

# 論文審査の結果の要旨

氏名 吉田 光範

本論文は2章からなり、第1章は  $\text{Ca}^{2+}$ -*cls* 変異間相互作用プロファイルに基づく *CLS* 遺伝子の網羅的な解析、第2章は出芽酵母プロフィリンの機能ネットワーク解析について述べられている。

## 【第1章】 $\text{Ca}^{2+}$ -*cls* 変異間相互作用プロファイルに基づく *CLS* 遺伝子の網羅的な解析

出芽酵母においては、高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  添加培地で生育できない  $\text{Ca}^{2+}$  感受性 (*cls*; calcium sensitive) 変異株が 62 単離されており (Ohya et al., 1986; Ohnuki et al., 2007)、細胞内における  $\text{Ca}^{2+}$  恒常性維持や  $\text{Ca}^{2+}$  によって制御される細胞機能を解明する重要な手掛かりになってきた。しかしながら、高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  に対する応答の生命現象をシステムとして理解するための包括的な知見は得られていなかった。

本研究では、 $\text{Ca}^{2+}$  と *CLS* 遺伝子間の相互作用を、増殖だけでなく形態表現型の面から多次元的に捉えることにした。そのために、*cls* 変異株について通常および高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  条件下の細胞形態を画像解析プログラム CalMorph (Ohtani et al., 2004; Ohya et al., 2005) により高次元形態表現型として定量化し、一般化線形モデルを応用することで、正または負の  $\text{Ca}^{2+}$ -*cls* 変異間相互作用を定量的に評価した。正(表現型を回復させる)および負(表現型を悪化させる)の  $\text{Ca}^{2+}$ -*cls* 変異間相互作用を定義することにより、62 *cls* 変異株それぞれで 209 次元の正または負の  $\text{Ca}^{2+}$ -*cls* 変異間相互作用の組み合わせからなるプロファイルを作成した。

62 *cls* 変異株において、 $\text{Ca}^{2+}$ -*cls* 変異間相互作用プロファイル間の相関係数に基づく階層クラスタリングを行ったところ、62 中 49 (79%) の *cls* 変異株 が 9 つのクラスに分かれた。そのうち 6 クラスでは、既知の機能的に関連する遺伝子の変異株が集まっていた。放射性同位体  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  を用いて細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  含有量を調べた結果、クラス I の *cls* 変異株は *vma22* 変異株を除く 16 株で野生型に比べて減少し、逆にクラス II では全 5 株で増加していた。このように、クラスタリング解析によって細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  恒常性維持や  $\text{Ca}^{2+}$  によって制御される機構の機能ユニットが 9 つ同定でき、また同時に  $\text{Ca}^{2+}$ -*cls* 変異間相互作用プロファイルの特徴に各ユニットの機能に関する情報が現れていることが示唆された。

最後にクラスタリング解析により同定された機能ユニット間に見られる相互関係を理解するために、 $\text{Ca}^{2+}$ -*cls* 変異間相互作用プロファイルの類似度に基づくネットワークを構築した。クラス III から IX の  $\text{Ca}^{2+}$ -*cls* 変異間相互作用プロファイルの間には正の相関が見られる傾向にあり、クラス I および II のプロファイルは他の機能ユニットのプロファイルとの間に負の相関が見られる傾向にあった。この結果から、クラス I (V-ATPase) お

よび II (C-VPS)は高濃度  $\text{Ca}^{2+}$ に対する応答における他の機能ユニットにはない機能を有していることが予想された。

## 【第2章】出芽酵母プロフィリンの機能ネットワーク解析

全 62 *cls* 変異株のクラスタリング解析から、*cls5* 変異株はクラス II に分類され、 $\text{Ca}^{2+}$  含有量の測定からクラス II は  $\text{Ca}^{2+}$  恒常性維持に関与していることが示唆された。しかしながら、*cls5* 変異株の高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  条件下における特徴的な形態変化は、クラス II を構成する 5 つの *cls* 変異株で完全に一致しているわけではなく、*cls5* 変異株の恒常性異常と高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  存在下における特徴的な形態変化の関係は不明であった。

出芽酵母 Pfy1p は細胞内でさまざまなリガンドと結合することが知られている。それらのうちのタンパク質との結合が *cls5* 変異株の  $\text{Ca}^{2+}$  感受性に関係しているか調べるために、出芽酵母のデータベース SGD で Pfy1p と物理的相互作用 (Pfy1p と直接または二次の物理的相互作用) が報告されているタンパク質の遺伝子変異株 114 種類について高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  添加固体培地上の生育を調べた。Pfy1p と直接結合するタンパク質では Bni1p および Bem1p、また Bni1p および Bem1p と結合するタンパク質では、Rho1p、Cla4p および Cdc24p の変異株 (*bni1*、*bem1*、*rho1-2*、*cla4*、および *cls4* 変異株) で *cls5* 変異株と同様に  $\text{Ca}^{2+}$  に特異的に感受性を示した。これらの結果から、Pfy1p が関与する  $\text{Ca}^{2+}$  によって制御される機構では、Bni1p、Bem1p、Rho1p、Cla4p、および Cdc24p も協調して機能していることが示唆された。

野生型株および上記 6 つの変異株において、通常条件および高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  条件下における細胞形態情報を、CalMorph を用いて新たに取得し、各 *cls* 変異株の  $\text{Ca}^{2+}$ -*cls* 変異間相互作用を定量化した。Pfy1p 関連遺伝子の変異株のなかでは、*cls5* 変異株の  $\text{Ca}^{2+}$ -*cls* 変異間相互作用プロファイルは、他の変異株よりも *bem1* および *cls4* 変異株のプロファイルに類似しており、3 者に共通して、高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  存在下において細胞サイズの増大、アクチンの脱局在および出芽率の低下が見られた。これらの結果から Pfy1p、Bem1p および Cdc24p は高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  条件下における細胞極性の形成および出芽に関与していると考えられた。*cls4* 変異株では細胞内  $\text{Ca}^{2+}$  含有量の上昇が見られないことから、Pfy1p は  $\text{Ca}^{2+}$  恒常性維持と高濃度  $\text{Ca}^{2+}$  条件下における細胞極性形成・出芽の 2 つの独立した細胞機能に関わっていると考えられ、それぞれで Pfy1p と共に働くタンパク質が明らかになった。

なお、本論文第 2 章は、大貫慎輔、八代田陽子、大矢禎一との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析及び検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士 (生命科学) の学位を授与できると認める。

以上 1 9 1 3 字