

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	YI RUIRONG
審査委員	主査 會見 忠則 (印) 副査 荒瀬 榮 (印) 副査 前川 二太郎 (印) 副査 霜村 典宏 (印) 副査 阿座上 弘行 (印)
題目	The roles of homeodomain proteins during the clamp cell formation in a bipolar mushroom, <i>Pholiota nameko</i> (二極性担子菌 <i>Pholiota nameko</i> のクランプ形成におけるホメオドメイン蛋白質の役割に関する研究)
審査結果の要旨 (2,000字以内)	
<p>本論文は、これまで、四極性きのこに比べ、全く手付かずであった二極性きのこ (ナメコ, <i>Pholiota nameko</i>) の交配型遺伝子を同定すると共に、自ら形質転換系を開発し、その役割について詳細に論じたものである。</p> <p>まずはじめに、二極性きのこ (ナメコ) のA交配型遺伝子であると遺伝学的に同定されたホメオドメインタンパク質をコードする <i>hox1</i> 遺伝子の周辺領域約40kbについて、その遺伝子構造を調べた。その結果、A交配型遺伝子領域には、<i>hox1</i> と対をなすもう一つのホメオドメインタンパク質遺伝子 (<i>hox2</i>) が存在することを明らかにした。また、さらにその周辺領域の遺伝子構造の解析から、A交配型遺伝子領域には、この2つのホメオドメインタンパク質以外には、交配型に関与すると思われる遺伝子と相同性を持つ遺伝子が存在しなかったことから、ナメコの交配型を制御しているのは、1対のホメオドメインタンパク質のみであるという仮説をたてた。</p> <p>次に、上記の仮説を証明するため、ホメオドメインタンパク質の役割を細胞内で解析するための形質転換系を開発を行った。使用した薬剤は、抗菌剤カルボキシシンとハイグロマイシンBである。カルボキシシン耐性遺伝子は、ナメコから直接コハク酸デヒドロゲナーゼの鉄-硫黄サブユニット遺伝子 (<i>sip</i>) に部位特異的変異導入法を用いて変異を導入し、カルボキシシン耐性遺伝子を作成した。同時に、細菌由来ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼ (<i>hph</i>) 遺伝子を <i>sip</i> 遺伝子のプロモーターおよびターミネーターの制御化で高発現させるための、ハイグロマイシン耐性マーカーを作成した。これらの薬剤耐性マーカー遺伝子をプロトプラスト化したナメコの分節型分生子にポリエチレングリコール4000の作用によりDNAを取り込ませ、形質転換を行った。その結果、約10<sup>2</sup> cfu / μg DNAの効率で形質転換体を得ることができ、サザンハイブリダイゼーション及びPCR法によりこれらの形質転換体ゲノム内に導入した遺伝子の組み込みを確認した。以上の研究成果により、ナメコにおいても細胞内で、クローン化した遺伝子の機能解析が可能になった。</p> <p>最後に、クローン化したホメオドメインタンパク質遺伝子 (<i>hox1</i> 及び <i>hox2</i>) の役割を本研究で開発した形質転換系を用いて解析した。導入した遺伝子は、A3の交配型をもつ株からクローン化し、A4の交配型を持つ株を宿主として導入した。作成した形質転換体は、A3-<i>hox1</i> 及び A3-<i>hox2</i> を単独で導入した菌株; A3-<i>hox1</i> を単独で導入した後にさらに、A3-<i>hox2</i> を単独で導入した菌株; 連結した A3-<i>hox1</i> と A3-<i>hox2</i> を導入した菌株、A3-<i>hox1</i> 及び A3-<i>hox2</i> 遺伝子の調節領域を <i>sip</i> 遺伝子のものと置き換えて、<i>sip</i> 遺伝子のプロモーターの制御化で高度に発現する様にデザインした菌株である。得られた形質転換体の、真正クランプ形成能を比較したところ、ホメオドメインタンパク質遺伝子1つの導入で</p>	

は、できたクランプは偽クランプであり、2種のホメオドメインタンパク質遺伝子の導入では、約半数が、真正クランプとなり、*sip* 遺伝子のプロモーターの制御化で発現させた場合は、ほとんどのクランプが真正クランプであった。また、*sip* 遺伝子のプロモーターの制御化で発現させた場合は、発現量が、2倍近くまで増加していた。以上の結果から、二極性きのこは、ホメオドメインタンパク質のみでクランプ形成が可能なこと、すなわち、四極性きのこ異なりクランプ形成にフェロモン・フェロモンレセプター経路（*B*因子）が直接必要ないことが解った。さらに、真正クランプの形成には、ホメオドメインタンパク質の発現量が大きく関与していることを明らかにした。その理由は、1対のホメオドメインタンパク質は、ヘテロダイマーを形成しないと機能しないが、その結合能が非常に弱いためであることを酵母ツーハイブリッドシステムによる解析により突き止めた。

以上のように、本論文は、二極性きのこの交配型すなわちクランプ形成におけるホメオドメインタンパク質及びその遺伝子の役割について、分子生物学的手法を駆使し、詳細に明らかにしたものである。このような、二極性きのこにおける交配型遺伝子の分子生物学的な報告は、これまでほとんどないことから、その重要性及び新規性が非常に高く評価される論文である。したがって、以上のことから、本学位論文は、博士学位として十分な価値を有すると判定した。