

氏名(本籍)	やま もと かつ よし 山本勝良(千葉県)
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第3266号
学位授与年月日	平成15年6月30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	A Study on the Transcriptional Control of Glycosyltransferase Gene in Yeasts (酵母における糖転移酵素遺伝子の転写調節に関する研究)
主査	筑波大学併任教授 農学博士 地神芳文
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 林純一
副査	筑波大学教授 理学博士 山根國男

論文の内容の要旨

酵母の細胞壁は、マンナンタンパク質、グルカン、キチンから成り、細胞の形の保持や外部環境からの保護など、細胞の生命にとって重要な働きをしている。特に、マンナンタンパク質は細胞壁の最外層に位置し、細胞と外部環境との相互作用に関わる多様な生物機能に関与している。リボゾームで合成されたマンナンタンパク質は小胞輸送により細胞壁へ輸送される前に、主要な翻訳後修飾として糖鎖の付加を受ける。酵母における糖鎖付加の代表的なものである *N*-結合型糖鎖の生合成過程は良く知られており、小胞体で合成されたコア型糖鎖はゴルジ体でさらなる糖鎖修飾を受けて糖外鎖が合成される。この糖外鎖合成の開始には特異的な α -1, 6-マンノース転移酵素が必要であり出芽酵母では *OCH1* 遺伝子がコードしている。本研究では、細胞壁の主要な構成成分であるマンナン糖鎖の合成に必須な出芽酵母 *OCH1* 遺伝子の転写調節機構を明らかにするため、トランスポゾン変異が出芽酵母ゲノム上に挿入された遺伝子ライブラリーの探索により単離された *OCH1*-レポーター融合遺伝子発現が上昇する変異株のうち、温度感受性の表現型を持ち、かつ、小胞輸送異常を示す *tao7/trs130^{tsl}* 変異株について解析した。

TAO7/TRS130 遺伝子は、ゴルジ体以降の小胞輸送に関わる TRAPP II 複合体のコンポーネントをコードすることが報告されているが、*tao7/trs130^{tsl}* 変異株は細胞壁異常の指標である Calcofluor white に耐性を示したほか、変異株が示す 37°C での生育不全が浸透圧保護剤によって抑圧されたことなどから、小胞輸送の欠損による細胞壁へのマンナンタンパク質の輸送不能が細胞壁異常の原因である可能性が示唆された。次に、この変異株の温度感受性を多コピーで抑圧する遺伝子を探索した結果、*YPT31* と *YPT32* 遺伝子が同定された。これらは機能的なホモログであるとの報告にも関わらず、*YPT32* 遺伝子の高発現のみ、変異株が示すゴルジ体以降の小胞輸送異常や *OCH1-lacZ* 融合遺伝子の発現上昇を部分的に回復した。さらに、遺伝学的手法により *TAO7/TRS130*, *YPT31*, *YPT32* 遺伝子間の関係を調べた結果、*Tao7/Trs130* は *Ypt31p* と密接な関係を持ち *Ypt32p* とは独立な関係にあることが推定され、このことは *Tao7/Trs130*, *Ypt31p*, *Ypt32p* 間の物理的相互作用を免疫沈降実験で解析した結果からも支持された。最後に、この変異株が示す *OCH1* 遺伝子の発現上昇に関与する転写関連因子を調べた結果、シグナル伝達因子である *Skn7p* の必要性が確認され

た。

一方、細胞の形や細胞分裂様式が出芽酵母と異なる分裂酵母について、出芽酵母 *OCH1* 遺伝子のホモログである分裂酵母 *och1*⁺ 遺伝子の転写調節を解析した結果、*och1*⁺ 遺伝子の転写量は細胞周期を通じて常に一定であり、Och1p タンパク質量も細胞周期を通して一定レベルであったことから、*och1*⁺ 遺伝子の発現は細胞周期に非依存的であることが判明した。しかし、塩ストレス条件下では、出芽酵母と同様、*och1*⁺ 遺伝子の転写量が増加することを見いだした。出芽酵母 *OCH1* 遺伝子の転写調節で重要な Skn7p の分裂酵母ホモログとして Prr1p が、また、浸透圧ストレスに応答して働く分裂酵母の転写因子として Atf1p が報告されていることから、高塩濃度による *och1*⁺ 遺伝子の転写量の増加と Prr1p や Atf1p との関連を調べた結果、*atf1* 破壊細胞では塩ストレス条件下だけでなく通常条件下でも *och1*⁺ 遺伝子の転写量がほとんど消失することが判明した。浸透圧ストレスにより Atf1p を介して転写が上昇する *gpd1*⁺ 遺伝子のプロモータと類似の配列が *och1*⁺ 遺伝子のプロモータ領域に存在することから、分裂酵母 *och1*⁺ 遺伝子では、この領域が塩ストレスによる転写上昇に重要で、かつ、Atf1p の結合領域を含むことが示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究は、出芽酵母における小胞輸送の異常と *OCH1* 遺伝子の転写調節の関係を明らかにするとともに、分裂酵母 *och1*⁺ 遺伝子の転写調節が出芽酵母とは異なることを初めて明らかにした。特に、Tao7/Trs130 の機能異常が細胞壁の最外層を構成するマンナンタンパク質の細胞壁への輸送を阻止し、その結果、細胞壁の異常が生じること、この細胞壁異常を補うために Skn7p 機能を介して *OCH1* 遺伝子の発現が上昇することが判明した。また、この過程で、ゴルジ体以降の小胞輸送に関わる TRAPP II 複合体の構成成分である Tao7/Trs130 と Ypt31p, Ypt32p GTPase 間で機能的な差異があるという詳細な相互関係も明らかとなった。さらに、分裂酵母 *och1*⁺ 遺伝子の転写調節機構は、塩ストレスに応答して転写が上昇する点では出芽酵母 *OCH1* の場合と共通であるが、細胞周期に非依存的であるという相違も存在することが判明した。これらの成果は、酵母のみならず、真核微生物全般に有益な細胞壁合成に関して、貴重な学術的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。