

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 荒井 斉 祐

真核生物の様々なオルガネラは、細胞内を区切って高度な細胞機能を担い、細胞分裂に伴って適切に娘細胞に引き継がれる。非対称な細胞分裂を行う出芽酵母において、オルガネラはアクチンケーブル上を走るクラス V ミオシンにより娘細胞に運ばれ、液胞・ミトコンドリア・ペルオキシソームでは、これらとミオシンをつなげる分子も明かにされている。本論文は、これまで未知であったゴルジ体の分配に関わる分子を発見し、詳細な機能解析を通じて、ゴルジ体インヘリタンスの分子機構を明らかにしたものである。

第一章では、ゴルジ体膜に局在する Ret2 と Ypt11 の結合について述べている。小胞輸送で機能する Ypt/Rab ファミリータンパク質 10 種と、逆行輸送小胞を形成する COP I コート複合体の構成成分でゴルジ体膜に多く局在する Ret2 の結合を検討した。Ypt1, Ypt6, Ypt11, Ypt32, Sec4 と Ret2 が結合し、中でも Ypt11 と Ret2 の結合が最も強かった。Ypt11 は Myo2 と結合しミトコンドリアの分配に関わると報告されており、ゴルジ体の分配に Ret2-Ypt11 複合体に関わることを予想した。

第二章では、Ypt11 の過剰発現や遺伝子欠損がゴルジ体の細胞内局在に及ぼす影響について述べている。ゴルジ全般に局在する Ret2、early ゴルジの Ochl、late ゴルジの Sft2 の局在を蛍光顕微鏡で観察した。3 つのマーカーは、野生株と *ypt11* 欠損株において母細胞と娘細胞に均等に、典型的なゴルジ体ドットとして観察された。GAL プロモーターにより Ypt11 を過剰発現すると、これらのマーカーが娘細胞に偏って局在する細胞が多数観察された。Myo2 と結合しない Ypt11 変異体を過剰発現しても、全てのマーカーの娘細胞への集中は観察されなかった。次に、Error-prone PCR 法で *RET2* 全長にランダムに変異を導入し、Ypt11 との結合能が低下した *ret2-ul* 温度感受性変異株を取得した。この変異株において Ret2、Ochl、Sft2 の局在は野生株と変わらないが、Ypt11 を過剰発現しても娘細胞への集中が全く起きなかった。このとき Ypt11 の局在やアクチン染色像に異常は見られず、ミトコンドリアの娘細胞への集中も観察された。

次に、late ゴルジマーカーの表在性膜タンパク質 Sec7 の局在を調べた。類似の late ゴルジマーカー Sft2 と異なり、Sec7 は野生株で細胞周期の一時期に娘細胞に偏って局在する。*ypt11* 欠損株ではこの Sec7 の娘細胞偏在がまったく起こらなかった。さらに、Myo2 との結合能が低下した *ypt11* 変異株、及び Ypt11 との結合能が低下した *ret2-ul* 変異株において、Sec7 の娘細胞偏在は殆ど認められなかった。以上より、Ypt11 が、Myo2 と Ret2 を仲介する分子としてゴルジ体のインヘリタンスに関与している事が強く示唆された。

第三章では、GFP 標識した Sec7 の生細胞観察について述べている。ゴルジ体の娘細胞へ

のアクチン依存的インヘリタンスに Ret2-Ypt11 が関与しているなら、それは母細胞から娘細胞にゴルジが移動する過程か、運ばれたゴルジを娘細胞に繫留しているのか、またはその両方かを明らかにする為、野生株および *ypt11* 欠損株における、Sec7 の動きを生細胞タイムラプス観察により比較検討した。野生株においては、Sec7 が母細胞から娘細胞へ極性をもつ軌跡を示す細胞が観察された。それに対し、*ypt11* 欠損株で Sec7 は動きが殆ど無く停止したままであった。さらに、アクチン重合阻害剤 Lat-A で処理した細胞では、*ypt11* 欠損株と同様に殆ど停止したままであった。次に、FLIP で Sec7 の動きを定量的に解析した。FLIP は、調べたい領域外のブリーチを繰り返し、調べたい領域に残る分子の蛍光量を測定する。娘細胞をブリーチし、母細胞の蛍光量を測定した。蛍光半減期(sec)は、野生株で 65、*ypt11* 欠損株で 162、Lat-A 処理細胞で 151 と、無処理・野生株の蛍光半減期が 2 倍短かった。これらは *ypt11* 欠損株ではゴルジ体と Myo2 がつながれず、Lat-A 処理ではレールが失われるため、Ret2-Ypt11 はゴルジの移動に関わると考えられる。

以上、本論文は、ゴルジ膜上の Ret2 と Ypt11 が結合し、この複合体に Myo2 が結合して、酵母ゴルジ体がアクチンケーブルに沿って母細胞から娘細胞に分配されることを初めて明らかにしたもので、これらの研究成果は、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。