i>Gln3</i>はPPaseである<i>Sit4</i>および<i>Pph21/Pph22</i> によって脱リン酸化され、核に移行して標的遺伝子群の転写を促進することが知られている。しかし、<i>Siw14</i>が<i>Gln3</i>の転写活性化能を制御するメカニズムはわかっていなかった。そこで、本研究は、<i>Siw14</i>による<i>Gln3</i>の細胞内局在と転写活性化能の制御メカニズムを解明することを目的とした。</p> <p><b>第2章 <i>Siw14</i>は <i>Pph21/Pph22</i>による<i>Gln3</i>の核移行を抑制する</b></p> <p>まず初めに、<i>Siw14</i>が<i>Gln3</i>の細胞内局在とリン酸化の制御に関与しているかを、それぞれ間接蛍光抗体法およびウエスタンブロットを用いて調べた。その結果、<math>\Delta siw14</math>株では、野生型株と比較して<i>Gln3</i>のリン酸化レベルが低下し、Caf添加における<i>Gln3</i>の核移行を示す細胞の割合が増加した。このことから、<i>Siw14</i>は<i>Gln3</i>の脱リン酸化とCaf添加時の核移行の両者を抑制していることがわかった。そこで、<i>Siw14</i>が<i>Sit4</i>または<i>Pph21/Pph22</i>を負に制御することでCaf添加時における<i>Gln3</i>の核移行を抑制している可能性を検討するため、<math>\Delta siw14\Delta sit4</math>株または<math>\Delta siw14\Delta pph21\Delta pph22</math>株における<i>Gln3</i>が、<math>\Delta siw14</math>株または<math>\Delta sit4</math>株、<math>\Delta pph21\Delta pph22</math>株と同じ細胞内局在とリン酸化レベルを示すかを調べた。その結果、<math>\Delta siw14\Delta sit4</math>株における<i>Gln3</i>は、<math>\Delta sit4</math>株と同様、Caf添加時に核移行しなかったが、リン酸化レベルは<math>\Delta siw14</math>株と<math>\Delta sit4</math>株の間であった。それに対し、<math>\Delta siw14\Delta pph21\Delta pph22</math>株における<i>Gln3</i>は、<math>\Delta pph21\Delta pph22</math>株と同様、Caf添加時に核移行せず、リン酸化レベルの低下も見られなかった。以上の結果より<i>Siw14</i>は<i>Pph21/Pph22</i>を負に制御することで<i>Gln3</i>の脱リン酸化およびCaf添加時における核移行を抑制していることが示唆された。</p> <p><b>第3章 <i>Gln3</i>の脱リン酸化は標的遺伝子の発現に必要である</b></p> <p><i>Gln3</i>の核移行および転写活性化能を制御するリン酸化部位はわかっていない。そこで、<i>Gln3</i>の細胞内局在を制御するリン酸化部位を特定するため、<i>Gln3</i>のNuclear localization signal (NLS)及びNuclear export signal (NES) 領域に着目した。<i>Gln3</i>では336-345アミノ酸からなる1か所のNES領域と、それぞれ344-365、388-394アミノ酸からなる2か所のNLS領域 (NLS-K、NLS-C) が同定されている。これらの領域内にある全てのSer、Thr残基 (NES: Thr-339、Ser-344; NLS-K: Ser-344、Ser-347、Ser-355; NLS-C: Ser-391) をそれぞれアラニンに置換した非リン酸化型<i>Gln3</i>変異株 (NES-A、NLS-K-A、NLS-C-A)、およびアスパラギン酸に置換した疑似リン酸化型<i>Gln3</i>変異株 (NES-D、NLS-K-D、NLS-C-D) を作成し、各変異<i>Gln3</i>の細胞内局在および転写活性化能を調べた。その結果、これらの変異<i>Gln3</i>は、野生型<i>Gln3</i>と同様、Caf添加時において核に移行した。しかし、興味深いことに、NES-D変異およびNLS-K-D変異はCaf添加における標的遺伝子 (<i>MEP2</i>、<i>DAL5</i>) の転写を活性化しなかった。以上の結果より、<i>Gln3</i>のNES領域内およびNLS-K領域内の脱リン酸化が標的遺伝子の転写の活性化に必要であることが示唆された。</p> <p><b>第4章 総括と考察</b></p> <p>本研究では、<i>Gln3</i>の脱リン酸化による細胞内局在と転写活性化能の制御メカニズムの解明を行った。その結果、<i>Siw14</i>は<i>Pph21/Pph22</i>を介して、一方、<i>Sit4</i>は<i>Siw14</i>、<i>Pph21/Pph22</i>とは別の経路でCaf添加時における<i>Gln3</i>の核移行を抑制することを明らかにした。さらに、<i>Gln3</i>のNES領域内およびNLS-K領域内の脱リン酸化がCaf添加時における<i>Gln3</i>標的遺伝子の転写活性化に必要であることがわかった。これらの結果は、Caf添加時における<i>Gln3</i>の脱リン酸化が核移行と標的遺伝子の転写活性化の両方に重要であることを示唆している。本研究は、<i>Gln3</i>の脱リン酸化による核移行と標的遺伝子の転写活性化の制御メカニズムの詳細を明らかにしたことにより、真核生物のリン酸化による転写因子の制御機構の理解に大きく貢献することが期待される。</p> |                                                                                                                                                                                                               |

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

| 氏 名 ( 沼 本 穂 ) |     |    |        |
|---------------|-----|----|--------|
|               | (職) | 氏  | 名      |
| 論文審査担当者       | 主 査 | 教授 | 原島 俊   |
|               | 副 査 | 教授 | 金谷 茂則  |
|               | 副 査 | 教授 | 仁平 卓也  |
|               | 副 査 | 教授 | 福崎 英一郎 |
|               | 副 査 | 教授 | 紀ノ岡 正博 |
|               | 副 査 | 教授 | 大竹 久夫  |
|               | 副 査 | 教授 | 福井 希一  |
|               | 副 査 | 教授 | 渡邊 肇   |
|               | 副 査 | 教授 | 村中 俊哉  |
|               | 副 査 | 教授 | 藤山 和仁  |
|               | 副 査 | 教授 | 永井 健治  |

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、出芽酵母プロテインホスファターゼ (PPase) Siw14 による転写活性化因子 Gln3 の細胞内局在制御の解析、および脱リン酸化による Gln3 の転写活性化能の制御機構の解析を目的とし、その研究成果をまとめたものであり、緒論 (一章)、本文 (二、三章)、総合討論 (四章) の 4 章からなっている。

第一章は、出芽酵母の PPase を対象に研究を行う意義、および出芽酵母 Siw14 と Gln3 の転写活性化能制御におけるこれまでの知見、さらに、PPase による転写活性化因子 Gln3 の制御機構を解明することの有用性を述べ、本研究の目的と意義を明確にしている。

第二章では、Siw14 が Gln3 の細胞内局在とリン酸化の制御に関与しているかを、それぞれ間接蛍光抗体法およびウエスタンブロットを用いて調べている。その結果、 $\Delta siw14$  株では、野生型株と比較して Gln3 のリン酸化レベルが低下し、カフェイン (Caf) 添加における Gln3 の核移行を示す細胞の割合が増加することを明らかにしている。このことは、Siw14 が Gln3 の脱リン酸化と Caf 添加時の核移行の両者を抑制していることを示唆している。さらに、Siw14 が Gln3 の PPase として知られている Pph21/Pph22 を負に制御することで Caf 添加時における Gln3 の核移行を抑制している可能性を検討するため、 $\Delta siw14 \Delta pph21 \Delta pph22$  株における Gln3 が、 $\Delta siw14$  株または  $\Delta pph21 \Delta pph22$  株と同じ細胞内局在とリン酸化レベルを示すかを調べている。その結果、 $\Delta siw14 \Delta pph21 \Delta pph22$  株における Gln3 は、 $\Delta pph21 \Delta pph22$  株と同様、Caf 添加時に核移行せず、リン酸化レベルの低下を示さないことを見出している。以上の結果は、Siw14 が Pph21/Pph22 を負に制御することで Caf 添加時における Gln3 の脱リン酸化および核移行を抑制していることを示唆する。

第三章では、Gln3 の核移行および転写活性化能を制御するリン酸化部位の同定を行っている。具体的には、Gln3 の Nuclear export signal (NES) 及び Nuclear localization signal (NLS-K、NLS-C) 領域に着目し、これらの領域内にある全ての Ser、Thr 残基 (NES : Thr-339、Ser-344 ; NLS-K : Ser-344、Ser-347、Ser-355 ; NLS-C : Ser-391) をそれぞれアラニン置換 (NES-A、NLS-K-A、NLS-C-A)、およびアスパラギン酸に置換 (NES-D、NLS-K-D、NLS-C-D) した変異 Gln3 を作成して、各変異 Gln3 の細胞内局在および Caf 添加における標的遺伝子 (*MEP2*、*DAL5*) の発現レベルをリアルタイム RT-PCR を用いて調べている。その結果、これらの変異は、Caf 添加時における核移行に影響がないのに対して、NES-D 変異および NLS-K-D 変異が、Caf 添加における標的遺伝子 (*MEP2*、*DAL5*) の転写を抑制することを明らかにしている。以上の結果は、Gln3 の NES 領域内の Thr-339、Ser-344 および NLS-K 領域内の Ser-344、Ser-347、Ser-355 の脱リン酸化が標的遺伝子の転写の活性化に必要であることを示唆している。

第四章の総合討論では、本研究で得られた知見をまとめるとともに、Gln3 の脱リン酸化による細胞内局在および転写活性化能制御機構および PPase Siw14、Pph21/Pph22、Sit4 の関係性についての今後の展望を述べている。

以上のように、本論文は、真核細胞の PPase による転写因子の制御メカニズムについて多くの知見をもたらしたものである。よって本論文は博士論文として価値あるものと認める。

