

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 竹 若 剛 志

細胞内構造体である小胞体は細胞の分化、薬物処理あるいは小胞体膜蛋白質の過剰生産により量が増加することが知られている。この現象に関わる分子機構を解析することで、小胞体の維持或いは発達に関する全く新規の知見が得られるものと期待される。本論文は *Candida maltosa* 由来のアルカン資化に関わる小胞体膜タンパク質チトクローム P450 (P450ALK1) を *Saccharomyces cerevisiae* において高生産させた際に小胞体様膜構造体が発達することを確認し、この現象に関わる因子の取得を試みたものである。

第1章では P450ALK1 生産に伴い小胞体様膜構造体が発達することを電子顕微鏡観察、小胞体を染色する蛍光色素 DiOC₆ で細胞を染色した際の蛍光強度が上昇すること、菌体あたりのリン脂質リン量が増加することで示した。また、P450ALK1 生産時に小胞体内腔シヤペロンタンパク質をコードする遺伝子の mRNA 量が増加することに着目し、これらの転写を制御することが知られる小胞体膜タンパク質 Ire1p をコードする遺伝子の破壊株が作製されている。この遺伝子の破壊株では小胞体様膜構造体の発達が認められないが、異なる遺伝的背景を有する酵母でのこの遺伝子の破壊株では小胞体様膜構造体の発達が認められることから、Ire1p は遺伝的背景によっては小胞体様膜構造体の発達に関与することを明らかにした。また、Ire1p 依存性、非依存性には複数の因子が関与していることが示唆された。

第2章では、動物細胞における小胞体オーバーロードとの類似性に着目し、この際に重要な役割を果たす Ca²⁺の必要性を検討している。Ca²⁺濃度が 0.8 μM の培地を作製し、小胞体様膜構造体の発達を検討し、これには Ca²⁺が必要であることを明らかにした。また、Ca²⁺結合タンパク質であるカルモジュリンに対する Ca²⁺アンタゴニストとして機能するクロルプロマジンを用いることで、小胞体様膜構造体の発達には Ca²⁺と結合したカルモジュリンが必要であると考えられることが分かった。カルモジュリン結合タンパク質をコードする遺伝子の破壊株を検討したところ、カルモジュリンの必要性は転写因子 HAP 複合体構成因子である Hap5p を経由してのものであると考えられることが分かった。

第3章では、局在の変化するタンパク質、mRNA 量の変化する遺伝子を解析することで糸口がつかめる可能性を考え、二次元電気移動、cDNA サブトラクションにより候補の検索を行っている。S100 画分を用いた二次元電気泳動より HSP90 ファミリーに属するシヤペロンタンパク質 Hsc82p が P450ALK1 生産に伴い局在が変化すること、cDNA サブトラクションより HSP70 ファミリーに属するシヤペロンタンパク質 Sse1p をコードする遺伝子の mRNA 量が P450ALK1 生産により増加することを明らかにした。Hsc82p をコードする遺伝子の破壊株では小胞体様膜構造体の発達が認められると考えられることから、Hsc82p は直接 P450ALK1 生産に関与する可能性が低いことが分かった。Sse1p をコードする遺伝子の破壊株では P450ALK1 mRNA 量が減少することから、P450ALK1 mRNA

量に影響を及ぼしていると考えられることが分かった。

第4章では、小胞体膜タンパク質が増加したという情報は小胞体膜タンパク質により感知される可能性を考え、機能未知の小胞体膜タンパク質をコードする遺伝子の破壊株での小胞体様膜構造体の発達を検討している。機能未知の小胞体膜タンパク質 *Yet1p* が小胞体様膜構造体の発達に関与することを明らかにした。*Yet1p* のホモログのうち、*Ymr040wp* は小胞体様膜構造体の発達に関与すること、*Ydl072c* は関与しないことを明らかにした。また、*YET1* 破壊株はコリン感受性になることを明らかにした。*YET1* 破壊株に培地中のコリンを利用する経路に関わる酵素をコードする遺伝子の破壊を導入してもコリン感受性が抑圧されないことを明らかにした。

以上本論文は、これまで不明であった *P450ALK1* 生産に伴う小胞体様膜構造体の発達に関与する分子機構の解析を試み、新たに小胞体膜タンパク質 *Yet1p* の関与を明らかにし、これが膜リン脂質合成にも関与している可能性を示したものであり、学術上、応用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のあるものと認めた。