

氏名	まつお やすひろ 松尾安浩		
学位の種類	博士(農学)		
学位記番号	甲第351号		
学位授与年月日	平成16年 9月24日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
学位論文題目	Analysis of the genes related to chitin synthesis in fission yeast (分裂酵母のキチン合成に関与する遺伝子の解析)		
学位論文審査委員	(主査) 松田英幸		
	(副査) 川向誠	古賀大三	森嶋伊佐夫
	中川強		

学位論文の内容の要旨

キチンは *N*-アセチルグルコサミンが β -1,4 結合したポリマーであり、細胞壁に微量に含まれ、UDP-GlcNAc を基質としてキチンシンターゼによって合成される。出芽酵母は3つのキチンシンターゼ (Chs1p, Chs2p, Chs3p) と4つのレギュレーター (Chs4p, Chs5p, Chs6p, Chs7p) をもっている。出芽酵母においてキチン欠損株は致死になるため、細胞壁でのキチンが重要なものであることが明らかになっている。

分裂酵母の細胞壁はガラクトマンナン (9~14%)、 α -グルカン (18~28%)、 β -グルカン (46~54%) と少量のガラクトサミンを含んでいる。分裂酵母でキチンの機能を解析するためにデータベースを調べたところ、推定のキチンシンターゼが2つ存在していた。

Chapter II において、著者は分裂酵母の推定のキチンシンターゼをコードする *chs1*⁺、*chs2*⁺ をクローニングした。現在までにキチンシンターゼには活性に必要なドメインがあることがわかっている。しかしながら、分裂酵母の Chs2 には、その必要なドメインが存在していなかった。そのため分裂酵母の Chs2 が本当にキチンシンターゼをコードしているかどうかを調べるため出芽酵母の *chs2* と *chs3* の二重破壊株の合成致死性の相補性を調べた。その結果、分裂酵母の *chs1*⁺、*chs2*⁺ を発現させることで出芽酵母 *chs2* と *chs3* の二重破壊株の合成致死性を相補した。このことは分裂酵母 *chs1*⁺、*chs2*⁺ がキチンシンターゼをコードしていることを示している。*chs1* 破壊株は孢子の数が1, 2, 3個の異常孢子形成能を示すのに対して *chs2* 破壊株は目立った表現型がみられなかった。また、*chs1*、*chs2* の二重破壊株は *chs1* 破壊株と同様に異常孢子形成能を示した。Chs2-GFP は細胞生育時に隔壁が形成された後

に隔壁に局在していた。*cdc25-22*変異株を用いて細胞を同調し、細胞周期における *chs2⁺* mRNA の発現をノザン解析によって調べたところ、転写は隔壁形成の前に増加していた。また、*cdc25-22* 変異株に Chs2 をタギングした株を作製し、細胞を同調して Chs2-13Myc タンパク質の発現を調べたところ、細胞周期で隔壁形成にともなって変化していた。以上のことから、*chs1⁺* は孢子壁形成に *chs2⁺* は隔壁形成に関係していることが示唆される。

出芽酵母において Chs4p は直接キチンシンターゼ III (Chs3p) に結合し、活性化因子として機能する。分裂酵母では出芽酵母 Chs4p に相同性のあるものが4つ存在する。

Chapter III で著者はこれら4つの因子を Chr1、Chr2、Chr3、Chr4 (putative chitin synthase regulatory factor) と命名し、解析を行った。これら4つのタンパク質の機能を調べるために Chr1、Chr2、Chr3 を分裂酵母の野生株で高発現させたところ特に大きな変化は見られなかったが、Chr4 を高発現させた細胞では多隔壁を形成し、細胞生育の遅延が見られた。*chr1*、*chr2*、*chr3*、*chr4* の単独破壊株及びすべての多重破壊株はさまざまな生育条件下でも生育に影響はなく、また、形態に大きな異常は見られなかった。しかしながら、*chr1*、*chr2*、*chr3*、*chr4* の単独破壊株でキチンシンターゼ II である Chs2 の局在を見たところ *chr1*、*chr2*、*chr3* 破壊株では野生株と同様に隔壁にだけ局在が見られたのに対して *chr4* 破壊株では隔壁以外にも細胞質にもその局在が見られた。また、Chs2 は *chr4⁺* 遺伝子の高発現によって誘導される異常な隔壁にも局在することが明らかになった。Chr4 のタンパク質発現を調べるためにゲノムにタギングした株を作製し、異なった生育条件下で *chs2⁺* 遺伝子の有無によって発現の変化を調べたところそれぞれに大きな変化はなく、常に一定に発現していた。また、*cdc25-22* 変異株の Chr4 にタギングした株を作製し、細胞同調後、細胞周期での Chr4-13Myc のタンパク質発現を調べたところ常に一定の発現を示した。野生株に比べて *chr4* 破壊株では Chs2 の局在に変化が見られるため Chs2 の発現に変化がないかどうかを Chs2 タギング株で調べたところ Chr4 の有無によって変化はなく、一定の発現パターンを示した。このことから Chs2 及び Chr4 がそれぞれの発現の制御に関与していないことが示唆された。さらに、免疫染色により Chr4-13Myc の細胞内局在を調べたところ *chs2*、*chr1*、*chr2*、*chr3* の有無に関係なく野生株と同様に細胞の先端及び隔壁にその局在がみられた。このように分裂酵母において *chr4⁺* 遺伝子は隔壁形成に関与し、適切な Chs2 の局在のために必要な遺伝子であることが示唆された。

以上分裂酵母における二種のキチン合成酵素の解析と制御因子の解析を通じて分裂酵母におけるキチン合成の新たな知見を提示したものである。

論文審査の結果の要旨

分裂酵母の細胞壁はガラクトマンナン(9~14%)、 α -グルカン(18~28%)、 β -グルカン(46~54%)と少量のガラクトサミンを含んでいる。分裂酵母でキチンの機能を解析するためにデータベースを調べたところ、推定のキチンシンターゼが2つ存在していた。

Chapter IIにおいて、著者は分裂酵母の推定のキチンシンターゼをコードする *chs1+*、*chs2+* をクローニングした。現在までにキチンシンターゼには活性に必要なドメインがあることがわかっている。しかしながら、分裂酵母の *Chs2* には、その必要なドメインが存在していなかった。そのため分裂酵母の *Chs2* が本当にキチンシンターゼをコードしているかどうかを調べるため出芽酵母の *chs2* と *chs3* の二重変異株の合成致死性の相補性を調べた。その結果、分裂酵母の *chs1+*、*chs2+* を発現させることで出芽酵母 *chs2* と *chs3* の二重変異株の合成致死性を相補した。このことは分裂酵母 *chs1+*、*chs2+* がキチンシンターゼをコードしていることを示している。*chs1* 破壊株は胞子の数が 1,2,3 個の異常胞子形成能を示すのに対して *chs2* 破壊株は目立った表現型がみられなかった。また、*chs1*、*chs2* の二重破壊株は *chs1* 破壊株と同様に異常胞子形成能を示した。*Chs2*-GFP は細胞生育時に隔壁が形成された後に隔壁に局在していた。*cdc25-22* 変異株を用いて細胞を同調し、細胞周期における *chs2+* mRNA の発現をノザン解析によって調べたところ、転写は隔壁形成の前に増加していた。また、*cdc25-22* 変異株に *Chs2* をタギングした株を作製し、細胞を同調して *Chs2*-13Myc タンパク質の発現を調べたところ、細胞周期で隔壁形成にともなって変化していた。以上のことから、*chs1+* は胞子壁形成に *chs2+* は隔壁形成に関与していることが示唆される。

出芽酵母において *Chs4p* は直接キチンシンターゼ III(*Chs3p*)に結合し、活性化因子として機能する。分裂酵母では出芽酵母 *Chs4p* に相同性のあるものが 4 つ存在する。

Chapter III で著者はこれら 4 つの因子を *Chr1*、*Chr2*、*Chr3*、*Chr4* (putative chitin synthase regulatory factor) と命名し、解析を行った。これら 4 つのタンパク質の機能を調べるために *Chr1*、*Chr2*、*Chr3* を分裂酵母の野生株で高発現させたところ特に大きな変化は見られなかったが、*Chr4* を高発現させた細胞では多隔壁を形成し、細胞生育の遅延が見られた。*chr1*、*chr2*、*chr3*、*chr4* の単独破壊株及びすべての多重破壊株はさまざまな生育条件下でも生育に影響はなく、また、形態に大きな異常は見られなかった。しかしながら、*chr1*、*chr2*、*chr3*、*chr4* の単独破壊株でキチンシンターゼ II である *Chs2* の局在を見たところ *chr1*、*chr2*、*chr3* 破壊株では野生株と同様に隔壁にだけ局在が見られたのに対して *chr4* 破壊株では隔壁以外にも細胞質にもその局在が見られた。また、*Chs2* は *chr4+* 遺伝子の高発現によって誘導される異常な隔壁にも局在することが明らかになった。*Chr4* のタンパク質発現を調べるためにゲノムにタギングした株を作製し、異なる生育条件下で *chs2+* 遺伝子の有無によって発現の変化を調べたところそれぞれに大きな変化はなく、常に一定に発現していた。また、*cdc25-22* 変異株の *Chr4* にタギングした株を作製し、細胞同調後、細胞周期での *Chr4*-13Myc のタンパク質発現を調べたところ常に一定の発現を示した。野生株に比べて *chr4* 破壊株では *Chs2* の局在に変化が見られるため *Chs2* の発現に変化がないかどうかを *Chs2* タギング株で調べたところ *Chr4* の有無によって変化はなく、一定の発現パターンを示した。このことから *Chs2* 及び *Chr4* がそれぞれの発現の制御に関与していないことが示唆された。さらに、免疫染色により *Chr4*-13Myc の細胞内局在を調べたところ *chs2*、*chr1*、*chr2*、*chr3* の有無に関係なく野生株と同様に細胞の先端及び隔壁にその局在がみられた。このように分裂酵母において *chr4+* 遺伝子は隔壁形成に関与し、適切な *Chs2* の局在のために必要な遺伝子であるこ

とが示唆された。

以上から著者は、新たに次のことを解明した。分裂酵母における二種のキチン合成酵素の解析と制御因子の解析を通じて分裂酵母におけるキチン合成の新たな知見を提示した。

これらの成果は、分裂酵母におけるキチン代謝の分野に新しい領域を拓き、分子生物学の発展に貢献するものであり、学位論文として十分な独創性と、優れた内容があるものと判定する。