

審査の結果の要旨

氏名 奥村 祐哉

生物は多様な膜構造から成るが、これら生体膜の大きさや形がどのように決定されるかについては未だ不明な点が多い。出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の孢子形成過程における前孢子膜形成は、細胞内で新規の二重膜構造が形成され、一定の形と大きさに形作られることから、生体膜形態形成のモデルの 1 つとされている。本研究は、前孢子膜の伸長に参与することが示されている因子、Spo73 および Gip1 の詳細な解析を通して、前孢子膜伸長の分子機構に迫ったものである。本論文は、序論と 3 章からなる本論ならびに総合討論より構成されている。

第一章では、*SPO73* 遺伝子の破壊株について、以前の研究で前孢子膜の伸長に必要であることが示されている *SPO71* および *VPS13* 遺伝子の破壊株との、表現型の比較を詳細に行なっている。*spo73* 破壊株では、核を取り込めない前孢子膜が多く、さらに二重膜の内腔に小胞が多数蓄積した前孢子膜が多く観察され、前孢子膜先端の Leading Edge Protein Complex が消失しない細胞も多く観察されたことから、*spo71* および *vps13* 破壊株と類似した表現型を示すことが明らかになった。また、*SPO71* は、前孢子膜を湾曲させる遺伝子である *SPO1* と遺伝学的に関連があることが報告されているため、*SPO73* も同様に遺伝学的な関係があるかについて解析を行った。*spo1* および *spo73* の単独破壊株では孢子形成が全く見られないのに対し、*spo1 spo73* 二重破壊株では、孢子が観察されたことから、*SPO73* は *SPO71* と同様に、*SPO1* と遺伝学的に関係があることが示された。本章において、Spo73 は Spo71、Vps13 と同経路で前孢子膜伸長に関わる可能性が高いことが示唆された。

第二章では、Spo73 タンパク質の構造、細胞内局在、そして他の因子との相互作用について解析を行っている。Spo73 は、筋肉の修復に関わるジスフェリンやミオフィリンに特徴的な機能未知のドメインである Dysferlin ドメインのみからなるタンパク質であり、anti-parallel な β -sheet 構造からなることを予

測した。また、Spo73 が前孢子膜に局在し、この局在が、同じく前孢子膜に局在する Spo71 と Vps13 に非依存的であることを明らかにした。構造解析で見出された、タンパク質表面でループを構成すると予測される正電荷を持つアミノ酸残基をアラニンに置換した Spo73-AAA は前孢子膜へ局在できなかつたことから、Spo73 は正電荷を持つアミノ酸により前孢子膜に局在化することが示唆された。このことは、Spo73 が Lipid overlay assay において負電荷を持った複数のリン脂質と結合するという結果と符合している。また、Spo73-AAA は、Spo71 の過剰発現により、前孢子膜への局在が回復したことから、Spo71 と Spo73 が相互作用することが示唆された。さらに、酵母ツーハイブリッド法および免疫沈降により、Spo73 と Spo71、Spo73 同士が結合することが示された。以上より、Spo73 は前孢子膜上の負電荷をもつリン脂質、Spo73 自身、および Spo71 と結合して、前孢子膜伸長において働くことが示唆された。

第三章では、Gip1 と Glc7 の結合とその重要性について解析を行っている。Gip1 は、出芽酵母で唯一の Protein Phosphatase type1 カタリティックサブユニットである Glc7 の、孢子形成時特異的なターゲティングサブユニットであることが知られている。本章では、Gip1 の 492-494 番目のアミノ酸に当たる VRF の領域が Glc7 と結合すること、Glc7 と結合できない変異型 Gip1 は前孢子膜伸長において機能できず、過剰にリン酸化されており、その局在も異常になることが示された。このことは、Gip1 自体が Glc7 によって脱リン酸化され、それにより局在が制御されるという可能性を示している。また、Glc7 を前孢子膜上に局在化させるだけでは Gip1 の欠損を相補できないが、Glc7 と結合可能な Gip1 の C 末端領域を共発現することにより Gip1 の欠損を部分的に相補できることから、Gip1 は Glc7 の局在だけでなく基質認識にも必要であることが示された。さらに、遺伝学的解析から、Gip1 は Spo73 / Spo71 / Vps13 と別経路で前孢子膜伸長に寄与することが示唆された。

以上、本論文は出芽酵母前孢子膜伸長に必須な Spo73 と Gip1 の解析を通して、その分子機構解明、そして生体膜形成機構の理解に貢献するものである。これらの研究成果は、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。