

氏名(本籍)	さとう たかし 佐藤 隆(福島県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第2255号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
審査研究科	生物科学研究科
学位論文題目	Studies on the Regulation of Glycolytic Gene Expression in Eukaryotes (真核生物の解糖系遺伝子の発現制御に関する研究)
主査	筑波大学併任教授 農学博士 地神芳文 (生命工学工業技術研究所)
副査	筑波大学教授 理学博士 山根國男
副査	筑波大学教授 理学博士 林純一
副査	筑波大学教授 医学博士 中山和久

論文の内容の要旨

多くの生物は生命活動の維持にグルコースを代謝してエネルギーを獲得しており、解糖系はその代謝過程を担っている。解糖系では十数個の酵素による一連の反応により、1分子のグルコースから2分子のピルビン酸とATPが生成される。解糖系は最も基本的で重要な代謝経路の一つであるが、それに関与する解糖系酵素群の遺伝子発現制御については不明の点が多かった。

酵母は発酵や醸造を通じて我々にはなじみの深い微生物である。発酵の盛んな酵母では解糖系遺伝子は強く発現しており、解糖系酵素は細胞内の可溶性タンパク質の大きな割合を占める。出芽酵母 *S.cerevisiae* では、これら解糖系遺伝子の発現制御の鍵となる転写制御因子として Gcr1p, Gcr2p と Rap1p が報告されている。このうち Rap1p は、解糖系以外にもリボソームタンパク質の転写活性化やサイレンシング(転写抑制)、テロメアの長さの調節などにも関与しているグローバルな制御因子である。一方、Gcr1p と Gcr2p は、*gcr1* 及び *gcr2* 変異株で解糖系遺伝子の転写は著しく低下するが非解糖系酵素遺伝子の転写には影響がないことから、解糖系遺伝子を特異的にかつ統括的に制御する因子と考えられている。しかし、解糖系遺伝子の発現制御における Gcr1p/Gcr2p 複合体の転写活性化機構についてはまだ不明な点が多い。そこで本研究では *gcr2* 変異の多コピー抑圧遺伝子の単離とその解析により、Gcr1p/Gcr2p 複合体の作用機構のさらなる解明を目指した。

一方、酵母は真核生物としての基本的な特徴を備えた単細胞生物であり、遺伝子レベルでも高等真核生物との共通性がしばしば見いだされる。特に、出芽酵母は遺伝学的、分子生物学的手法を駆使できるため、真核生物の基本的な生命現象の解明におけるモデル系として広く利用されている。最も基本的な代謝経路である解糖系が、高等生物でも酵母と同様の制御を受けているかどうかは非常に興味深い点であるため、Gcr2p と同様の機能を持つヒト由来の因子の同定を試みた。また、Gcr2p は他のタンパク質とまったく相同性がないため、これらの因子の構造、機能部位、作用機構に関しては未知の部分が多い。そこでヒト由来の遺伝子産物を解析し、そこから予測される構造、機能についても検討した。

出芽酵母の *gcr2* 変異株はグルコースを炭素源とした培地上での生育が悪い。そこで、この変異株に出芽酵母の多コピー型のゲノムライブラリーを導入し、生育の悪さを回復するクローンを単離した。その結果、SGC1 遺伝子が *gcr2* 変異の多コピー抑圧遺伝子として単離された。SGC1 では SGC1-1 という優性異変が *gcr1* 変異を抑圧するこ

とが既に報告されていたが、今回、野生型の *SGC1* は *gcr2* 変異のみを多コピーで抑圧でき、*gcr1* 変異は多コピーでも抑圧できないことが明らかとなった。Sgc1p は、そのアミノ酸配列中に Basic-helix-loop-helix モチーフを有しており、E-box 配列結合タンパク質と予想され、*ENO1* の UAS 領域を用いた *in vitro* の footprinting 解析で TATA 近傍の E-box 配列に結合することが示された。また、*ENO1-lacZ* を用いたりポーターアッセイで、優性変異型の Sgc1-1p (E189Q) はりポーター遺伝子を活性化できたが、野生型の Sgc1p はこれを活性化できなかった。このことは、Sgc1-1p は E-box 結合能があるのに対し、野生型の Sgc1p はそれだけでは E-box に結合できないことを示唆している。多コピーの野生型 *SGC1* による抑圧が *gcr2* 変異のみで、*gcr1* 変異を抑圧できなかったことも考慮すると、野生型の Sgc1p が E-box に作用するためには Gcr1p の関与が必要であると思われる。

gcr2 変異株はグルコース培地上での生育が悪いため、この表現型を相補できるクローンをヒト cDNA ライブラリーよりスクリーニングした。約 60 万個のコロニーをスクリーニングし、*gcr2* 変異株の生育を回復するクローンを HeLa 細胞、脳、筋肉由来の cDNA からそれぞれ 3 株、6 株、33 株得た。塩基配列を決定したところ、4 種類の既知の遺伝子 (Myosin heavy chain, Desmin, Alpha-actinin, Kinectin) と、4 種類の未知の遺伝子が得られたが、いずれも Gcr2p と相同性はなかった。しかし、増殖を回復した株では解糖系酵素の活性も回復し、これらの遺伝子による相補は *gcr2* 変異に特異的であり *gcr1* 変異を相補できないことから、これらの遺伝子は *GCR2* の機能を特異的に相補していると考えられた。cDNA ライブラリーとしては Gal4p の転写活性化領域 (GAD) との融合ライブラリーを用いていたが、既知の遺伝子 4 種類と未知の遺伝子 3 種類は GAD を除くとすべて *gcr2* 変異株の相補能を失なった。従って、これらの遺伝子産物は Gcr2p の転写活性化能以外の機能を捕っていると考えられたが、構造上の特徴を調べると、すべてに coiled-coil 構造をとり得る領域が存在していた。Gcr1p と Gcr2p にも類似の構造が予想されることから、この領域が Gcr1p との結合に関した Gcr2p の機能を代替している可能性が示唆された。

脳の cDNA ライブラリーより得られた未知遺伝子は N 末端側を欠いていたため、PCR を用いて全長の cDNA をクローニングした。その結果、644 アミノ酸をコードする ORF が得られ、Gcr2p の機能を特異的に相補するヒト遺伝子であることから、*hSGTI* (human Suppressor of Gcr Two) と名付けた。この遺伝子発現をノーザン解析で調べると、筋肉や心臓など解糖系が盛んであると思われる組織で強く発現していることがわかった。また、FISH による遺伝子マッピングの結果、第 10 番染色体の 10q22.3 にマップされた。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、あらゆる生物の最も基本的で重要な代謝経路の一つである解糖系の遺伝子発現制御機構を酵母を用いて解析したものである。出芽酵母の解糖系遺伝子の発現は、そのエンハンサー領域に存在するコンセンサス配列である RPG 配列と CTTCC 配列に、それぞれ多機能型転写制御因子 Rap1p 解糖系に特異的な制御因子 Gcr1p と Gcr2p の複合体が結合することにより転写レベルで統括的に制御されている。しかし、Gcr1p/Gcr2p 複合体の詳細な作用機構については未だ不明な点が多いため、*gcr2* 変異の多コピー抑圧遺伝子を単離し、その機能を解析することで、Gcr1p/Gcr2p 複合体の作用機構のさらなる解明を目指した。その結果、*gcr2* 変異株で低下した解糖系遺伝子の発現を回復させる遺伝子として *SGC1* を単離し、その機能を明らかにした。また、高等真核生物にも酵母と同様の制御が存在するかどうかを究明するため、Gcr2p のヒトホモログの単離を試み、*hSGTI* (human Suppressor of Gcr Two) と名付けた 644 アミノ酸をコードし、第 10 番染色体の 10q22.3 にマップされるヒト遺伝子の単離に成功した。これは、基本的な代謝経路である解糖系遺伝子の発現制御に関して、酵母の *SGC1* 遺伝子の機能を明らかにするとともに、ヒトの新規な転写因子 *hSGTI* 遺伝子の単離に成功したものであり、解糖系遺伝子の発現制御に関する世界的研究の現状からみても高く評価できるものであり、ヒトを含む真核生物の遺伝子発現における類似の機能を解析するうえでも有益な知見を提供するものである。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。