

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 栗田 朋和

真菌の細胞壁多糖は抗真菌剤の標的としてきわめて有望だが、 β -1,6-グルカンの生合成機構は本質的に明らかでない。出芽酵母では約 350 残基のグルコースが β -1,6-結合でつながられ、 β -1,3-グルカン・キチン・マンナンタンパク質と共有結合する。 β -1,6-グルカンは細胞質膜(PM)の外側にしか抗体で検出されず、芽の極性生長端で盛んに合成される。しかし、PM 上には合成酵素候補が見出されておらず、 β -1,6-グルカン合成が変異により低下する遺伝子の産物は、小胞体(ER)から PM に到る小胞輸送経路中のさまざまな領域に局在する。申請者は、糖鎖分解酵素との相同配列をもち糖鎖伸長に関する最有力候補タンパク質である Kre6 が、生長端の PM に存在する事実を初めて明らかにし、また ER における Keg1 や Cne1 との相互作用の重要性を示した。

第一章では Kre6 の局在に関して調べた結果が示されている。Kre6 は、遺伝子破壊により β -1,6-グルカンが大きく減少する II 型膜タンパク質で、C 末端側領域にはファミリー 16 グリコシルヒドロラーゼと相同性がみられ、 β -1,6-グルカン合成に直接関する酵素の可能性が高い。しかし、タグ標識の種類や位置、発現量等により局在場所に異論があった。そこで、抗 Kre6 抗体を取得し、タグなしの真の Kre6 の局在を調べた。間接免疫蛍光染色観察では、芽や出芽予定部位に強いシグナルが観察され、これは C 末端に HA タグをつけた Kre6 を染色体上から発現させたときの観察結果と一致した。細胞の蔗糖密度勾配遠心分画と免疫電子顕微鏡観察では、Kre6 の大部分は ER に局在するが、一部は PM や分泌小胞(SV)様の膜に存在することが示された。ER マーカー Lip1 と比較すると、Kre6 は ER より先に出芽予定部位や芽に移行し、芽の先端に極性化する PM/SV マーカー Snc1 と比較すると、PM 上のシグナルがほぼ一致するが、細胞質内の領域にも Kre6 のシグナルは認められた。

次に Kre6 が SV/PM に存在することの生物学的な意味を検討した。Kre6 の N 末端の細胞質側は Kre6 の細胞内局在に関与する。N 末端から 137, 230, 248 アミノ酸残基削った変異タンパク質を唯一の Kre6 として持つ株を作った。Kre6 の Δ 137 株は、少数の細胞で微弱な芽への局在がみられ、蔗糖密度勾配遠心分画で PM 画分にもシグナルが検出されたが、K1 キラー毒素にやや耐性化した。 Δ 230 と Δ 248 株では、細胞内に弱いドット状シグナルが検出されるのみで、芽への極性化は全く失われ、PM 画分には検出されず、細胞は *kre6* 破壊株と同等の K1 キラー耐性とカルコフラワー(CFW)高感受性を示した。この結果は、Kre6 は ER に多量存在するが、その一部が PM に移行することが正常な β -1,6-グルカン合成に必要なことを示している。

第二章では、Kre6 と結合する Keg1 について解析した結果が示されている。Keg1 は ER に

局在する必須膜タンパク質で、温度感受性変異株が CFW 高感受性、K1 キラー耐性、 β -1,6-グルカンの減少を示す。Kre6 が PM にも存在することが分かったため再検討したが、Kre6-3HA と GFP-Keg1 の結合が再確認されるとともに、GFP-Keg1 は発現量を変えても常に ER のみに局在していた。Kre6 は、ER に存在する時に Keg1 と結合し、おそらく機能を発揮する PM では解離していると考えられる。温度感受性 *keg1-1* 変異株において、Kre6 は不安定化するとともに野生型でみられる芽への極性局在が認められなくなり、Keg1 は Kre6 の安定化と局在に関する因子であることが明らかになった。Cne1 はカルネキシンと 24%の相同性をもつ I 型膜タンパク質で、ER への局在が報告されている。Cne1 もシャペロン機能をもつ可能性があるが、出芽酵母における役割や標的はよく分かっていない。*keg1-1* と Δ *cne1* は二重変異株において合成生育遅延を示し、Cne1-3HA と 6myc-Keg1 が結合することも明らかになった。更に Δ *cne1* 株では Kre6 の芽への集積が認められなかった。Keg1 と Cne1 は ER において協同し、Kre6 の正常な構造形成や活性化及び PM への移行に働くと予想される。

以上、本論文は、 β -1,6-グルカン合成に関るとされた遺伝子産物の中で初めて、Kre6 が芽の PM に移行し、この局在が β -1,6-グルカン合成に必要であること、及びこの局在化に ER の Keg1 と Cne1 が働くことを示した。これらの研究成果は、従来まったく PM に見つからなかった合成酵素の候補を明らかにしたことから、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。