

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 北垣 浩志

酵母の細胞壁は、細胞を外界から守るとともに物質や情報の授受に関わるが、醸造においても清酒酵母の高泡形成やビール酵母の凝縮性に関与するなど重要な役割をもっている。本論文は、この酵母細胞壁の形成に関わる新規なタンパク質の分子生物学的研究をまとめたもので、5章からなっている。

第1章の序論では、酵母細胞壁の組成・構造・生合成に関して、研究開始時までの知見、未解明の問題点についてまとめ、本論文の研究で行われたタンパク質の単離による生化学的解析と、ゲノム情報に基づく遺伝学的解析の意義が述べられている。

第2章では、静置培養時に特異的な細胞壁タンパク質 Tir1p/Srp1p について解析した。酵母溶解酵素である *Rarobacter faecitabidus* protease で酵母細胞壁を処理すると、静置培養した酵母から 100kDa のタンパク質が遊離されるが、振盪培養した酵母からは見出されなかった。これを精製し、アミノ酸配列を決定したところ、低温ショックや嫌気培養で誘導される遺伝子として見つかった TIR1/SRP1 遺伝子にコードされていることが判明した。この産物は、細胞質膜のタンパク質と考えられてきたが、分離した細胞壁から β -1,3-グルカナーゼ処理によって溶出され、 β -1,6-グルカンが結合していることなどから、実際には細胞壁グルカンに共有結合しているタンパク質であることを明らかにした。

第3章では、定常期に主要な細胞壁タンパク質となる Sed1p について解析した。上記と同様に分離精製した 206kDa のタンパク質が、そのアミノ酸配列から *SED1* 遺伝子の産物であることを明らかにした。*SED1* は、小胞体内腔タンパク質の局在に欠陥をもつ *erd2* 変異の多コピー抑制遺伝子として見出されていたが、Sed1p は分泌と GPI アンカー付加のためのシグナル配列をもち、セリン・スレオニンに富むタンパク質である。エピトープ標識した Sed1p が単離した細胞壁に結合しており、 β -1,3-グルカナーゼ消化で遊離されることから、細胞壁を構成するタンパク質であることを確認した。*SED1*mRNA の発現は、培養

の定常期に増加し、細胞壁の存在量も増加した。遺伝子破壊株は、対数増殖期には変化がないが、定常期に細胞壁溶解酵素に高感受性になったことから、定常期における細胞壁の分解抵抗性に寄与することが示唆された。

第4章では、機能未知の遺伝子がコードする新規膜タンパク質を同定し解析した。GPI アンカー中間体として細胞表層に輸送された細胞壁タンパク質は、糖転移反応によって細胞壁の β -1,6-グルカンを介し β -1,3-グルカンに結合する。この反応に関わる酵素はこれまでの研究ではまったく明らかになっていない。酵母ゲノムデータベースを検索し、*Bacillus circulans* の α -1,6-mannanase と相同的なタンパク質をコードする、*DFG5* と *YKL046c* を発見した。これらは、ともに GPI アンカータンパク質と予想され、それぞれの単独の遺伝子破壊株は生育可能であったが、 $\Delta ykl046c$ は細胞壁溶解酵素に高感受性になったことから、*DCW1*(*Defective Cell Wall 1*)と命名した。 $\Delta dcw1 \Delta dfg5$ 二重破壊は致死的であったことから、両遺伝子産物の機能は重複しており、少なくとも一方の存在が必須であることが明らかとなった。遺伝子発現を抑制すると、細胞は大きく丸くなり、キチン含量が増加し、細胞壁タンパク質が培地に漏出した。エピトープ標識によって、両遺伝子産物が GPI アンカー型タンパク質であり、膜画分に存在することを示した。

第5章では、PCR により *DCW1* 遺伝子に変異を導入し、 $\Delta dcw1 \Delta dfg5$ 二重破壊株にプラスミドで存在させることで、温度感受性変異株 DC61 を単離した。37°Cで培養すると、ほとんどの細胞は母細胞の20%以下の断面積の芽をもつ状態で増殖を停止した。DNA 含量1Nの細胞の割合は減少したが、単核であり、Spindle Pole Body(SPB)の分離はみられず、DNA複製後 SPB 分離前で細胞周期が停止していると考えられた。小さな芽の表層にはキチンが集積し、液胞のアルカリ性ホスファターゼが活性染色で反応することから、芽の細胞壁が脆弱になっている。すなわち、Dcw1p と Dfg5p は、細胞周期の進行と共役する芽の細胞壁の生合成において、必須の役割をもっていることが明らかになった。

以上、本論文は、酵母の細胞壁を構成する主要タンパク質と、細胞壁の形成に関わる必須な膜タンパク質を発見し、それぞれの特徴を明らかにしたもので、学術上ならびに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。