

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高久 洋暁

酵母 *Candida maltosa* が蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミド(CYH)に耐性であり、その耐性は CYH により誘導される誘導的耐性である。この誘導的耐性は *C. maltosa* の 2 種類の L41 リボソーム蛋白質のうち、56 番目のアミノ酸残基が通常のプロリンではなく、グルタミンであるものをコードする遺伝子 *L41-Q* が発現することによる。*L41-Q* のプロモーター領域には、CYH 添加またはアミノ酸飢餓条件下で発現誘導に必要な配列が同定されており、そこに *Saccharomyces cerevisiae* などアミノ酸飢餓時に働く Gen4p 応答配列と類似の配列が含まれている。本研究は、*C. maltosa* における *L41-Q* の発現制御機構及び、CYH 添加後に起こるリボソームの CYH 耐性化の機構の解明を目的として行われたものである。

1. *L41-Q* 遺伝子の転写制御因子は C-Gen4p である

*L41-Q* のプロモーター解析から関与が予想された *C. maltosa GCN4* ホモログを取得し、*C-GCN4* と命名した。大腸菌内で発現、精製した C-Gen4p を用い、*L41-Q* の発現誘導に関わるエレメントに直接結合することを示した。*C-GCN4* 破壊株は CYH 感受性を示し、CYH 添加後 *L41-Q* の発現を誘導しなかった。以上より C-Gen4p は *L41-Q* の転写制御因子であることが示された。*C-GCN4* 破壊株は、*C-HIS5* の 3-aminotriazole (3-AT) 添加によるヒスチジン飢餓条件下における転写をも誘導できないことから *C. maltosa* におけるアミノ酸合成の普遍的制御に必要であることが示唆された。CYH または 3-AT 添加において *C-GCN4* の転写の誘導が見られた。*C-GCN4* mRNA の 5' 領域のすべての uORF の開始コドン塩基置換により破壊し、その効果をレポーター遺伝子を用いて解析したところ、C-Gen4p の生産は uORF で抑制されているが、3-AT 添加後では翻訳抑制が解除された。以上より *C-GCN4* は CYH 添加後は主に転写レベル、3-AT 添加後では主に翻訳レベルで制御されることが示された。

2. *C-GCN4* 遺伝子の制御因子 C-Gen2p の役割

*S. cerevisiae* Gen2p は *GCN4* の発現を制御する。そこで *C-GCN4* の発現制御への関与が予想された *C. maltosa GCN2* ホモログを取得し、*C-GCN2* と命名した。*C-GCN2* 破壊株は 3-AT 感受性を示したが、CYH には野生株同様誘導的耐性を示した。*C-GCN2* 破壊株における CYH 添加後の *C-GCN4*, *L41-Q* の転写の誘導レベルは野生株と変わらないが、3-AT 添加後の *C-GCN4*, *C-HIS5* の転写の誘導レベルは野生株に比べ減少した。*C-GCN4* は翻訳制御されるためレポーター遺伝子を用いて解析した結果、3-AT 添加後の *C-GCN2* 破壊株においてのみ活性は上昇しなかった。以上より CYH 耐性化とアミノ酸合成の普遍的制御は共に C-Gen4p 依存的であるが、その上流は別々の経路が働いていることを示唆した。

## 3. 新規リボソーム会合蛋白質 Ray38p の発見

細胞遺伝学研究室で見出された Ray38p は、CYH 添加後 *C. maltosa* 野生株のリボソーム画分から消失し、CYH 耐性化に伴って再び現れる。Ray38p の消失は、*de novo* の蛋白質合成を必要とせず、温度依存的なりボソームからの脱離反応によることを明らかにした。脱離反応は、CYH

添加以外の *L41-Q* の誘導条件であるアニソマイシン添加、栄養源変化でも見られたことから、*L41* リボソーム蛋白質と *Ray38p* の機能的関連が示唆された。*RAY38* 破壊株は、野生株に比べ *CYH* 添加後の *CYH* 耐性が早く起こることから、リボソームからの *Ray38p* の脱離は、*CYH* 耐性化の誘導を促進することが示唆された。

#### 4. *CYH* 誘導的耐性化の機構

*CYH* 感受性を決定する *L41* リボソーム蛋白質を中心に *CYH* 誘導的耐性化について検討した結果、*L41-P* と *L41-Q* のリボソーム上での直接の交換はなく、むしろ *CYH* 添加後 *CYH* 耐性リボソームの *de novo* の全合成が起こる可能性を示した。

#### 5. *C-GCN4* 遺伝子破壊による偽菌糸形成

二形性酵母である *C. maltosa* の *C-GCN4* 破壊株は最少培地において常に偽菌糸型生長を行うことを明らかにし、*C-Gcn4p* は栄養ダウンシフト条件下では偽菌糸形成の情報伝達を負に制御する可能性を示した。

以上、本論文は真核微生物にシクロヘキシミド耐性を付与する遺伝子の誘導機構を分子レベルで明らかにしたものであり、学術上貢献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。