

論文審査の結果の要旨

氏名 多田智子

本論文は2章からなり、第1章は、Mid1の機能に重要なアミノ酸残基および領域の特定を試みた結果について述べられ、また、第2章では、Mid1と出芽酵母の推定上の電位作動型Ca²⁺チャネルホモログであるCch1との関係についての解析結果について述べられている。

出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) は性フェロモンである α -factorの作用によって性接合可能な細胞 (shmoo) に分化する。その過程にはCa²⁺の流入が必要であり、*mid1*変異体は α -factor作用後のCa²⁺の流入に欠損を持つために致死性を示す株として単離された。1999年に飯田らのグループによってMID1遺伝子産物は真核生物において世界で初めて、膜の伸展によって開く伸展活性化Ca²⁺チャネルであると特定された。伸展活性化イオンチャネルは、微生物では浸透圧調節、植物では重力感知、動物ではそれらに加えて聴覚、触覚などに関与していることが知られているものの、膜電位作動型やリガンド作動型のイオンチャネルにくらべて知見が少ない。特に真核生物の伸展活性化イオンチャネルは構造、機能部位、伸展感受機構などほとんど何も分かっていない。Mid1は既知のイオンチャネルと相同性を持たず、新規イオンチャネルである可能性が高い。同時に、未だ知見の少ない真核生物の機械刺激感受機構を分子レベルで解析できる興味深いタンパク質である。このような背景のもと、第1章では、Mid1の機能に重要なアミノ酸残基および領域の特定を試みた。また、第2章では、Mid1と出芽酵母の推定上の電位作動型Ca²⁺チャネルホモログであるCch1との関係を解析した。最近、Mid1とCch1は性接合過程におけるCa²⁺流入に共に関与することが明らかになり、その相互作用が示唆された。したがって、Mid1とCch1の関係を解析することはMid1の機能の解析に重要である。しかし、*CCH1*遺伝子のクローニングが大腸菌で行えないため、Cch1の解析は困難であった。そこで、本申請者は酵母を用いて*CCH1*遺伝子のクローニングを行い、高発現系によるMid1とCch1との関

係の解析および GFP 融合タンパク質を用いた局在の観察を行った。

第 1 章において、Mid1 の H3 及び H4 領域は Mid1 の Ca^{2+} 透過活性に必要であるということが明らかになった。既知のイオンチャネルの構造と機能の相関をふまえて、H3 領域はフィルターおよび細胞外ループに相当し、H4 領域は α ヘリックスで膜を貫通するインナーヘリックスであると予想した。D341E、F356S、C373D および C373E の顕著に Mid1 活性が低下する点変異を特定した。特に、F356S 変異 Mid1 は Ca^{2+} 透過活性は損なわれていないが、生存率の維持機能が失われているという興味深い表現型を示した。この結果より、Mid1 は Ca^{2+} 取り込みとは独立に、 α -factor 添加後の生存率を維持する役割があるという新たな知見を得た。これらの変異 Mid1 は局在、安定性、発現量に変化したのではなく、Mid1 活性そのものが変化したということを確認している。第 2 章では、Mid1 と Cch1 の解析より、性接合過程において、 Ca^{2+} の流入には Mid1 と Cch1 の両方が必要であることを明らかにした。対数増殖期および性接合過程初期の細胞において Mid1-GFP と Cch1-GFP は細胞膜と ER 膜に局在していた。急速な Ca^{2+} の流入が必要なくなった α -factor 添加 4 時間後の細胞において、Mid1-GFP は shmoo の接合突起に、Cch1-GFP は細胞内に局在が観察された。これは、Mid1 は shmoo の接合突起において Cch1 非依存的な役割があることを示唆している。また、 α -factor 添加 8 時間後には Mid1 と Cch1 は細胞内に集積して存在していた。これらの結果は Mid1 の機能解析、存在量によるチャネル活性の制御機構および酵母の性接合過程の解明に大いに貢献するものと考えられる。

なお、本論文の第 1 章は、大森正之、飯田秀利との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。