

論文審査の結果の要旨

氏名 矢原夏子

本論文は、出芽酵母を真核細胞のモデルとして用い、真核細胞に特有な細胞内膜系間の小胞輸送システムの制御機構の解明を目指したものである。序論では、これまでの小胞輸送研究を概観し、今後の問題点を指摘すると共に、本研究の目的を示している。すなわち、小胞輸送の分子スイッチとして働くGTPaseの一つ、Arf (ADP-ribosylation factor) の細胞内での機能解明を目標とした。第1章では*arf1*温度感受性変異体の分離と遺伝学的な解析を行い、8個の新しい変異を同定した。これらを基に、Arfの機能解析を進めることが可能となった。第2章では、*arf1*の変異部位により輸送損傷が異なることを見い出し、Arfが多機能蛋白質であることを示唆した。第3章では、前章で予想されたArfの多機能性を遺伝学的に証明した。第4章では、Arfと相互作用する因子を検索するために、*arf*変異体の多コピーサプレッサーを分離し、その原因遺伝子を同定した。結論では、これまでの結果を総合的に解釈し、Arfは細胞内の複数の輸送系を制御する多機能蛋白質として作用するとした。各章の内容の要旨は以下の通りである。

第1章 *arf1*温度感受性変異株の分離

酵母は*ARF1*と*ARF2*の二つの重複した*ARF*遺伝子を持つ。そこで、*arf1*の変異体を分離するために、*arf1 arf2*二重破壊株において*ARF1*のORF全体にPCRを用いてランダムに変異を導入した*ARF1*を発現させた。温度感受性を示す変異遺伝子について、複数変異が入っているものについては温度感受性を引き起こすアミノ酸変異を決定し、最終的に新奇の*arf1*変異遺伝子を8個単離した。

第2章 アレル特異的な輸送損傷

*arf1-11*変異体：顕著な小胞体膜の蓄積など、COPII変異体同様に、小胞体からゴルジ体への輸送に著しい損傷がみられる。ところが、EGFP-Rer1pの局在を調べたところ、COPII変異株で見られたような小胞像は観察されず、弱い液胞の染色が観察された。以上より、本変異体では、小胞体からゴルジ体への順方向輸送のみではなく、ゴルジ体から小胞体への逆輸送にも損傷が生じていることが考えられる。さらに、EGFP-Rer1pのリング状構造が観察され、FM4-64染色においても同様なリング状構造が見られたことから、エンドソームから液胞の輸送系にも損傷が生じており、EGFP-Rer1pやFM4-64がエンドソームで蓄積していることが予想された。

*arf1-13*変異体：制限温度下に1時間置いた細胞を電子顕微鏡で観察すると、肥大したエンドソーム様の構造体の蓄積がみられる。2-4時間経つとその構造体は減少し、代わりに非常に入り組んだ電子密度の高い液胞が観察された。

arf1-16 : EGFP-Rer1pの局在に異常が見られるばかりではなく、著しいBip

の細胞外への漏れが観察された。Bipは、そのHDELシグナル配列が認識されることによって、ゴルジ体から小胞体へ送りかえされ、このシステムはRer1pに非依存的であることが知られている。したがって、*arf1-16*株はRer1p依存的な逆輸送システムばかりではなく、HDEL認識による逆輸送にも損傷が生じていると考えられる。

arf1-18 : FM4-64やEGFP-Rer1pが細胞質中に散在するような像が観察された。電子顕微鏡による観察の結果、細胞質中にさまざまな種類や大きさの小胞の蓄積が観察されたことから、疎水性のFM4-64やEGFP-Re1pはこれらの小胞に局在している可能性がある。

以上のように、*arf1*温度感受性変異体は制限温度下で、アレル特異的な輸送損傷をよび形態異常を示すことが明らかとなり、Arf1p分子がさまざまな輸送系に関与することが示された。

第3章 *arf1*温度感受性変異間の遺伝子内相補

変異体同士のヘテロアレリックな二倍体を形成し、温度感受性を調べた結果、幾つかの組み合わせにおいて遺伝子内相補が成立し、これらの変異アレルを3つの相補群に分類した。

第4章 *arf1*変異の多コピーサプレッサー

Arf1p一分子がどのようにして異なる複数の輸送系を制御しているのかを明らかにするために、*arf1*温度感受性変異の多コピーサプレッサーのスクリーニングを行った。これらの因子はアレル特異的にサプレスすることから、Arf1pが周辺因子を使い分けることによって、複数の輸送系を制御する機構を提案した。

結論

*arf1*温度感受性変異を複数単離し、それらがアレル特異的な輸送損傷を示し、アレル間において遺伝子内相補が成立することを示した。また、*arf1*温度感受性変異体の温度感受性をサプレスする因子を単離し、アレル特異的なサプレス能があることを明らかにした。以上の結果から、Arf1pが細胞内において、複数の輸送系を制御する多機能蛋白質として作用していると結論した。

平成13年2月6日に開催された博士論文審査委員会において、論文の内容および申請者の専門学術における力量について審査した。また、発表論文は共著であるが、申請者の貢献が極めて高いことも認められた。以上のことより、本申請者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有することが、委員の全員一致によって認められた。