

(様式第 1 3 号)

## 学 位 論 文 要 旨

氏名: 西野 耕平

題目: Analysis of inducers and suppressors controlling cell lysis in *S. pombe ura4* deletion strains  
(分裂酵母*ura4*破壊株の細胞溶解を制御する促進及び抑圧因子の解析)

分裂酵母は生物の基本メカニズムを研究する上で様々な利点があり、優れた真核生物のモデル生物として研究されてきている。

私の所属する研究室において分裂酵母の *ura4* 遺伝子破壊株が劇的な細胞溶解を誘導することが発見された。そこで、私は *ura4* 遺伝子破壊株の細胞溶解の詳細な仕組みを明らかにするための研究を行った。*Ura4* タンパク質は *de novo* UMP 合成経路において OMP を脱炭酸し UMP を合成することが知られている。実際に、*ura4* 遺伝子の破壊により反応の前駆体である OMP が蓄積することを明らかにした。しかし、OMP が細胞溶解にどのように関与しているかは不明である。

そこで、私は分裂酵母非必須遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングを行なうことにした。ライブラリーの 3400 株を YPD 培地にスポットし細胞溶解抑圧株を単離した。結果として、*ura4* 遺伝子破壊株における細胞溶解は *pub1* 遺伝子の破壊により顕著に抑圧されることを見出した。

*Pub1* は E3 ユビキチンリガーゼであり、膜タンパク質の局在制御に関与していることが分かっている。そこで、*pub1* 遺伝子破壊株の表現型を調べると、ウラシルのアナログである 5-FU に対して強い感受性を示すことを見出し、この感受性はウラシルトランスポーターである *fur4* 遺伝子の破壊により抑圧された。そこで、*pub1* 遺伝子破壊株における *Fur4* の局在を調べると、*Fur4* の膜局在が増加していることを明らかにした。次に *Fur4* の膜局在の増加による影響を調べた。その結果、*pub1* 遺伝子破壊株では *Fur4* 依存的なウラシルの取り込みが亢進していることを明らかにした。そこで、過剰なウラシルが *ura4* 遺伝子破壊株の細胞溶解を抑圧するかを調べるために YPD 培地にウラシルを添加した。すると、過剰なウラシルの添加により *ura4* 遺伝子破壊株の細胞溶解が抑圧された。

また、*Fur4* の局在制御機構に関して解析を進め、*Fur4* はユビキチン化していることを明らかにした。このユビキチン化は *pub1* 遺伝子の破壊では消失しなかった。一方、*Fur4* は窒素源枯渇条件下において膜局在が増加しユビキチン化も消失する。このことから *Fur4* の膜局在の制御にはユビキチン化が関与する可能性が示唆された。

最終的に *pub1* 遺伝子破壊株において *Fur4* を介した細胞溶解抑圧因子であるウラシルの取り込みが亢進することで *ura4* 遺伝子破壊株の細胞溶解が抑圧され

ると考えている。

次に私は培地成分と細胞溶解との関係性を調べることにした。*ura4* 遺伝子破壊株の細胞溶解は YPD 培地において誘導されるがどの成分が細胞溶解に関与しているかは不明である。そこで、培地中の様々な栄養成分を含んでいる酵母エキスに着目した。過去の結果から細胞溶解はポリペプトンを含まない YE 培地において観察されていた。一方で、YE 培地において細胞溶解が観察されることもある。この原因は使用した酵母エキスの製造メーカーが異なるからと考えた。そこで、私は5つのメーカー（極東製薬、OXOID、BD、オリエンタル酵母、Difco）の異なる酵母エキスを使い細胞溶解が起こるかを調べることにした。その結果、極東製薬の酵母エキスを使用した場合のみ YE 培地での細胞溶解が観察されなかった。また、5つのメーカーの酵母エキスの濃度を上げた場合いずれの条件においても細胞溶解が観察された。このことから、酵母エキスには細胞溶解誘導因子が含まれていると考えた。

次に、私はGC-MSを用いた培地成分の解析を行った。酵母エキスとポリペプトンの成分をGC-MSを用いて同定した結果172のピークを検出した。その中で10個の化合物はOXOIDとBDで検出され、極東製薬の酵母エキスでは検出されなかった。10種類の中に含まれていた尿素を極東製薬のYE培地に添加することで*ura4*遺伝子破壊株の細胞溶解が誘導されることを見出した。尿素添加による細胞溶解は*ura5*や*pub1*遺伝子の破壊やウラシルの添加により抑圧した。この結果からもYPD培地による細胞溶解と尿素添加による細胞溶解のメカニズムは同一であると考えられた。

さらに、尿素の影響はその分解物に依存するかを知るためにウレアーゼをコードする*ure2*遺伝子の破壊株を作製しその影響を調べた。*ura4ure2*二重遺伝子破壊株において尿素の添加による細胞溶解は抑圧された。しかし、*ure2*遺伝子の破壊ではYPD培地における細胞溶解の抑圧は観察されなかった。これらの結果から、私は尿素自身が細胞溶解を誘導するわけではなく細胞内における窒素濃度の上昇が細胞溶解を誘導するのではないかと考えている。

このように本論文では*pub1*遺伝子破壊株における細胞溶解の抑圧はFur4を介したウラシルの取り込み量の増加によると結論づけた。また、*ura4*遺伝子破壊株による細胞溶解は尿素により誘導されることを明らかにした。しかし、実際は尿素そのものが細胞溶解の原因ではなく尿素添加による細胞内の窒素濃度の上昇が原因であると考えている。

本論文では*ura4*遺伝子破壊株の細胞溶解現象の解析を通じて、分裂酵母のウラシル取り込みメカニズムと複雑な培地成分が分裂酵母に与える影響に関して新たな知見を提供した。