

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 佐藤 啓介

出芽酵母は、真核生物の優れたモデルとして、全ゲノム塩基配列解読の完了後、ただちに網羅的な遺伝子解析が進められた。しかし未だに、生育に必須なタンパク質でありながら、機能未知のものが残されている。申請者は、膜貫通領域を持つ機能未知必須タンパク質で、小胞体・ゴルジ体に局在するものについて、温度感受性変異株を作製し、その表現型やサプレッサーを手がかりに、Ynl158w (Pga1) と Ydr367w (Kei1) の機能を明らかにした。

第一章で研究開始時の状況を概観した後、第二章では Pga1 の解析結果について述べている。GPI アンカーは、真核生物に広く保存されたタンパク質の修飾形式で、種を越えて共通のコア構造を持つ複合糖脂質 GPI が、タンパク質 C 末端の特定のシグナル配列に置き換わる形で付加されたものであり、膜にタンパク質を係留する「錨」として、細胞質膜表面にタンパク質を提示するのに役立っている。

出芽酵母の GPI は 4 つのマンノースをもち、これらを付加する酵素は順番に GPI-MT-I、II、III、IV と呼ばれている。*pga1^{ts}* 温度感受性変異株のサプレッサーとなった *GPI18* は GPI-MT-II をコードすると報告されており、*pga1^{ts}* の表現型が GPI アンカー合成変異株と共通であることから、Pga1 が GPI 合成に関わる可能性が示唆された。前駆物質のひとつ [³H]inositol による標識実験から、制限温度で *pga1^{ts}* において *gpi18^{ts}* で蓄積するものと TLC 上の移動度が等しい GPI 中間体が蓄積しており、*pga1^{ts}* は GPI-MT-II の活性に欠損があることが分かった。また、免疫沈降で Gpi18 と Pga1 が共沈した。以上から、Pga1 は Gpi18 と *in vivo* で結合して GPI-MT-II 複合体を形成し、その活性に必須なサブユニットであると結論した。

これまで出芽酵母で見つかった、GPI アンカー合成に直接関わる全ての遺伝子は動物にホモログを持つが、*PGA1* には哺乳類ホモログが無い。*GPI18* の哺乳類ホモログ *PIG-V* 遺伝子は Δ *pga1* と Δ *gpi18* の生育を同程度に相補し、哺乳類には Pga1 のホモログは無いが、機能的には *PIG-V* が酵母における Gpi18-Pga1 複合体に対応していると考えられた。

第三章では、Kei1 を解析した結果について述べている。スフィンゴ脂質は、真核細胞の膜を構成する脂質で、セラミド骨格を有するものを指す。セラミドの新規合成は小胞体で行われ、さらにゴルジ体に運ばれて修飾を受ける。出芽酵母においては、イノシトールリン酸が付加されて IPC となり、さらにマンノースが付加されて MIPC に、再びイノシトールリン酸が付加されて M(IP)₂C となる。この修飾の過程で、最初の IPC 合成だけが酵母の生育に必須である。本研究で *kei1^{ts}* のサプレッサーとして同定した

*AUR1*は、IPC合成を行うIPCシンターゼをコードすると報告されていた。

まず、Kei1-GFPがSDS-PAGE-ウェスタンブロット解析で2本のバンドとして検出される現象を追究し、Kei1はゴルジ体に運ばれた後、135番目のアルギニンをKex2に認識され、切断されることを見出した。

温度感受性のサプレッサーがコードするAur1を標的とするAureobasidin Aに*kei1^{ts}*も高感受性を示したことから、*kei1^{ts}*はIPC合成に欠損があると考えられた。免疫沈降実験から、Kei1とAur1は*in vivo*で結合し、IPCシンターゼ複合体を形成していると考えられた。許容温度で培養した野生株および*kei1^{ts}*から免疫学的に本複合体を精製し、セラミドの蛍光基質アナログC₆-NBD-ceramideをC₆-NBD-IPCに変換する酵素活性を調べた結果、*kei1^{ts}*由来のIPCシンターゼは殆ど活性を失っていた。以上より、Kei1はIPCシンターゼの活性に必須なサブユニットであると結論した。

さらに、*kei1^{ts}*においてAur1はゴルジ体に安定して局在できず、液胞に運ばれ分解されていた。GSTプルダウンを行った結果、C末端部分はゴルジ体間リサイクルに必要なCOPIコートマーと結合した。以上の結果から、Kei1はIPCシンターゼの活性に必須であると同時に、IPCシンターゼがCOPI依存的にゴルジ体間をリサイクルするのも重要であることが分かった。

第四章は本研究の総括である。

以上、本論文は、温度感受性変異株を利用して出芽酵母分泌経路の機能未知必須膜タンパク質の解析を行い、Pga1とKei1という2つのタンパク質に関し、詳細な機能を明らかにした。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。