

[ 別紙 2 ]

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 今井 啓太

真菌類の生存生育に必須な細胞壁は、環境に接する細胞の最外層として、細胞を守り、形態を規定し、物質の摂取・排出の関門となっている。主成分は多糖類と糖タンパク質であるが、外的環境や細胞周期に応じて動的に変化する。発酵醸造など応用上並びに抗真菌剤の標的として重要でありながら、細胞壁には未解明の点が多い。本論文は、細胞壁に作用する色素への耐性から新規小胞体膜タンパク質 **Rcr1** を発見し、詳細に解析して得た成果をまとめたもので、序論と2章からなっている。

序論では、細胞壁に関するこれまでの重要な知見をまとめている。

第一章では、**RCR1** 遺伝子の取得と産物の解析について述べている。出芽酵母 *erd1*  $\Delta$  破壊株は、糖鎖修飾に欠陥をもち、色素 Congo red に高感受性を示す。Congo red 感受性を多コピーで抑制する遺伝子として機能未知の *YBR005w* を取得した。しかし、糖鎖修飾不全など *erd1*  $\Delta$  破壊株の他の表現型は抑制されず、野生株や様々な変異株でも Congo red 耐性を認めた。そこで本遺伝子を **RCR1** (**r**esistance to **C**ongo **r**ed **1**) と名付けた。これと対応して *rcr1*  $\Delta$  破壊株は Congo red 高感受性を示した。

**RCR1** は 213 アミノ酸の一回膜貫通型タンパク質をコードする。46%相同の *YDR003w* が存在し、これを **RCR2** と名付けたが、**RCR1** のような機能はなかった。間接蛍光抗体染色及び遠心分画により、**Rcr1** は細胞壁ではなく小胞体に局在することが分かった。Congo red 耐性化には膜貫通領域と C 末側の細胞質側領域で十分であった。興味深いことに、**Rcr1** の C 末側細胞質領域を **Rcr2** と交換しても機能を持っていた。

出芽酵母細胞壁のどの成分が Congo red の真の標的か確定されていなかった。そこで細胞壁に欠陥を持つ遺伝子破壊株約 200 株を調べたところ、ほとんどは野生株より Congo red 感受性で多コピー **RCR1** により耐性化した。ところが、細胞壁キチンの 90% を合成するキチン合成酵素 III をコードする *CHS3* とその制御遺伝子 (*CHS4*~*CHS7*) の破壊株は Congo red に耐性で、多コピー **RCR1** でもそれ以上に耐性化しなかった。**RCR1** 多コピー株の細胞壁では、アルカリ可溶グルカンは変化ないが、キチンが減少しており、*rcr1*  $\Delta$  破壊株ではキチンが増加していた。Calcofluor white でキチンを染色すると、**RCR1** 多コピー株では出芽環と出芽痕は染色されたが細胞壁全般はほとんど染色されなかった。以上の結果から、Congo red の主標的は細胞壁キチンであると結論した。

第二章では、**Rcr1** と結合するタンパク質の研究結果がまとめられている。上の結果から **Rcr1** に *Chs3* を調節する機能があると考えられた。しかし *Chs3* 始め *Chs5*、*Chs7* などの

局在と量は *RCR1* 多コピーでも変化せず、*Rcr1* とのあいだの結合も認められなかった。一方、免疫沈降により、*Rcr1* と、小胞体の O 糖鎖修飾酵素 *Pmt4* 及び E3 ユビキチンリガーゼ *Rsp5* が共沈した。また、*Rcr1* の C 末側細胞質側領域をベイトにした two-hybrid スクリーニングで *Rsp5* 及び機能未知の *Ynl144c* が取得された。*Rsp5* と *Ynl144c* は *Rcr2* とともに結合した。*Pmt4* との結合には膜貫通領域が、WW ドメインを 3 つもつ *Rsp5* との結合には 2 つの PXY 配列のうち PEY が、*Ynl144c* との結合には PPSY が、それぞれ必須であった。第 2 の結果は PPXY が *Rsp5* との結合に必要という常識に反するものである。しかし、*pmt4*  $\Delta$  破壊株においても *RCR1* による Congo red 耐性化がおこり、2 つの PXY 配列を破壊した *RCR1* もその機能を持つことから、これらの結合は Congo red 耐性には関係がない。但し、*RCR1* 多コピー株では膜局在 *Rsp5* が増加しており、*Rcr1* は、*Rsp5* を小胞体膜へリクルートすることで別の役割を果しているとも考えられる。*Ynl144c* は 2 個の PPXY と 3 個の PXY 配列を持つ希有なタンパク質で、これらを介したタンパク質結合ネットワークの存在が予想される。

以上、本論文は、細胞壁キチン量を制御する小胞体の膜タンパク質 *Rcr1* を発見し、性質を解明し、そのタンパク質間相互作用についても多くの新知見を明らかにしたものであって、学術上応用上寄与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。