

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 岩本 邦彦

生体膜の主要構成成分であるリン脂質は、均一な分布ではなく、水平方向や膜の表裏において非対称的に分布しており、細胞膜の表裏において、ホスファチジルエタノールアミン(PE)は内側に偏って分布していることが、広く生物種を越えて確認されている。この非対称分布は、エネルギー依存性のフリッパーゼによって、フリップ・フロップと呼ばれる脂質二重層間の脂質の輸送が促進されることによって形成されると考えられているが、その機構・意義については解明されていない。本論文では、遺伝学的な解析が容易な出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae*、および PE と特異的に結合する環状ペプチド Ro09-0198 (分子量 2,041) を材料として、PE の非対称分布を形成機構・意義について解析したものである。

第 1 章では、Ro09-0198 感受性と関連のある遺伝子のスクリーニングにより、PE の動態に関連する可能性のある因子の探索を行った結果について述べている。まず、Ro09-0198 に対して感受性の高い出芽酵母の変異株である S6, S10, S14 株より、それぞれの Ro09-0198 感受性を相補する遺伝子として、*VPS45*, *BEE1*, *SSD1* であることを同定した。さらに EUROPEAN SACCHAROMYCES CEREVISIAE ARCHIVES FOR FUNCTIONAL ANALYSIS (EUROSCARF)由来の、出芽酵母の約 5,000 株の遺伝子破壊株コレクションを用いた Ro09-0198 感受性を示す遺伝子破壊株のスクリーニングでは、様々な要因によって Ro09-0198 感受性を与えていると考えられる多くの因子を網羅的に取得した。

第 2 章、第 3 章では、*BEE1* の遺伝子産物 Beelp と Ro09-0198 感受性との関連について検討した結果を述べている。第 2 章では、まず、Beelp の機能として知られている cortical actin patch の形成やエンドサイトーシスと、Ro09-0198 感受性との明確な関連は認められなかった。また、トリニトロベンゼンスルホン酸 (TNBS) による細胞膜外層 PE の定量や、蛍光標識した PE の取り込みの顕微鏡観察および fluorescence-activated cell sorter (FACS) による検討では、細胞膜 PE は、*BEE1* 破壊株において、内層・外層における分布、外層から内層へのフリップ・フロップ速度の異常も認められなかった。Ro09-0198 を添加した状態での細胞観察では、電子顕微鏡により野生型株と *BEE1* 破壊株における Ro09-0198 の膜系への影響は同様であったが、アクチンを蛍光観察した結果、野生型株で観察された bud neck や small bud における塊状のアクチンが *BEE1* 破壊株では観察され

ず、これらの部位へのアクチンの集合において *Bee1p* が関与していることを示唆した。

第 3 章では、まず、Ro09-0198 をビオチン化したもの (Bio-Ro) を用いて、出芽酵母の細胞膜外層の PE を可視化することに初めて成功したことについて述べている。そして、この方法によって、出芽酵母の野生型株では 25℃の下、bud neck や small bud の細胞膜部分に蛍光が観察されることを見出した。同様に、分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* においても分裂面や細胞の先端に蛍光が観察された。CHO 細胞において、細胞分裂時の分裂溝の部分に一時的に PE が細胞膜外層に露出することが報告されていることを合わせて、細胞分裂時に分裂溝の細胞膜外層に PE が露出する現象が一般的であることを示唆した。さらに、酵母においては、分裂溝に該当する部分以外に細胞極性の向いている方向の先端部分の細胞膜外層にも PE が外層に露出していることを示唆し、局所的な PE の動態と細胞極性との関連の可能性を示唆した。また、出芽酵母に対し Bio-Ro を用いた観察を行った際、bud neck 部分に蛍光が観察される時期は、細胞周期の分裂終期以降であることを示唆した。そして、Bio-Ro を用いた観察において、*BEE1* 破壊株では野生型株と同様の部位に蛍光が観察されるが、蛍光が観察される細胞の頻度が高いことや、細胞増殖速度がより速い 30℃の下においても野生型株と異なり蛍光が観察されたことから、*BEE1* 破壊株では細胞増殖の際、アクチン細胞骨格の異常によって PE が細胞膜外層に露出する時間が長いために Ro09-0198 感受性を示した可能性を述べている。

第 4 章では、液胞への小胞輸送に関与する、*VPS45* やその他の *VPS* 遺伝子と Ro09-0198 感受性との関連の検討を行った結果を述べている。その結果、*VPS* 遺伝子の既知の機能と考え合わせると、ゴルジ体とエンドソーム間の小胞輸送に関わるものが Ro09-0198 感受性にも関わるという共通性を見出した。

以上本論文では、酵母の細胞膜外層 PE を、Bio-Ro を用いて可視化することに成功し、この方法により、細胞分裂の際に分裂溝の細胞膜外層に PE が露出する現象が種を越えて広く保存されていることを示唆した。さらに、分裂溝の部分を含め、局所的な PE の動態と細胞極性との関連の可能性を示唆し、極性の向いている先端方向へとアクチンを集合させるのに *Bee1p* の機能が必要であることを示唆したものであり、学術上貢献するところが少なくない。よって、本審査委員一同は、本論文が博士 (農学) の学位論文として価値のあるものと認めた。