

氏名(本籍)	おお たか うめ むら まりこ 大 高 (梅 村) 真理子 (東京都)		
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	博 甲 第 4703 号		
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 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	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Biosynthesis of GPI-Anchored Proteins in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Saccharomyces cerevisiae</i> における GPI アンカー型タンパク質の生合成過程の 解明)		
主 査	筑波大学教授	農学博士	深 水 昭 吉
副 査	筑波大学教授	農学博士	小 林 達 彦
副 査	筑波大学准教授	博士 (農学)	谷 本 啓 司
副 査	筑波大学教授	農学博士	地 神 芳 文

論 文 の 内 容 の 要 旨

グリコシルフォスファチジルイノシトール (GPI) による翻訳後修飾は、真核生物に広く保存され、タンパク質を細胞膜上に繋ぎ止める役割を果たしている。GPI は小胞体の膜上に存在しているフォスファチジルイノシトール (PI) に順次、糖、エタノールアミンリン酸が付加して合成される。完成した GPI はタンパク質に転移され、その後に脂質部分が改変される。このように小胞体で合成された GPI アンカー型タンパク質はゴルジ体を経て細胞膜に局在する。出芽酵母においては、このうちの一部がさらに切断を受け、細胞壁のグルカンと共有結合することが分かっている。現在までに、GPI 生合成に関する遺伝子が精力的に同定されてきた。筆者は、GPI 生合成の中で、未だ反応に関与する遺伝子が同定されていなかった二つのステップについて、出芽酵母を用いてその遺伝子を同定し機能を解析した。

GPI アンカー型タンパク質を細胞壁から漏出させるような抗真菌剤の候補化合物が取得され、そのターゲットとして機能未知な遺伝子である *GWT1* が同定された。筆者は *GWT1* の機能を明らかにするために、温度感受性を示す *gwt1* 変異株が取得した。この株においては、非許容温度では、GPI アンカータンパク質 Gas1p の ER-ゴルジ体間の輸送が野生株に比べて遅くなっていた。また、GPI のタンパク質への付加も減少していた。従って、この株は GPI の生合成過程に欠損があることが考えられた。そこで、GPI 生合成の初期過程の酵素活性を *in vitro* で解析した結果、GPI 中間体のアシル化産物の合成活性が顕著に低下していた。したがって、*GWT1* が GPI 生合成において必須のステップであるイノシトールのアシル化に関与していることが判明した。

GPI 生合成の際に用いられる PI は不飽和脂肪酸を持っているが、細胞膜上の GPI アンカー型タンパク質の脂質部分は飽和脂肪酸に変換されている。従って、GPI がタンパク質に転移した後に、脂質部分の改変 (脂質リモデリング) が起こると考えられている。出芽酵母においては、GPI アンカー型タンパク質の PI は *sn*-2 位に短い不飽和脂肪酸が付加しているが、これが長鎖飽和脂肪酸に置き換わる。さらに、PI のジアシルグリセロール部分がセラミドに変換される。

出芽酵母の Cwh43p は、N 末端側部分は哺乳動物において脂質リモデリングに関与する PGAP2/FRAG1 と

相同性を示すが、C末端側部分は、機能未知なタンパク質と相同性を示した。そこで、*CWH43*が脂質リモデリングに関与するか検討するために、GPIアンカー型タンパク質の脂質部分を解析したところ、野生株ではセラミド型が主に検出されたが、*cwh43*破壊株では長鎖脂肪酸をもつPI型が大部分でセラミド型は検出されなかった。このことより、GPIアンカーのセラミドへの変換に*CWH43*が関与していることが明らかになった。また、このセラミドへの変換能はC末端側領域が重要であり、N末端側領域はこの機能を増強する役割を果たしていることが明らかになった。さらに、Cwh43pのN末端側とC末端側それぞれの相同遺伝子であるマウス*FRAG1*と*C130090K23*を酵母で発現させると、*C130090K23*にはセラミドへの変換活性があり、*FRAG1*には変換能を増強させる活性があることを見出した。

審査の結果の要旨

本研究では、GPI生合成において、未だ明らかになっていなかったステップに関与する二つの遺伝子を同定した。第二章では、新規遺伝子*GWT1*がGPI生合成においてイノシトールアシル化に関与していることを見出した。この知見は、GPI生合成が抗真菌剤の標的となることを明らかにし、さらなる抗真菌剤開発へ応用されると考えられる。また、第三章では、今まで解明されていなかった脂質リモデリングのセラミドへの変換に*CWH43*が関与することを明らかにした。現在、このセラミドへの変換反応の基質や詳細な反応メカニズムは明らかになっていない。筆者が明らかにした第三章の知見が、今後セラミドへの変換反応の解明に貢献することが期待される。また、現在までに、哺乳動物において、セラミドを持つGPIアンカー型タンパク質が存在することは報告されていない。筆者は、第三章において、マウスの*CWH43*相同遺伝子にセラミドへの変換能があることを明らかにした。このことは、哺乳動物において、セラミドをもつGPIアンカー型タンパク質の存在を示唆していることも考えられる。

以上のように、筆者が明らかにした知見は、酵母だけではなく、真核生物に共通なGPI生合成とその生理機能を考察する上で重要であり、また、GPIやGPIアンカー型タンパク質が関与している疾患などの解明にも貢献すると判断される。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。