

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 海野 研二

麹菌 *A. oryzae* の分泌酵素である RNaseT1 を酵母 *S. cerevisiae* により発現させると、生育阻害が観察される。単コピープラスミドで発現誘導した場合宿主酵母の生育は阻害されないが、このような条件下でも生育が阻害される RNaseT1 発現感受性 (ribonucleaseT1 expression sensitive; *rns*) 変異株 (GN1~GN38) が単離されている。現在までに、GN14 (*rns1*)、GN1 (*rns2*)、GN3 (*rns3*) 株の変異遺伝子がそれぞれゴルジ体-小胞体間の逆行輸送に関与する *DSL1*、異常分泌タンパク質の分解に関与する *UMP1*、及び α -SNAP をコードする *SEC17* であることがわかっている。本論文は、GN29(*rns4-1*) 株の変異遺伝子の同定を行なうと共に、RNaseT1 発現感受性の機構について細胞生理学および遺伝学的に解析したものであり、3章からなっている。

第1章では、*rns4* 変異株の変異遺伝子の同定を行った。種々の薬剤に対する *rns* 変異株の感受性を検討した結果、GN29 株がツニカマイシンに対して感受性を示すことを見出し、この性質を利用して GN29 株に酵母ゲノムライブラリーを導入し、相補する DNA 断片の塩基配列から *VPS32/SNF7* と同定した。*VPS32/SNF7* を GN29 株で発現させた結果、RNaseT1 発現感受性、ツニカマイシン感受性、及び炭素源ラフィノース培地での生育欠損をすべて相補した。

第2章では、*rns4* 変異株の表現型解析の詳細な解析を行った。また、GN29 株の RNaseT1 発現感受性の機構を解明するため、*Rns4/Vps32* と相互作用することが知られている *Vps24*、*Vps4*、*Vma6*、*Rim13*、*Rim20*、*Ygr122w*、及び *Ydr541c* をコードする遺伝子の破壊株について RNaseT1 発現感受性を調べた。その結果、Multivesicular body (MVB) ソーティング経路の下流で機能する ESCRT-III の構成因子 *Vps24* と AAA-ATPase である *Vps4* をコードする遺伝子の破壊株のみが RNaseT1 発現感受性を示すことを見出した。そこで、MVB ソーティング変異株の RNaseT1 発現感受性と外界ストレス (200mM CaCl_2 、pH8.0、1M NaCl) 感受性との関連を調べたところ、*rns4/vps32* 破壊株のみが RNaseT1 発現感受性と共に上記の外界ストレスに感受性を示すことがわかった。さらに、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から、GN29 株は富栄養・非ストレス条件下において、窒素源飢餓応答等のストレス応答関連遺伝子の発現上昇を見出した。一方、RNaseT1 の細胞内局在を観察するため、不活性型 RNaseT1*-GFP 融合タンパク質を作製し発現させたところ、野生型株では窒素源飢餓や低温処理等のストレス条件下でのみ GFP 蛍光の液胞への局在が観察されたのに対し、GN29 株では、ストレスの有無に関わらず、RNaseT1*-GFP 融合タンパク質が液胞と小胞体に局在することが観察された。

第3章では、RNaseT1 発現感受性機構を解析するために、DNA マイクロアレイを使用して網羅的遺伝子発現解析を行った。*GALI* プロモーター制御下で RNaseT1 を発現誘導する単

コピープラスミドを導入した野生型株を炭素源グルコースの選択培地で対数増殖期まで増殖させ、ガラクトース培地に移し、2時間及び4時間 RNaseT1 を発現させた菌体の mRNA を使用し、解析を行なった。1.5 倍以上発現が上昇した遺伝子のうち、タンパク質輸送に関連する遺伝子として *BFR1*、転写因子関連遺伝子として *CIN5* 及び RNA ポリメラーゼ III (Pol III) の転写制御因子 TFIII B の構成因子をコードする *BDPI* が含まれていた。これらの結果から、野生型株で RNaseT1 を発現させた場合、tRNA などの PolIII 転写産物の 1 本鎖 RNA 領域が切断されている可能性を考察した。

また、富栄養条件下における *rns1/dsl1* 変異株の網羅的遺伝子発現解析を行なった結果、野生型株に比べ 2 倍以下に発現が低下した 229 個の遺伝子中に、野生型株で RNaseT1 を発現させたときに *CIN5* と共に発現上昇する *BNA1*、*TDH1*、*CPS1*、*UGA4*、*MEP2* などが含まれていた。*Cin5* は *Rns1/Dsl1* と相互作用することから、これらの遺伝子は *Cin5* の制御下にある可能性があり、RNaseT1 発現に対する防御に関与していると考えられた。

以上、本論文は、酵母の RNaseT1 発現感受性変異株の変異遺伝子を同定し、その機能を解析したものであり、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あるものと認めた。