

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 富重 斉生

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の細胞壁は細胞の最外層にあって、その形態を規定し、浸透圧変化などの環境変化を緩衝する重要な役割を果たしている。細胞壁はグルカン・キチンの糖ポリマーとマンナン蛋白質よりなる。グルカン・キチンは骨格の強度を保つように架橋し、マンナン蛋白質はその網目を埋めるように外側を覆って透過性を制限している。マンナン蛋白質は、 $\alpha$ -糖鎖を介しグルカンに直接結合する PIR-CWP と、GPI-アンカーの一部と $\beta$ 1,6-グルカンを介して細胞壁 $\beta$ 1,3-グルカンに共有結合する GPI-CWP の 2 種類がある。GPI-CWP の細胞壁転移機構は未だに明らかでなく、生育に必須なので抗真菌剤の有効なターゲットとしても解明が期待される。本論文は、この GPI-CWP の細胞壁転移機構の解明を目的に行った研究の成果を取りまとめたもので、2 章からなっている。

序論に続く第 1 章では、*GAS1* 遺伝子破壊と合成致死を示す変異株の単離と遺伝子の同定が述べられている。*GAS1* は $\beta$ 1,3-グルカンの組換え酵素をコードし、破壊株は $\beta$ 1,6-、 $\beta$ 1,3-グルカンの付加した GPI-CWP が培地中に漏出する。また、野生株細胞壁には 1-2%しか存在しないキチンが 40%まで増加し、GPI-CWP は $\beta$ 1,6-グルカンを介して結合するようになり、 $\beta$ 1,6-グルカン合成酵素 *KRE6* の破壊と合成致死を示す。 $\beta$ 1,6-グルカンへの GPI-CWP の転移に働く遺伝子の変異も *gas1* 破壊株と合成致死性を示すと予想し、*gas1* 破壊株を用いた合成致死スクリーニングを行った。染色体の *gas1* 破壊遺伝子をプラスミド上の *GAS1* 遺伝子で相補しておき、このプラスミドの脱落を *ade2 ade3* で検定する系を用いた。10 万の EMS 処理コロニーから、プラスミド脱落がない合成致死変異 53 株を単離した。変異はいずれも劣性であった。また細胞壁 $\beta$ 1,3-グルカンのアセンブリーを阻害する Congo red に 23 株が高感受性を示した。

*Gas1p* の発現を *GAL* プロモーターで制御することで、相補活性をグルコース培地上のコロニーの生育で判断できるようにした。致死性が明らかな 14 株について 8 種類の変異遺伝子 (*BCK1*, *BIG1*, *CSG2*, *DFG5*, *IPT1*, *KEX2*, *KRE6*, *WSC1*) を同定した。*CSG2* と同じステップで機能すると考えられている *SUR1*, *DFG5* のホモログである *YKL046c* を加えた、10 種類の遺伝子の破壊株について検討した。*gas1* 破壊株とかけ合わせ、四分子解析したところ 5 株で合成致死性が確認された。また、Congo red に対する感受性、グルコース・マンノース・グルコサミンの 3 種の糖組成、欠損細胞壁の補償機構の一つである細胞壁蛋白質 *Cwp1p* の発現量増加、の 3 点について検討した。Congo red には 3 株が感受性を示し、マンノース/グルコース比が野生株より高いものと低いものとに分類出来た。ウェスタン解析により、6 株で *Cwp1p* の発現量増加が認められ、細胞壁の何らかの欠損が示唆された。

第 2 章では、*KEX2* の細胞壁合成における役割の解析について述べられている。取得した

遺伝子のうち、*KEX2* はゴルジ体に局在する di-basic な配列を認識するプロセシングプロテアーゼをコードしており、取得した変異 allele ばかりでなく遺伝子破壊も *gas1* 遺伝子破壊と合成致死を示した。また、*kex2* 破壊株は Congo red 感受性で、Cwp1p の発現量が増加し、細胞壁の欠損が示唆された。*kex2* 破壊株は  $\beta$ 1,6-グルカン欠損株が耐性を示す Kl killer toxin に対して感受性であった。*kex2* 破壊株の低温感受性のマルチコピーサブレッサーとして取得された Mkc7p と YAP3p は mono-basic な部位を認識する GPI-anchor 型 aspartyl protease であるが、*MKC7* と *YAP3* はマルチコピーで *kex2* 破壊株の Congo red 感受性を抑制した。このことは Kex2p が細胞壁合成に関与するタンパク質前駆体をプロセシングしていることを強く示唆する。以上を考慮して、分泌経路に入り Kex2p の基質となりうるタンパク質をデータベースから抽出し、各々についての詳細な検討を開始した。

以上、本論文は、酵母細胞壁合成に関わる遺伝子を *gas1* との合成致死性で多数取得し、その性質を明らかにした。分泌系のプロセシング酵素 Kex2p が壁合成酵素の活性化に関わるという新展開はきわめて興味深く、これらの研究成果は、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。