

氏名(本籍)	小 ^お 谷 ^{だに} 哲 ^{てつ} 司 ^し (愛媛県)		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	博甲第1,794号		
学位授与年月日	平成10年3月23日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
審査研究科	生物科学研究科		
学位論文題目	Studies on the Mannosylphosphate Transfer in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (パン酵母のマンノースリン酸転移に関する研究)		
主査	筑波大学併任教授	農学博士	地神芳文 (生命工学工業技術研究所)
副査	筑波大学教授	理学博士	鎌田博
副査	筑波大学教授	理学博士	山根國男
副査	筑波大学助教授	理学博士	林純一

論文の内容の要旨

酵母は真核微生物であり、植物と同様、細胞膜の外側に厚い細胞壁を持っている。細胞壁は、外界の様々な環境変化に対応して、その合成と分解が行われるダイナミックなオルガネラである。細胞壁は細胞に特有な形態の維持や、浸透圧など外界からの物理的ストレスに対する細胞の抵抗性の維持など、極めて重要な機能を発揮している。酵母細胞壁の主要な構成成分は、マンナンタンパク質、グルカン、およびキチンであり、細胞壁の最外層に局在しているマンナンタンパク質は細胞間認識や外界の環境変化への応答など重要な生物機能をもっている。本研究は、この酵母細胞壁マンナンタンパク質、特にマンナン糖鎖の構造と機能に着目したものである。酵母のマンナン糖鎖には、マンノースを主体とする中性糖鎖のほかに、中性糖鎖にマンノースリン酸が付与した酸性糖鎖が存在する。この酸性糖鎖は細胞表面に負の電荷を付与し、これが細胞間接着や微生物の動植物への感染などに関与している可能性が示唆されているが、その意義についてはまだ不明の部分が多い。このマンナン糖鎖へのリン酸化修飾は出芽酵母(パン酵母)のほか、病原性の *Candida* 酵母や *Leishmania* 原虫、さらにはヒトを含む哺乳類細胞にも存在することから、パン酵母におけるマンノースリン酸転移の分子機構の解明は、酵母細胞壁におけるマンナン糖鎖の機能解明だけでなく、抗真菌剤の開発や哺乳類細胞における特定器官への薬物の搬送(ドラッグデリバリー)システムの開発にも多大な貢献が期待される。本研究は、このユニークな糖鎖修飾の分子機能と生理的意義を分子遺伝学的手法を駆使して、遺伝子レベルで解明しようとしたものである。

マンノースリン酸転移の減少した変異株として、*mnn4*と*mnn6*が報告されているが、このうち*mnn4*は遺伝子マッピングにより染色体上の大まかな位置が決定されており、遺伝子単離に有利であった。また、この変異株は優性の性質を示すことが報告されていたが、この性質は培地中に0.5M KClを添加することによって劣性にも変換することも報告されていた。そこで、この株に染色体DNA断片を導入して、負荷電を持った細胞に結合する色素(アルシアンブルー)への結合能を指標にして、マンノースリン酸含量が野生型株のレベルに回復した形質転換体を単離した。この形質はプラスミド依存的であり、従って、このDNA断片中にMNN4遺伝子が存在することが判明した。この断片から種々の部分欠損DNAを作成し、その変異の相補能を検定することにより、この遺伝子の所在とそのコードしている産物(Mnn 4p)の特性が明らかとなった。Mnn 4pは1178アミノ酸からなる大きなタンパク質で、N-末端近傍に1箇所膜貫通領域を持つII型の膜タンパク質と推定された。この遺伝子の破壊

によりマンノースリン酸転移が減少し、逆に過剰発現により増加することから、Mnn 4p はマンノースリン酸転移に正に作用する因子であることが明らかとなった。

mnn4変異株はマンナン糖鎖のうち糖外鎖部位でのマンノースリン酸転移が減少することは報告されていたが、コア糖鎖 (Man8GlcNAc2) 中に2箇所あるコア部分でのマンノースリン酸転移にも関与するか否かは不明であった。そこでゴルジ体における糖外鎖合成に必要な OCH1及びコア糖鎖の非還元末端への α 1,3-マンノース付加に必要な MNN1の両遺伝子に欠損をもつ株、及びこの株に mnn4変異を導入した株を構築して、その糖鎖への影響を調べた結果、mnn4変異の導入により中性コア糖鎖へのマンノースリン酸転移が顕著に低下することが判明し、MNN4遺伝子がコア部分でのマンノースリン酸転移にも関与することが明らかとなった。

所属研究室では別途、MNN6遺伝子の単離にも成功し、これがマンノースリン酸転移酵素をコードすることが明らかとなり、従って、これら2つの遺伝子の相互関係の解析が可能となった。そこで mnn4変異株に MNN6を過剰発現、逆に mnn6変異株に MNN4を過剰発現させてその効果を調べた結果、どちらの場合にもマンノースリン酸転移はおこらず、転移には両遺伝子産物が必要なこと、両者は同一の経路で関与することがわかった。さらに、 Δ mnn4 Δ mnn6二重破壊株に MNN4、MNN6遺伝子を1コピーあるいは多コピー導入してマンノースリン酸転移の程度を比較する実験から、転移に際して Mnn6p は過剰に存在しており、Mnn4p が制限因子になっていることが示唆された。

マンノースリン酸転移の制御機構を解析するため、MNN4およびMNN6の転写レベルを細胞の培養時間や培地中での浸透圧の高低との関連で解析した。その結果、MNN6の転写は細胞増殖の初期から強く観察され、定常期に向って減少するが、MNN4の転写は細胞増殖の初期にはほとんど観察されず、マンノースリン酸転移がおこる直前に増加することが判明した。従って、マンノースリン酸転移の制御はMNN6ではなくMNN4の転写調節によることが判明した。このように定常期に発現が増加する遺伝子としては各種のストレス応答性遺伝子が知られている。特にSTRE (stress response element) を持つ遺伝子ではよく研究されているが、このSTREのコア共通配列であるCCCCTはMNN4遺伝子のプロモーター領域にも存在しており、MNN4がストレス遺伝子と同じ系で転写調節されている可能性が示唆された。このことはさらに、MNN4の転写が0.5M KClの存在下で増加することでも支持され、高浸透圧ストレスに対する細胞の応答機能にMNN4の転写調節が関与することが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は酵母の細胞表層におけるユニークな糖鎖修飾であるマンノースリン酸転移の分子機構、制御機構を遺伝子レベルで解析したものである。その結果、この転移は正の制御因子であるMNN 4pとマンノースリン酸転移酵素の本体であるMnn 6pとの相互作用によること、また、定常期でのマンノースリン酸転移の増加はMNN4の転写制御によることが明らかとなり、その機能は飢餓や乾燥などの外部ストレス環境に対する細胞の防御機構の一貫ではないかと推定された。これは、哺乳類細胞を含む他の糖転移酵素にも見いだされていない、全く新しい糖鎖合成の制御機構であり、糖鎖合成遺伝子の機能および発現制御に関する世界的研究の現状からみても高く評価できる独創的なものである。マンノースリン酸を含む糖鎖は、病原性のCandida酵母やLeishmania原虫にも存在し、宿主(ヒト)への感染との関連が指摘されている。また、ヒトのリソゾームに局在する糖タンパク質糖鎖にもリン酸含有糖鎖が存在する。従って、本研究の成果は単に酵母における糖鎖の機能だけでなく、他の病原性酵母、原虫、さらには哺乳類細胞における類似の機能を解析するうえでも有益な知見を提供するものである。

よって、著者は博士(理学)の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。