

# 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 延 濟 梧

真核生物の主要リン脂質の代謝・調節の分子機構を解明する上で、ゲノム情報が確立し、分子生物学的実験技術の発達した、*Saccharomyces cerevisiae*は優れた研究材料である。それを研究する1つの手段として、リン脂質を細胞に取り込ませ、その動きや分子的な変形を追跡する方法があるが、酵母は特有の厚い細胞壁が障害となるために採用できないという問題がある。本研究では、*S. cerevisiae*に実際に相当量の主要リン脂質を取り込ませることができるかどうかを詳細に検討した。また、得られた系を用いて、細胞外から加えたリン脂質が細胞のリン脂質代謝に対してどのような影響を与えるかを解析した。

ホスファチジルセリンシンターゼを欠損する *cho1/pss*変異株は、エタノールアミンの細胞内供給量が小さいため、培地に供給されたコリンやエタノールアミンを Kennedy 経路により利用しなければ、ホスファチジルエタノールアミン (PE) やホスファチジルコリン (PC) を合成できず、生育できない。そこで、*cho1/pss*変異株に外からリン脂質 (PEあるいはPC) を与えたとき、それらが酵母細胞によって積極的に利用されるかどうかを、細胞の生育を測定することによって判断できるものと考えられた。

第1章では炭素鎖の短いアシル基をもつリン脂質による、*cho1/pss*変異株の生育の支持を観察した。その結果、ジカプリロイルPC (diC8PC) およびジカプリルPC (diC10PC) また、ジカプリロイルPE (diC8PE) によって *cho1/pss*変異株の液体培地における生育が支持された。この際、リン脂質が細胞外でホスフォリパーゼ様の活性によって分解され、その分解産物だけが細胞に取り込まれたのではなく、細胞内に取り込まれ、膜に挿入されて利用されることが示された。

第2章では diC8PC を添加することによるリン脂質合成への影響を観察した。<sup>32</sup>P 無機リン酸と diC8PC を添加した培地で 40 時間培養した *cho1/pss*変異株の PC の比放射能は、コリン添加培地で生育させた場合の PC の約半分であった。また、PE の量は 20 % の水準に過ぎず、PE のメチル化が抑制されていないことが推定された。このことは、*PEM1* と *PEM2* のプロモーターに *lacZ* を繋いだプラスミドを *cho1/pss*変異株に形質転換したときの  $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性が、diC8PC を添加した場合、コリン添加条件に比べ、*PEM1* のプロモーターによって約 50 倍、*PEM2* のプロモーターによっては約 5 倍であったことによって支持された。この結果から、N-メチル化による PE から PC への合成は添加したコリンによって転写レベルで強く抑制されるのに対して、外から添加した diC8PC によっては影響を受けないことが示唆された。

第3章では、短鎖のリン脂質の代謝に関わる酵素活性を検索した *cho1/pss*変異株を diC8PC を添加して培養したとき、diC8PC は培養後 40 時間以内に最初添加した量の 10 % まで減少した。また培地から

は培養後40時間以内に最初に添加したリン脂質中のカプリル酸のほぼ全量が検出された。結果から、倍地中に添加された diC8PC は膜に取り込まれ、アシル鎖交換により変形され、その結果、遊離した C8 の脂肪酸が細胞外へ放出される可能性が示唆された。

また、*PLB1*、*PLB2*、*PLB3* の 3 重破壊株を用い、NBD-PC を分解し、NBD-脂肪酸、または NBD-リゾホスファチジルコリンを生産する酵素活性（*PLA2* または *PLA1* の酵素活性）を検索した。その結果、強い *PLA* 活性を検出する条件を見いだしている。

第 4 章では、diC8PC の代謝に関わる遺伝子を単離するために *PEM1* *PEM2* 2 重遺伝子破壊株を用いた解析を行っている。PS を合成できない *cho1/pss* 変異株は、生育が悪く、内因性のエタノールアミンによって、PC の要求性が不安定である。そこで、PE メチル化酵素である *PEM1* と *PEM2* の 2 重破壊株を作成したところ、破壊株は安定したコリン要求性を示し、diC8PC によっても良好に生育した。実際に *PLB1* と *PLB2*、*PEM1* と *PEM2* を破壊した 4 重破壊株を親株として、コリン存在下では生育できるが、diC8PC に依存して生育できない変異株 33 個が得られ、これによって今後 PC 利用に関わる遺伝子の検索のための基礎を確立した。

以上、本論文は酵母による膜リン脂質の取り込みを見い出し、その代謝を解明する系を確立したもので、学術上、応用上寄与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（農学）の学位論文として価値あるものと認めた