

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	西野耕平
審査委員	<p>主査 川向 誠 (印)</p> <p>副査 戒能 智宏 (印)</p> <p>副査 東 政明 (印)</p> <p>副査 阿座上弘行 (印)</p> <p>副査 松尾 安浩 (印)</p>
題目	Analysis of inducers and suppressors controlling cell lysis in <i>S. pombe</i> <i>ura4</i> deletion strains (分裂酵母 <i>ura4</i> 破壊株の細胞溶解を制御する促進及び抑圧因子の解析)
<p>審査結果の要旨 (2,000字以内)</p> <p>分裂酵母 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>) は真核生物のモデル生物として盛んに研究されている。分裂酵母の <i>ura4</i> 遺伝子破壊株は劇的な細胞溶解を誘導するということが、先行研究により知られている。本研究ではそのメカニズムの詳細を解析することを目的としている。<i>ura4</i> 遺伝子は <i>de novo</i> UMP 合成経路の下流に位置するオロチジル酸デカルボキシラーゼをコードし、その遺伝子破壊により前駆体である OMP が蓄積する。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。そこで本研究では、細胞溶解を抑制する因子と促進する因子の探索が行われた。</p> <p>学位申請者は分裂酵母非必須遺伝子破壊株ライブラリーを用いて、細胞溶解を抑制する株のスクリーニングを行なった。スクリーニングの結果、<i>pub1</i> 遺伝子の破壊により <i>ura4</i> 遺伝子破壊による細胞溶解が劇的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。<i>pub1</i> 遺伝子破壊による細胞溶解の抑圧は膜タンパク質の局在制御を介したものではないかと推測し、ウラシルトランスポーターである Fur4 の局在を調べることにした。まず、<i>pub1</i> 遺伝子破壊株が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た。<i>fur4</i> 遺伝子の破壊により <i>pub1</i> 遺伝子破壊株の 5-FU 感受性は抑圧された。また、<i>pub1</i> 遺伝子破壊株において Fur4 の膜への局在は増加していることを明らかにした。また、<i>pub1</i> 遺伝子破壊株においてはウラシルの取り込みが有意に上昇していることを明らかにした。加えて、<i>ura4</i> 遺伝子破壊株による細胞溶解は過剰量のウラシルの添加により回復することを明らかにした。このように、<i>pub1</i> 遺伝子破壊株において Fur4 の膜局在の増加に伴うウラシルの取り込みが亢進することが細胞溶解の抑圧をひき起こすと考えられた。</p>	

これまでの研究結果では、細胞溶解はポリペプトンを含むYE培地において観察されている。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。この違いは、酵母エキスの製造メーカーが異なることが原因であると考えて、5つのメーカー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、細胞溶解は観察されない一方で、OXOID, BD, オリエンタル酵母、Difcoの酵母エキスを使用した場合、細胞溶解が観察された。次に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。しかしながら、どの成分が細胞溶解に寄与しているかは不明である。そこで、極東製薬の酵母エキスに細胞溶解抑圧因子が含まれている、もしくは細胞溶解誘導因子がないのではないかと考えた。細胞溶解抑圧因子であるウラシルの濃度をLC-MSと安定同位体を用いて測定した結果、極東製薬の酵母エキスには最も多くのウラシルが存在することを見出した。しかしながら、細胞溶解の抑圧は酵母エキスの濃度の増加では観察されなかった。このことから、酵母エキスには未同定の細胞溶解誘導因子が含まれていると考えた。そこで、GC-MSを用いた培地成分の解析を行なうことにした。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個のなかに尿素が含まれていた。尿素は極東製薬のYE培地において*ura4*遺伝子破壊株の細胞溶解を誘導した。尿素添加による細胞溶解は*ura5*や*pub1*遺伝子の破壊により抑圧された。また、ウラシルの添加によっても抑圧された。*ure2*遺伝子はウレアーゼをコードしており、*ure2*遺伝子の破壊により尿素代謝が起こらないことが報告されている。そこで、*ura4ure2*二重遺伝子破壊株において細胞溶解が起こるかを検証した。その結果、*ure2*遺伝子の破壊により尿素を含むYE培地の*ura4*遺伝子破壊株における細胞溶解が抑圧された。これらの結果から、尿素が細胞溶解を誘導することがわかり、尿素が代謝され、細胞内における窒素源濃度の上昇が細胞溶解を誘導すると考えられる。

このように学位申請者は分裂酵母 *S. pombe* の特異的な細胞溶解現象を解明し、培地成分と細胞内応答をつなげる新たな重要な知見を提供していることから、本論文は博士（農学）の学位論文に値すると認められる。