

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 洪 思 鉉

生体膜は極めて多種類の脂質を含み、中でもリン脂質は膜構造の形成、維持に重要な役割を果たしている。更に最近では、受容体からのシグナル伝達におけるセカンドメッセンジャー生産にも関わっていることも明らかにされており、リン脂質は単に二重膜の形成といった構造的な役割を持つだけでなく、実に多様な生体機能と結びついている。この場合セカンドメッセンジャーの生産はホスホリパーゼにより行われる。ホスホリパーゼはリン脂質の切断部位によってホスホリパーゼ A、ホスホリパーゼ B、ホスホリパーゼ C、ホスホリパーゼ D に分類される。このようなホスホリパーゼにより分解されたリン脂質の分解産物は細胞の中で様々な役割を果たしている。本論文は、そこでホスファチジン酸やリゾホスファチジルコリン等を生産するホスホリパーゼ D (PLD)と細胞質ホスホリパーゼ A₂ (cPLA₂)をコードする遺伝子を糸状菌 *Aspergillus nidulans* から単離し、糸状菌の特異的な性質である菌糸の先端生長、胞子形成器官の分化における役割を分子レベルで解析したものである。

第1章ではホスホリパーゼ D 遺伝子の単離とその機能解析を行っている。申請者は以下の研究結果を得た。PLD をコードする遺伝子を *A. nidulans* よりクローニングし、*pldA* と命名した。この遺伝子は 832 アミノ酸よりなるタンパク質をコードし、イントロンは 7 か所存在した。予想されるアミノ酸配列には、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* から human の PLD に至るまで高度に保存されている PLD 活性に必要な二つの HKD モチーフや、リパーゼ活性を持つタンパク質によく保存されている GGGR モチーフ、GSRS モチーフなど 4 つの領域をコードする部分が存在した。*pldA* のコードするタンパク質 PldA は *S. cerevisiae* の Spo14p、*Candida albicans* の Pld1p と 4 つの領域に対して 25.4%から 43.5%の相同性を示した。また、蛍光標識したホスファチジルコリン(PC)のアナログである NBD-PC やホスファチジルエタノールアミン(PE)のアナログである NBD-PE を基質として、破壊株と野生株の細胞抽出液中の PLD 活性を測定し、PE に対する活性のみが 1/4 以下に低下することを示した。さらに、この差はエタノールを炭素源とした培地で培養した場合に大きく、また、高浸透圧培地で培養した菌体ではさらに大きいことを示した。以上の結果は、PldA は PE に対して高い活性を有し、細胞外の浸透圧によって活性が誘導されることを示すものである。また、破壊株に NBD-PC に対する PLD 活性を観察して、*A. nidulans* には他の PLD をコードする遺伝子が存在するものとした。

第2章ではホスホリパーゼ A₂ 遺伝子の単離とその機能解析を行っている。申請者は cPLA₂

をコードする遺伝子を *A. nidulans* よりクローニングし、*plaA* と命名した。また、この遺伝子について以下のことを明らかにした。この遺伝子は 837aa よりなるタンパク質をコードすることが予想され、イントロンを持たなかった。そのアミノ酸配列には現在まで報告された哺乳類の cPLA₂ に保存されている GGGR, GXSGX モチーフなどリパーゼ活性を持つ領域を確認した。*plaA* の発現量はラクトース、グルコースを炭素源とした最少培地で他の培養条件より高いことをノーザン解析によって示した。さらに、*PlaA* の活性中心を含む部分を酵母で発現させて ¹⁴C 標識 PC や PE を基質として活性を測定し、この遺伝子産物は PC より PE に対する活性が高く、その活性は Ca²⁺非依存性であることを明らかにした。

plaA を *A. nidulans* の *alcA* プロモーターの下流でつないだ *plaA* の高発現株では野生株に比べてより多くの子嚢胞子（有性胞子）を形成したことから *plaA* は有性生殖において機能を持つことが示唆された。また、高発現株ではリノール酸の割合が増加した。*A. nidulans* ではリノール酸由来の物質であるプサイファクター (precocious sexual inducers, hydroxylated linoleic acid molecules) が有性生殖を促進することが知られている。そこで *PlaA* はリノール酸の含量の制御を通して有性生殖に関わる可能性があることを示した。

以上本論文は、糸状菌における生理的に重要と思われるリン脂質分解酵素の遺伝子を単離し、その機能を解析したもので、膜リン脂質の代謝が糸状菌の生育と性的再生産に重要な働きを有していることを示唆したものであり、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。