

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 盛 威

キチンは節足動物の外骨格など無脊椎動物の体表や菌類の細胞壁の重要な構成成分多糖であり、セルロースにつぎ地球上で二番目に多く存在するバイオマスである。その合成は有害な菌類を制御する薬剤の標的でもある。子囊菌類糸状菌のキチン合成酵素は 3 つの division、7 つのクラス に分類される。そのうち、クラス V とクラス VI の一部のキチン合成酵素は N 側末端にミオシン様ドメイン (MMD) を持つ特異な構造を有している。酵母 *Yarrowia lipolytica* は一般の実験室酵母と異なって、子囊菌類糸状菌と同様のキチン合成酵素の構成であることがゲノム情報から推定された。本論文は、扱いの容易な *Y. lipolytica* を用いて各キチン合成酵素の菌類細胞壁の合成と維持、細胞形態形成における役割を遺伝学的に解析したものであって、3 章からなる。

第 1 章では *Y. lipolytica* のゲノム情報に基づいて各キチン合成酵素遺伝子 (*CHS*) を同定・分類し、それらの単独欠失株を作製してその性質を解析している。

まず、菌類のキチン合成酵素との相同性から 7 つのオープン・リーディング・フレーム (ORF) について *CHS1*、*CHS2*、*CHS3*、*CHS4*、*CSM1*、*CSM2*、*CSM3* と命名した。想定遺伝子産物 Chs1~4 および Csm1 はそれぞれクラス I~V に属し、Csm2 と Csm3 はクラス VI に属し、Csm1、Csm2、Csm3 はタンパク質の N 末端側に MMD を有するキチン合成酵素であった。全ての *CHS* について単独欠失株を作製し、それぞれを *chs1Δ*、*chs2Δ*、*chs3Δ*、*chs4Δ*、*csm1Δ*、*csm2Δ*、*csm3Δ* と命名した。

これらの株の生育、Calcofluor white (CFW) および Congo red (CR) 等の薬剤に対する感受性、キチン含量、光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡による形態の観察、*CHS* 遺伝子転写量等について検討し、*Y. lipolytica* においては Chs2 が細胞隔壁の形成において主に働いていること、Chs4 が細胞壁キチンの合成に主に関与しており、Chs3 が修復的役割を持つ可能性があることを示唆する結果を得ている。また Chs2、Chs3、Chs4、Csm2 は形態の制御に関与し、Csm1、Csm2 が細胞壁の完全性の維持に関与することを示唆する結果を得ている。

第 2 章では *CHS* 遺伝子多重欠失株を作製して各遺伝子間の関係を探っている。

Y. lipolytica には MMD を有するキチン合成酵素をコードする遺伝子 3 種類と同じ division 2 に含まれる *Chs4* について多重欠失株 (*csml,2Δ* 株、*csml,3Δ* 株、*csm2,3Δ* 株、*csml,2,3Δ* 株、*csml,2,3Δchs4Δ* 株) を作製し解析している。その結果、MMD を持つキチン合成酵素は *Y. lipolytica* の生育において必須のものではないこと、また細胞壁の完全性の維持において *Csm1* が主要な役割を担っていること、*Csm2* と *Csm3* がある程度重複した機能を持って補完していることが示唆された。また *Chs4* との四重欠失株も生育可能であることから、*Y. lipolytica* において division 2 のキチン合成酵素は生育に必須のものではないことも示された。そこで、これら欠失株について division 1 のキチン合成酵素遺伝子の欠失も行い、*CHS* 五重欠失株 (*csml,2,3Δchs1,4Δ* 株、*csml,2,3Δchs2,4Δ* 株、*csml,2,3Δchs1,3Δ* 株、*csml,2,3Δchs2,3Δ* 株) を作製した。さらに 6 重欠失株を作製しようとしたところ、取得できず、MMD を持たないキチン合成酵素 4 種のうち、いずれかの 2 種は *Y. lipolytica* の生育にとって必須である可能性を強く示唆する結果となった。

第 3 章では *Y. lipolytica* の二形性と関わる遺伝子による *CHS* 遺伝子の転写制御の検討を行っている。

これまで報告された *Y. lipolytica* の細胞形態制御と関わる遺伝子 *MHY1*、*TPK1*、*TUP1* と新たに単離した遺伝子 *REN1* の欠失株における各 *CHS* 遺伝子の転写制御の検討を行った。*MHY1* の欠失株細胞は大部分が酵母型細胞となり、*TPK1* の欠失株はほぼ菌糸型細胞となった。*TUP1* 欠失株は野生型株と比較して細胞が形態変化を引き起こし、*REN1* の欠失株において菌糸型細胞の割合が増加した。これらの欠失株のうち *TUP1* 欠失株において *CHS1* および *CHS3* の転写量が上昇することが示された。*TUP1* はストレス応答に関連するグローバルな転写抑制遺伝子のオルソログであり、*CHS1*、*CHS3* の発現は *TUP1* の制御を受けることが示唆された。

以上、本論文は酵母 *Y. lipolytica* の持つ 7 つのキチン合成酵素遺伝子の役割を遺伝学的に解析し、それらの役割と関係を初めて示したものであって、今後の菌類における細胞壁キチンの合成と形態形成の仕組みの解明に向けて学術的、応用的に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。