

# 論文審査の結果の要旨

氏名 倉橋 洋史

分裂酵母は、栄養源が豊富な条件下では細胞分裂によって増殖し、栄養源飢餓条件下では、悪環境に耐えるために胞子を形成する。胞子形成過程では、二つの細胞が接合し、細胞融合、核融合を行って二倍体となり、その後に減数分裂を行う。ここでの細胞融合は、細胞壁の分解と細胞膜の融合の2段階で進行する。学位申請者倉橋洋史は、細胞融合の分子機構を明らかにするために、分裂酵母の細胞融合に必要な遺伝子を同定し、その機能を解明することを行った。

学位申請者は、先に今井により分離されていた分裂酵母細胞融合不能 (*fus*) 変異体に、分裂酵母のゲノムライブラリーおよび cDNA ライブラリーを導入することにより、細胞融合不能の原因遺伝子 3 種類 (*fus2*, *fus4*, *fus5*) を単離することに成功した。

塩基配列決定の結果、*fus4* 遺伝子はアクチン結合タンパク質のトロポミオシンをコードする *cdc8* 遺伝子と同一であることが判明した。以後、*fus4-1* 変異を *cdc8-F41* と表記する。*cdc8-F41* 変異体は接合に際して前接合子の状態で停止した。この時に細胞質は混合していないことが確認された。また、細胞壁は十分に分解せずに残っていた。一方、生育に欠陥をもつものとして単離された温度感受性 *cdc8-27* 株は、半制限温度では細胞融合不能の表現型を示すことが判明した。学位申請者はさらに、*cdc8* 遺伝子に対して PCR によりランダムに突然変異を導入し、いくつかの細胞融合不能の変異体を得た。その全ては生育と細胞融合の双方に欠陥を示し、また、これらの突然変異が *cdc8* の全長にわたっていたことから、細胞融合に必要な Cdc8p の機能領域と生育に必要な領域は分離できないことが示唆された。

野生型の Cdc8p の量が減少した時に生育と細胞融合に生じる影響を調べた。対数増殖期において Cdc8p の発現量を減少させると、まず枝分かれ細胞が現れ、さらに減少させると細胞はダンベル型となって生育を停止した。Cdc8p の発現量の低下は細胞融合不能も誘起したが、そのためには細胞がダンベル型になるよりもさらに Cdc8p を減少させなければならず、細胞融合のためには細胞質分裂よりも少量の正常 Cdc8p があればよいことが推測された。接合中の細胞で Cdc8p は接合部位に局在していた。また F-アクチンを共染色すると、F-アクチンは接合部位付近にパッチ状に局在したが、Cdc8p

の強い蛍光とは重ならず、隣接した位置にあった。以上のことより学位申請者は、トロポミオシンは、パッチとは異なる細胞融合のための小さな F-アクチン構造体を接合管の先端に構築するために働いているという考えを提唱している。

学位申請者はさらに *fus2* 遺伝子の機能を解析し、その産物が 7 回貫通型膜タンパク質と予想されることを示した。*fus2* 変異体の作る前接合子においても細胞質は混合していなかった。しかし、片方の細胞膜がもう一方へ突き出している様子の細胞が観察された。このような細胞では細胞壁が弱くしか染色されず、分解が進んでいるようであった。*fus2* 遺伝子の発現パターンを調べたところ、窒素源飢餓特異的に発現される mRNA が存在した。また、この mRNA は有性生殖のためのマスター転写因子 Ste11p に依存して発現することが示された。Fus2p は、接合中の細胞では接合部位にその局在が観察された。以上のことから、新規の膜タンパク質と考えられる Fus2p は接合部位に局在し、細胞膜の融合に関わっている可能性が明らかになった。

*fus5* 遺伝子の解析からは、その産物が小胞輸送に必要な small GTPase ARF に対する GDP-GTP 交換因子 (ARF-GEF) であろうと推測された。*fus5* の前接合子においても細胞質は混合せず、*fus2* と同様に、片方の細胞膜がもう一方へ突き出している様子が観察された。*fus2* と *fus5* の関係をさらに調べたところ、*fus2* 遺伝子が *fus5* 変異体を多コピーで抑圧することが判明した。また、*fus5* 変異体における Fus2-GFP の観察を行ったところ、Fus2-GFP の接合部位への局在が減少していた。このことから、Fus5p が Fus2p の輸送に関わっている可能性が示唆された。

以上、倉橋洋史は分裂酵母の接合時の細胞融合に関わる 3 つの遺伝子を同定し、それらの産物を特定するとともに、それぞれが細胞融合に果たす機能について大きな洞察を得た。この成果は、細胞が融合する際の分子機構に関して重要な展開を与えるものであり、学位申請者の業績は博士（理学）の称号を受けるにふさわしいと審査員全員が判定した。なお本論文は今井義幸、山本正幸との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、倉橋洋史に博士（理学）の学位を授与できると認める。