

論文審査の結果の要旨

氏名 石原聡

本論文は、四章からなる。その内容については以下のとおりである。

配偶子形成は有性生殖を行う真核生物に共通する生命現象である。単細胞真核生物である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の倍数体は、栄養が枯渇した際に減数分裂を行って配偶子を形成し、次世代ゲノムを保護するために孢子壁と呼ばれる堅牢な構造体を構築する。減数分裂時に形成される孢子壁には配偶子を外的環境変化から保護する機能があると考えられて来ている。これまでの研究から、出芽酵母の孢子壁形成に必須なタンパク質として、孢子壁形成の出発点となる中心体に局在するタンパク質、輸送に関わるタンパク質、キチンやジチロシンなどの多糖類の合成酵素などが必須であると報告されてきた (Valdivieso et al. 1991; Neiman, 1998; Briza et al. 1988; Knop and Strasser, 2000; Tachikawa et al. 2001; Felder et al. 2002; Coluccio et al. 2004)。しかし、グルコースのポリマーである 1,3-β-グルカン (以下、グルカン) については孢子壁の主要な構成成分であるにも関わらず孢子壁形成における重要性を表す知見はほとんどなかった。出芽酵母のグルカン合成酵素に関する研究は、従来は体細胞分裂時の細胞を用いて行われており、細胞膜に局在する触媒サブユニット Fks1p、Fks2p (Inoue et al. 1995; Mazur et al. 1995) が酵素活性を担うことが明らかになっている。申請者は博士課程において、グルカンの孢子壁形成時の局在を調べることから研究を始め、孢子壁形成時のグルカン合成に関わる研究を行った。出芽酵母のグルカン合成酵素触媒サブユニットをコードする遺伝子 *FKS1* 及び *FKS2*、そして *FKS1* と *FKS2* に相同性がある機能未知遺伝子 *FKS3* に着目し、それぞれの遺伝子が孢子壁形成時に果たす役割について解析を行った。

1章 孢子形成過程におけるグルカンの局在

孢子壁は体細胞分裂時の細胞壁と類似の成分で構成される内側の二層と孢子壁特異的な成分で構成される外側二層から成り、生化学的な解析からグルカンは主に内側の層を構成して孢子壁乾重量の約 55% を占めることが報告されている (Briza et al. 1988)。この結果からグルカンは孢子壁の機能を果たす上で重要な成分であろうと予想し、抗グルカン抗体による免疫電顕で孢子壁形成時におけるグルカンの局在を調べた。その結果、前孢子膜にはグルカンは存在せず、孢子壁の成熟に従って孢子壁の内側に存在するようになり、さらに孢子壁が厚くなると孢子壁全体にグルカンのシグナルが観察された。

2章 グルカン合成酵素の触媒サブユニットの発現と遺伝子破壊株の表現型

出芽酵母のグルカン合成酵素の触媒サブユニットをコードする遺伝子には 2 つの遺伝子 (*FKS1*、*FKS2*) が知られており (Mazur et al. 1995)、それに加えて機能未知な相同遺伝子

(*FKS3*)がゲノム上に存在している。これらの遺伝子の発現を、酵母野生型株である SK1 株を用い、減数分裂を同調した細胞から mRNA を抽出してノーザンブロットにより解析した。*FKS1* の転写量は減数分裂の進行とともに減少することがわかった。*FKS2* の転写量は孢子形成培地に移すと徐々に上昇していた。一方、*FKS3* の転写は体細胞分裂時には観察できないが孢子形成培地に移すと転写が上昇した。このことから、減数分裂時には *FKS2* と *FKS3* の転写が上昇して、*FKS1* の転写は抑制されることが明らかになった。

次に、それぞれの遺伝子破壊変異をホモで持つ二倍体で作成し、減数分裂および孢子壁形成過程の表現型について調べた。いずれの株も染色体分配、前孢子膜形成までは正常に進行していたが、孢子の形態を電子顕微鏡で観察したところ、*fks2* 株と *fks3* 株で特徴的な表現型が観察された。野生型株の孢子では孢子壁が均一な厚さの壁が形成されるのに対して、*fks2* 株の孢子では外周部にチューブ状の構造体が見られ、孢子壁が不均一であることがわかった。*fks3* 株の孢子では孢子内の一部が孢子壁に貫入したり、壁が部分的には肥大化したり薄くなるなどの異常な孢子壁が観察された。それに対して *fks1* 株の孢子では野生型と同様の孢子壁を示していた。孢子は体細胞分裂時の細胞と比較してエーテルなどのストレスに耐性になることが報告されている (Dawes and Hardie, 1974)。そこで孢子形成後の細胞をストレス条件下におき、時間経過ごとにプレートに撒きストレスに対する感受性を測定した。*fks2* 株、*fks3* 株が生成する孢子はヒートショック、エタノール、エーテルなどのストレスに感受性を示し、これらの刺激を与えた後に孢子を発芽させると、野生型の孢子と比べて孢子的生存率が著しく低下した。一方、*fks1* 株が生成する孢子はこれらのストレスに対して野生型と同様の生存率を示した。また、*fks1fks3*、*fks2fks3* 二重破壊株では *fks3* 株と同程度の生存率で、二重破壊による相乗的な効果はなかった。以上の結果から、体細胞分裂時の栄養増殖において主に機能している *FKS1* は孢子形成時にはあまり機能していないのに対して、*FKS2*、*FKS3* は減数分裂時に発現して孢子壁の形成には重要な機能があることが示唆された。

3章 *FKS2* の孢子壁形成に関わる機能

FKS2 の孢子壁形成に関わる役割を遺伝学的な相互作用から調べた。*fks2* 株に *FKS1*、*FKS2*、*FKS3* の 3 種類の遺伝子を持つハイコピープラスミドを導入して、孢子形成後の細胞がストレス感受性を相補できるかどうかを調べた。すると、*fks2* 変異は *FKS2* の過剰発現によって相補されるだけでなく、*FKS1* を過剰発現することによって部分的に抑圧された。この結果から、*FKS1* と *FKS2* の遺伝子産物の間には重複する機能があると考え、*FKS2* の減数分裂における機能は *FKS1* が体細胞分裂時に果たしている機能、すなわちグルカン合成と同一ではないかと考えた。そこで、減数分裂で発現する *FKS2* のプロモーターの下流に *FKS1* の ORF 部分をつなぎ、このキメラ遺伝子が果たして *fks2* 変異を抑圧するかどうかを調べることにした。キメラ遺伝子を持つプラスミドをゲノム上の *FKS1* と *FKS2* を欠損した株に形質転換して、孢子形成後のストレス感受性を調べたところ、*FKS2* プロモーターに *FKS1* を持つ株の孢子は、ストレスに対して野生型とほぼ同じ生存率を示した。一方、*FKS1* プロモーターに *FKS2* 遺伝子を持つ株の孢子はストレスに感受性を示し生存率が低下した。以上の結果から、発現するタンパク質が Fks1p でも Fks2p でも生存率に大きな差はなく、正常な孢子壁形成には *FKS2* プロモーターによるグルカン合成酵素をコードする

遺伝子の転写が重要であることが明らかになった。

4章 FKS3の胞子壁形成に関わる機能

FKS3はグルカン合成酵素の触媒サブユニットをコードする遺伝子のホモログであるが、これまでFKS3が持つ機能については明らかではなかった。しかし、*fks3*遺伝子破壊株が胞子壁形成時に表現型を示したことから、さらに詳しく解析することにした。まず、減数分裂時のFks3pの局在を間接蛍光抗体法で調べた。Fks3pにHAタグを融合した遺伝子を発現して、抗HA抗体を用いて局在を調べたところ、減数分裂の進行に伴い胞子壁付近に局在していた。次に、遺伝学的な関係を調べたが、*fks3*株にFKS3の過剰発現した胞子でのみ生存率の回復が見られ、FKS1、FKS2の過剰発現では感受性を示した。このことからFks3pはFks1pやFks2pとは異なる機能を持つと予想した。これまでの研究から、触媒サブユニットFks1p、Fks2pは*in vitro*でグルカン合成酵素活性が報告されている(Inoue et al. 1995)が、Fks3pが果たしてグルカン合成酵素活性を持つかどうかに関する知見はなかった。そこで、栄養増殖時にFks3pが発現するようにプロモーターをFKS1に置換したキメラ遺伝子(*pFKS1-FKS3*)を作成し、Fks3pのグルカン合成機能を検証した。*pFKS1-FKS3*を導入した細胞から膜画分を単離し、*in vitro*のグルカン合成を指標にしたプロダクトエンタラップメントでグルカン合成酵素活性を検討したが、活性は見られなかった。しかし、グルカン合成酵素の温度感受性株(*fks1-1154 fks2*)に*pFKS1-FKS3*を過剰発現したところ制限温度において致死性を回復した。これまで、*fks1-1154 fks2*変異株の温度感受性を多コピーで抑圧する遺伝子として7つのグルカン合成酵素の上流で働く因子をコードする遺伝子が報告されている(Sekiya-Kawasaki et al. 2002)。そこで、*pFKS1-FKS3*がFKS1やその上流の因子に正に働く機能があるかもしれないと考えて、細胞あたりのグルカン量とグルカン合成酵素活性を検討した。制限温度で*fks1-1154 fks2*株を観察すると芽の先端にグルカンが局在できないが、*pFKS1-FKS3*の発現により相補されてグルカンの局在が観察できた。さらに、グルカン特異的な染色試薬で細胞全体のグルカン量を計ったところ、グルカン量が低下する*fks1-1154 fks2*株と比べて、*pFKS1-FKS3*を発現した株ではグルカン量が野生型程度にまで回復していた。しかし、*in vitro*のグルカン合成酵素活性は*fks1-1154 fks2*株と同程度で、グルカン合成酵素活性へ直接の影響はなかった。最後に、グルカン合成酵素の制御サブユニットであるRho1p(Qadota et al. 1996)との関係を調べた。活性化型のRho1pを発現しても、*pFKS1-FKS3*を発現しても同様にグルカン量は増加したが、両者を同時に発現したところ相乗的な効果がなく、それぞれを単独で発現した場合と同程度であった。以上の結果から、Fks3pにグルカン合成酵素活性はないが、Rho1pの活性化を介してFks1pにポジティブに働く機能があると予想した。

なお、本論文は石原聡、浅川昌代、平田愛子、野上識、大矢禎一の共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析およ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。