

論文審査の結果の要旨

氏名 阿部 充宏

本論文は4章からなり、第一章はグルカン合成酵素の上流因子の探索、第二章は生合成過程におけるグルカン合成酵素活性の解析、第三章では、分泌小胞中のグルカン合成酵素の制御機構の解析、第4章では、小胞体中のグルカン合成酵素の制御機構を解析した。

まず、第一章ではグルカン合成酵素のサブユニットであるFks1pの推定上の触媒領域に変異を持つ温度感受性変異株*fks1-1154*が、i) 制限温度下で細胞のグルカン合成能が低下していること、ii) 制限温度下で芽の先端特異的にグルカンが合成されないこと、iii) 膜画分のグルカン合成酵素活性が低下していることから、特に制限温度下でグルカン合成の触媒活性が低下していることをまず明らかにした。次に、グルカン合成酵素の上流因子を同定するために、*fks1-1154*変異株の温度感受性を多コピーで抑圧する遺伝子の探索を行った。その結果、7つの遺伝子 (*WSC1*, *WSC3*, *MTL1*, *ROM2*, *LRE1*, *ZDS1*, *MSB1*) が得られた。*Wsc1p*, *Wsc3p*, *Mtl1p*は外部環境のストレスを感知する推定上の細胞壁センサーとして、*Rom2p*は*Rho1p*の活性化に必要なグアニンヌクレオチド交換因子(GEF)として報告されている。*Lre1p*, *Zds1p*, *Msb1p*は、遺伝学的解析がいくつか報告されているものの、実際の機能については不明な点が多い因子である。これらの多コピー抑圧遺伝子はすべて*fks1-1154*変異株の低下したグルカン合成能を抑圧したことから、グルカン合成酵素に対して正の制御因子であることが明らかになった。得られた多コピー抑圧遺伝子産物が*Rho1p*の活性化を介してグルカン合成酵素を制御しているかを遺伝学的に調べた結果、*Wsc1p*, *Wsc3p*, *Mtl1p*, *Rom2p*, *Lre1p*, *Zds1p*は*Rho1p*の活性化を介した制御、*Msb1p*は*Rho1p*の活性化以外の制御によりグルカン合成酵素を活性化することが示唆された。

第2章では、生合成・輸送過程のグルカン合成酵素について調べるために、制限温度下でタンパク質輸送が停止する*sec*変異株を用いて解析を行った。まず、グルカン合成酵素がどのような機構で細胞膜に局在化するかを調べるために、間接蛍光抗体法でグルカン合成酵素の局在を調べた。その結果、分泌小胞で停止する*sec1*, *sec6*変異株、ゴルジ体で停止する*sec7*, *sec14*変異株、小胞体で停

止する*sec12*, *sec16* 変異株のいずれの変異株でも制限温度下でFks1p/Fks2p及びRho1pは細胞内に蓄積することがわかった。また、制限温度下で培養した*sec1* 変異株からゲルろ過で精製した分泌小胞画分には、Fks1p/Fks2p, Rho1pが含まれていることが確認された。したがって、多くの細胞膜タンパク質と同様に、グルカン合成酵素はリボソームで合成された後、小胞体、ゴルジ体、分泌小胞、といった小胞輸送により細胞膜に輸送されることが示唆された。この輸送過程のどこで活性化されるかを調べるために細胞のグルカン合成能を調べた結果、いずれの変異株でも制限温度下で合成能が低下することがわかった。また、抗グルカン抗体を用いて免疫電顕を行ったところ、制限温度下で培養した*sec1* 変異株の分泌小胞内では染色されなかったことから、細胞膜へ到達する最終ステップである分泌小胞内でもグルカンを合成していないことが確認された。したがって、生合成・輸送過程のグルカン合成酵素は活性が抑制され、細胞膜に局在して初めて活性化されることが明らかになった。

第三章では、まず、*sec1* 変異株の膜画分においてグルカン合成酵素活性を測定したところ、前述の細胞のグルカン合成能とは異なり、Rho1pを活性化型に変換する試薬GTP- γ Sを加えると十分に上昇することを見出した。この活性は*sec1* 変異とグルカン合成酵素活性が低下する*rho1* 変異との二重変異株では見られないこと、二重変異株に精製した組換えRho1pを加えると顕著な酵素活性が見られるようになることから、*sec1* 変異株の膜画分で見られた高いグルカン合成酵素活性は、Rho1pに依存していることがわかった。また、膜画分だけでなく精製した分泌小胞画分でも、GTP- γ Sを加えると十分な酵素活性が見られた。活性化型Rho1pを特異的に認識する抗体を作成し細胞内の局在を調べた結果、活性化型Rho1pは細胞膜の一部に局在していたが、分泌小胞には局在していないことがわかった。これらの結果から、分泌小胞膜上ではまだRho1pが活性化型に変換されていないためにグルカン合成酵素の活性が抑制されていることが明らかになった。

分泌小胞中のRho1pが活性型へ変換しないのは、上記の遺伝学的探索で得られたグルカン合成酵素の上流因子のいずれかが、細胞膜ではRho1pと直接作用できるが分泌小胞中では作用できないためである可能性が考えられた。そこで、Rho1pのGEFであるRom2pの局在を調べたところ、分泌小胞でタンパク質輸送を停止させたにもかかわらず、分泌小胞中には局在せず細胞膜に局在していた。さらに、*sec1* 変異株でRom2pを過剰発現したところ、分泌小胞内にグルカンが蓄積することが免疫電顕により観察された。したがって、分泌小胞内でグルカン合成酵素の活性が抑制されている

のは、Rom2pが分泌小胞中には局在せず、分泌小胞中のRho1pに作用できないためであることが示唆された。

第4章では、*sec12*, *sec16*変異株の膜画分におけるグルカン合成酵素活性は、*sec1*変異株とは異なり、GTP- γ Sを加えても酵素活性の上昇は見られなかった。また、精製した組換えRho1pを加えても活性の上昇は見られなかった。したがって、小胞体でグルカン合成酵素活性が抑制されている機構は、分泌小胞における機構とは異なるものであることがわかった。一方、膜画分にグルカン合成酵素に対する阻害因子が含まれていることを明らかにし、この阻害因子はスフィンゴ脂質の中間体（フィトスフィンゴシン）であることがわかった。フィトスフィンゴシンの局在を細胞分画により調べた結果、この脂質は主に小胞体膜に局在していたことから、小胞体で活性が抑制される原因として、小胞体膜に局在するフィトスフィンゴシンがグルカン合成酵素の活性を阻害することが考えられた。そこで、*sec12*, *sec16*変異株でフィトスフィンゴシンを分解するDpl1pを過剰発現し、細胞内のフィトスフィンゴシン量を減少させたところ、低下したグルカン合成酵素活性は部分的に回復することがわかった。したがって、小胞体ではフィトスフィンゴシンがグルカン合成酵素を阻害するためにグルカン合成酵素の活性が抑制されることが示唆された。

なお、本論文第4章は、西田生郎、峯村昌代、門田裕志、脊山洋右、渡辺公英、大矢禎一と共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行なったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

よって、博士（理学）の学位を授与できると認める。