

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 高城 景子

生体膜の主要な構成成分であるリン脂質は、生体膜の脂質二重層間で非対称的に分布していると考えられている。細胞膜では、酵母から動物細胞に至るまで、ホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルエタノールアミン (PE)、ホスファチジルイノシトール (PI) が内層に多く存在し、ホスファチジルコリン (PC) が外層に多く存在するというモデルが広く受け入れられており、この非対称的分布は、アポトーシスや血小板活性化などの局面での細胞認識や胆汁中のリン脂質組成の維持、細胞分裂におけるアクチンの制御などに関わることが示唆されている。しかし、非対称的分布の形成機構や生理的意義については未解明の部分が多く残されている。

本論文は、生体膜構成リン脂質のうち PE の非対称的分布の形成機構や生理的意義の解明を目的とし、PE に特異的に結合する抗生物質 Ro09-0198 および出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて解析を行ったものであり、3章からなる。

1章では、PE の動態に関わる因子を選び出すことを目的とし、酵母の遺伝子破壊株コレクション 4,926 株から Ro09-0198 に感受性を示す遺伝子破壊株を網羅的に探索し、Ro09-0198 に感受性を示す株を 79 株得ている。Ro09-0198 は、細胞膜外層に存在する PE に結合し、細胞障害性を示すので、Ro09-0198 に感受性を示す株の中に、PE の非対称的分布の形成機構に異常が生じ、細胞膜外層に PE が多く分布するようになった株が含まれることを期待したものである。

得られた 79 株について、PE の蛍光アナログである NBD-PE の細胞内への取り込みを調べて、細胞膜における NBD-PE のフリップに障害が生じている可能性が期待される 12 株が得られた。更に、この 12 株について、エンドサイトーシスに大きな欠損が生じていないことを確認し、細胞膜における PE の動態に関わる因子の遺伝子破壊株の候補とした。

2章では、小胞輸送と PE の動態との関連について解析を行った。まず、初期および後期エンドソームからトランスゴルジネットワーク (TGN) への逆行輸送に関わる Golgi-associated retrograde protein (GARP) / Vps fifty-three (VFT) 複合体の構成因子、Vps51p、Vps52p、Vps53p、Vps54p のいずれの単独遺伝子破壊株でも、Ro09-0198 感受性および NBD-PE の取り込みの欠損がみられることを示した。更に、細胞膜におけるリン脂質の推定フリッパーゼである Dnf1p、Dnf2p のそれぞれ C 末端に EGFP を付加した融合タンパク質、Dnf1p-GFP および Dnf2p-GFP の細胞内での局在を観察したところ、野生型株では bud の表層や bud neck に局在が観察されるのに対し、*vps51Δ*株、*vps52Δ*株、*vps53Δ*株、*vps54Δ*株では細胞内部の膜構造と思われる部位に局在が観察され、この局在異常が Ro09-0198 感受性や NBD-PE の取り込みの欠損の原因である可能性が示唆された。また、GARP 複合体と共に機

能することが示唆されている Rab/Ypt ファミリータンパク質である Ypt6p とその制御因子についても、Ypt6p およびその GEF である Ric1p、Rgp1p の遺伝子破壊株がいずれも Ro09-0198 感受性を示し、GAP である Gyp2p の遺伝子破壊株では Ro09-0198 感受性がみられないことを示した。更に、*ypt6Δ*株、*ric1Δ*株、*rgp1Δ*株、*gyp2Δ*株において、Dnf2p-GFP の局在異常を示す細胞が観察されることを示し、GARP 複合体の機能が Dnf1p、Dnf2p のリサイクリングに関わることを示唆した。

3 章では、Ro09-0198 に高感受性を示す変異株について解析を行った。このうち S4 株に関しては、その Ro09-0198 高感受性および温度感受性が、同一遺伝子の変異を原因とする可能性を示唆し、遺伝子ライブラリーの導入によって、この変異を回復する遺伝子の探索を行った。その結果、S4 株の Ro09-0198 高感受性変異および温度感受性変異を抑圧する遺伝子として、*SYPI* および *SSDI* を得た。

以上、本論文は、酵母における PE の動態に関する分子遺伝学的解析を行ったものであり、学術上、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。