

|         |  |         |         |
|---------|--|---------|---------|
| 氏 名(国籍) | かき<br>笠  | はら<br>原 | しん<br>紳 |
| 学位の種類   | 博  | 士       | (農 学)   |
| 学位記番号   | 農 博 第  | 4 7 1   | 号       |
| 学位授与年月日 | 平 成 6 年 3 月 25 日   |         |         |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 4 条第 1 項該当   |         |         |
| 研究科専攻   | 東北大学大学院農学研究科<br>(博士課程) 農芸化学専攻  |         |         |
| 学位論文題目  | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の <i>Hansenula mrakii</i> キラートキシン耐性遺伝子に関する研究 |         |         |

|             |     |         |
|-------------|-----|---------|
| 論文審査委員(主 査) | 教 授 | 水 野 重 樹 |
|             | 教 授 | 折 谷 隆 之 |
|             | 教 授 | 伊 崎 和 夫 |
|             | 助教授 | 中 島 佑   |

# 論文内容要旨

## 第一章

### 序論

酵母や糸状菌等、真菌の細胞壁はキチン、 $\beta$ -グルカンそしてマンノースを含むヘテログリカンから成っている。中でも $\beta$ -1,3-結合を主成分とするグルカンは、その主要骨格成分として酵母から糸状菌まで広く存在が確認されており、細胞形態の形成、維持に深く関わっていて、生育に不可欠な成分であると考えられている。一方、 $\beta$ -グルカンは哺乳類等の高等動物の細胞には存在しないが、真菌や植物においては細胞壁に不可欠の構成成分であるために、この $\beta$ -グルカンをターゲットとした、選択毒性をもつ抗真菌剤の開発には大きな効果が期待されている。しかしながら現在のところ、医薬として実用化されているものはほとんどない。その背景として考えられることは、まず第一に $\beta$ -グルカンの生合成機構についての知見が極めて乏しいことがあげられる。細胞壁の他の成分であるマンナンとキチンについては、生合成機構の分子レベルでの解析が進められつつある一方で、 $\beta$ -グルカンの、特に*in vivo*における細胞壁中での複雑な高次構造の形成過程については、いまだ明らかにされていない。それには、現時点では有効な突然変異体が得られていないこと、また $\beta$ -グルカン合成酵素系には不安定な複数の因子が関与しており、解離して不活性化しやすい等の理由がある。ごく最近になって product entrapment を用いた *Neurospora crassa* の  $\beta$ -1,3-グルカン合成酵素についての研究、あるいは *Saccharomyces cerevisiae* の  $\beta$ -グルカン合成系において重要な役割を果たしていると考えられる *KRE* 遺伝子群の解析が行われ、それらの結果から  $\beta$ -グルカンの合成系が、合成酵素のみならず、多くの因子が関与する複雑な系であることが示唆された。そして既存の真菌細胞壁の  $\beta$ -グルカン合成阻害剤といわれるものは、その作用機作が分子レベルでは明らかにされていないため、極めて複雑と思われるグルカン合成系のどの段階に作用しているのかが不明である。したがって細胞壁  $\beta$ -グルカンをターゲットとした新しい抗真菌剤の開発を合理的に進めるためには、まずはそのターゲットである  $\beta$ -グルカンの生合成機構を解明することが先決となってくる。

ある微生物が他の微生物に対して、その生育を阻害する現象は、大腸菌のコリ

シン産生菌等のバクテリオシン産生細菌においてよく知られているが、同様の現象は酵母においてもみられ、一般にこのような現象をキラートキシン、またこのような現象を引き起こす物質をキラートキシンと称している。そして複数の属の酵母において、タイプの異なるキラートキシン、数種類が知られている。またそれぞれのキラートキシンの作用機作についても*S. cerevisiae*のK1キラートキシン系をはじめ、*Kluyveromyces lactis*、*Pichia kluyveri*、*Hansenula mrakii*等で解析がなされており、中でも*H. mrakii*のキラートキシン系では、*in vivo*の系において感受性酵母の細胞壁 $\beta$ -グルカン、特にアルカリ不溶、酸不溶 $\beta$ -グルカンの合成を阻害することで致死的な効果をもたらすことがわかっている。しかし*in vitro*のアッセイ系ではその阻害効果ははるかに小さく、分子レベルでの作用機作については未だ不明の点が多く残されている。

本研究においては、*H. mrakii*の産生するキラートキシン(HM-1)が*S. cerevisiae*等の感受性酵母の細胞壁 $\beta$ -グルカンの合成を特異的に阻害することに着目して、その作用機構の分子レベルでの解明および標的物質の同定をめざして、*S. cerevisiae*より同菌にHM-1トキシン耐性の表現型を与える遺伝子を単離し、その構造を明らかにして、性質さらにその遺伝子産物の $\beta$ -グルカン合成系における役割について解析、検討することを目的とした。

## 第二章

### *S. cerevisiae*の*H. mrakii*キラートキシン耐性遺伝子のクローニングと諸性質の決定

#### 2-1 *S. cerevisiae*ゲノムライブラリーの調製

*S. cerevisiae*と*Escherichia coli*のシャトルベクターであるYEp213のBamHI部位に、Sau3AIで部分消化した*S. cerevisiae*のゲノムDNAを挿入し、ライブラリーとした。ベクターのYEp213は2  $\mu$ m DNAの複製起点をもち、*S. cerevisiae*の細胞内でもマルチコピーで存在する。このライブラリーを*S. cerevisiae* A451にトランスフェクトして、特定遺伝子の過剰発現を行った。一方、*S. cerevisiae* A451は0.7  $\mu$ g/mlのHM-1トキシンによって完全にその生育が阻止されるため、同濃度のHM-1トキシンを含む寒天培地にプレーティング後、生育可能なクローンを選別した(Fig. 1, 2)。

2次スクリーニングの後、耐性クローンよりプラスミドDNAを回収して、耐性形質を与える最小領域を限定した(Fig. 3)。

## 2-2 *S. cerevisiae*の*H. mrakii*キラートキシン耐性遺伝子(*HKR1*)の構造と諸性質

Fig. 3より*Hind*III消化による2.6 kbの断片がHM-1トキシン耐性の形質を与える領域であると判断した。この部分についてサンガー法により塩基配列の決定を行った。Genomic Southern blot analysisの結果より、本遺伝子は*S. cerevisiae*のゲノム上に1コピー存在することが示された(Fig. 4)。Northern blot analysisを行ったところ、上記のプラスミドをトランスフェクトした細胞には約3 kbの予想されたサイズのメッセージが認められたが、endogenousなメッセージは約6 kbであることが判明した(Fig. 5)。また塩基配列を決定したところ、翻訳開始のメチオニンと考えられる位置の5'上流側にもOpen reading frameが連続しているように思われること、またその部分に典型的なプロモーターの配列が見出せないことより、ここで得たクローンは部分的なものであると結論し、再度ゲノムライブラリーをスクリーニングして全長を含むクローンを得た。また塩基配列の決定を行った。本遺伝子は*HKR1* (*Hansenula mrakii* Killer toxin Resistant gene 1)と命名した。*HKR1*は5406 bpから成り、1802個のアミノ酸、分子量189 kDaのタンパク質をコードしていると考えられ、そこには8箇所のアスパラギン結合型糖鎖の付加部位が認められた(Fig. 6、7)。推定アミノ酸配列についてhydropathy plotを行ったところ、そのN末端にはシグナルペプチドとして機能しうる疎水性に富むリーダー配列が、またC末端側には膜貫通領域の可能性をもつ非常に疎水性の高い配列がみられた(Fig. 6、7)。さらに本遺伝子産物の特徴として、その中央付近の繰返し配列の存在が指摘され(Fig. 6)、また推定されるアミノ酸組成ではSer、Thrに富むことから(Fig. 7)、酵母細胞表層において高度に糖修飾を受けているものと予想された。さらにCa<sup>2+</sup>結合コンセンサスとして知られるEF-ハンドモチーフが完全な形で認められた(Fig. 8)。EMBLおよびGenBankデータベースに対してホモロジー検索を行った結果、既知のいずれの遺伝子とも異なる、新規のものであることが判明したが、興味深いことに*S. cerevisiae*の細胞周期変異、*cdc24*のマルチコピーサプレッサー遺伝子である*MSB2*とヌクレオチドのレベルで約45%、またアミノ酸のレベルで約33%のホモロジーがみられた。

### 第三章

#### HKRIの誘導発現およびHKRIタンパク質の機能の解析

##### 3-1 HKRIタンパク質に対する抗体の作製

酵母細胞からのHKRIタンパク質の精製は困難と思われたので、HKRIのC末端部分をグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質の形で大腸菌内で発現させて精製し、これを抗原としてウサギにて抗体を作製した(Fig. 9)。

##### 3-2 HKRIの誘導発現およびHKRIタンパク質の機能の解析

Northern blot analysisの結果、endogenousなHKRIメッセージのレベルは低かったので、ガラクトースにより誘導可能なプロモーターGAL1あるいはGAL7の下流にHKRIの全長および当初得られたC末端側の配列を接続して誘導発現を行った。mRNAレベルの発現をNorthern blottingにより行った(Fig. 10)。またタンパク質レベルの発現をWestern blottingにより確認した結果、C末端側では強く誘導発現されたが全長では誘導発現の効果は小さかった(Fig. 11)。またこれはN末端のリーダー配列近傍にタンパク質の安定性に寄与している領域が存在するためであると推定された。またHKRIの過剰発現によるHM-1トキシン耐性の獲得について検討した結果、耐性獲得にはそのC末端側のみで十分であること、またその方がより強い耐性を示した(Fig. 12)。このことはタンパク質の発現量に対応しているものと推定された。 $\beta$ -グルカン合成酵素活性に及ぼす影響を検討したところHKRIの過剰発現は活性の低下をもたらし、またここでもC末端側の場合に大きな効果がみられた(Fig. 13)。またHKRIの全長およびC末端側を過剰発現させた細胞の細胞壁 $\beta$ -グルカンの構造変化について検討した。アルカリおよび酸による抽出を行ったところ、HKRIのC末端側を過剰発現させた細胞では、アルカリ、酸不溶グルカンの含量が顕著に増大しており(Fig. 14)、またメチル化分析の結果では、1,3-結合の含量が減少していた。さらにHKRIが*S. cerevisiae*の生育に必須であるかどうかを調べるためにdisruptionを行った。胞子の四分子解析の結果、4胞子中2個のみが発芽し、HKRIのdisruptionは致死の表現型をとることが判明した。よって本遺伝子

は生育に必須な遺伝子であると結論した(Fig. 15、16)。

## 第四章

### HKR1の過剰発現によるHM-1トキシン耐性獲得機構について

#### 4-1 各種オリゴ糖および多糖を用いた競合実験

*S. cerevisiae* A451にHM-1トキシンを作用させる際、その反応系に各種オリゴ糖または多糖を濃度を変えて添加し、HM-1トキシンの作用に及ぼす各種糖質の影響を調べた。オリゴ糖、多糖は短鎖バキマン( $\beta$ -1,3-グルカン、重合度約20)、プスチュラン( $\beta$ -1,6-グルカン、ポリマー)、ラミナラン( $\beta$ -1,3- &  $\beta$ -1,6-グルカン、ポリマー)、酵母マンナン(ポリマー)、キチン(重合度4~5)そして可溶性馬鈴薯デンプン(ポリマー)を用いた。各糖の終濃度は1.25、2.5、5.0、10.0 mg/ml、HM-1トキシンの終濃度は1.5  $\mu$ g/mlとし、30℃で3時間プレインキュベートした後、プレーティングして、形成されたコロニー数を計測した。その結果、短鎖バキマン、プスチュランおよびラミナランにおいてHM-1の作用が強く阻害され、また酵母マンナンでも弱い阻害効果がみられた。キチンとデンプンでは阻害効果がみられなかった。このことからHM-1トキシンは $\beta$ -1,3-および $\beta$ -1,6-グルカン系の多糖と強い相互作用をもつことがわかり、またマンナンが弱い阻害効果をもつことから、細胞壁中の $\beta$ -グルカンとマンナンを含む多糖複合体の高次構造を認識して作用を及ぼすものと推定した(Fig. 17)。

#### 4-2 *KRE6*欠損変異体を用いたHM-1トキシン耐性機構の解析

*S. cerevisiae*の*KRE6*はこれまでに報告されている数少ない $\beta$ -グルカン合成系遺伝子の一つである。*KRE6*は*S. cerevisiae*の生育には必須ではなく、disruptantを用いた機能の解析が可能である。*KRE6*のdisruptant(*kre6* $\Delta$ )細胞はその細胞壁 $\beta$ -グルカンの構造、特に $\beta$ -1,6-グルカン量の減少をきたしていることが知られている。本研究では*KRE6*および*kre6* $\Delta$ 細胞について、分画した $\beta$ -グルカン画分のメチル化分析を行い、その構造変化とHM-1トキシン耐性の相関を検討した。*KRE6*のコード領域の大部分を*LEU2*遺伝子に置換することでdisruptionを行った。また

disruptantの $\beta$ -グルカン合成能を検討した(Fig. 18)。KRE6およびkre6 $\Delta$ 細胞について、各々のHM-1トキシン耐性について検討した。各々の細胞に対してHM-1トキシンの濃度を変えて作用させ、一定時間インキュベートした後にプレーティングして生存率を調べた。KRE6細胞のIC<sub>50</sub>は約0.5  $\mu$ g/mlであるのに対してkre6 $\Delta$ 細胞では約1.1  $\mu$ g/mlであり、HM-1トキシンに対する感受性が半減していた(Fig. 19)。また各々の細胞壁 $\beta$ -グルカンを分離、分画した後、メチル化分析を行って構造を解析したところkre6 $\Delta$ 細胞では $\beta$ -1,6-結合の占める割合が減少していた(Table I)。これより細胞壁 $\beta$ -グルカンの構造変化とHM-1トキシン耐性獲得の相関が示唆された。

## 第五章

### 結論

本研究においては、*S. cerevisiae*等の感受性酵母の細胞壁 $\beta$ -グルカンの生合成を特異的に阻害するとされる*H. mrakii*キラートキシン(HM-1)に対して、耐性の形質を与える遺伝子HKR1を*S. cerevisiae*のゲノムより単離して構造を決定し、またその遺伝子産物の機能を検討した。HKR1産物はその推定構造から細胞表層に存在するmannoproteinであると考えられた。HKR1およびHKR1産物に関しては、本来、細胞壁 $\beta$ -グルカンの合成阻害剤とされるHM-1トキシンに耐性の形質を与える遺伝子として単離されたこと、その遺伝子破壊が致死の表現型をとること(Fig. 15、16)、またCa<sup>2+</sup>結合のコンセンサスであるEF-ハンドモチーフを有すること(Fig. 8)から、単なる構造タンパク質ではなく、何らかの機能を有するものであると推測されたので、特にその過剰発現が細胞壁 $\beta$ -グルカンの合成系に及ぼす影響について検討した。その結果、HKR1の過剰発現が細胞壁中のアルカリおよび酸不溶グルカンの含量を上昇させること(Fig. 14)、またメチル化分析の結果から $\beta$ -1,3-結合の割合を減少させることが明らかとなり、 $\beta$ -グルカン合成系への関与が示唆された。HKR1は*S. cerevisiae*のcdc24のマルチコピーサプレッサー遺伝子であるMSB2とヌクレオチドおよびアミノ酸のレベルで配列の相同性がみられたが、HKR1を過剰発現させても温度感受性cdc24細胞は、nonpermissive temperatureでは生育できず、またHKR1はessential geneである一方でMSB2はnonessential geneであるこ

とから、両者は機能的に異なる遺伝子であると考えられた。

*HKR1*の過剰発現によるHM-1トキシン耐性の獲得機構としては、*HKR1*タンパク質が細胞壁 $\beta$ -グルカンの合成系に直接関与するものであり、またHM-1トキシンの酵母細胞表層上のレセプターが $\beta$ -グルカンであるとする、*HKR1*の過剰発現によって $\beta$ -グルカンの構造が変化し、その結果HM-1トキシンとの親和力が失われるか、あるいは低下することで耐性を獲得するものと考えられる。Fig. 14に示した通りに*HKR1*の、特にC末端側の過剰発現は立体構造を含めた細胞壁 $\beta$ -グルカンの構造に変化をもたらすことが明らかになっており、またFig. 17のようにHM-1トキシンが $\beta$ -グルカン系の多糖、オリゴ糖と強い相互作用をもつことが示され、さらに*KRE6*欠損(*kre6* $\Delta$ )株を用いた解析(Fig. 18、19、Table I)より、細胞壁 $\beta$ -グルカンの構造変化とHM-1トキシン耐性の相関が示されたことは上記の仮説を支持するものと考えられた。そして全長を過剰発現させた場合の効果が小さいことはタンパク質としての発現量が小さいことによると考えられた。



## 原著論文

- 1 : S. Kasahara, H. Yamada, T. Mio, Y. Shiratori, C. Miyamoto, T. Yabe, T. Nakajima, E. Ichishima and Y. Furuichi  
Cloning of the *Saccharomyces cerevisiae* gene whose overexpression overcomes the effects of HM-1 killer toxin, an inhibitor of  $\beta$ -1,3-glucan synthesis  
*J. Bacteriol.* submitted (under revision)
- 2 : S. Kasahara, S. B. Inoue, T. Mio, T. Nakajima, E. Ichishima, Y. Furuichi and H. Yamada  
Involvement of cell wall  $\beta$ -1,3-glucan in the action of HM-1 killer toxin  
*FEBS Lett.* submitted
- 3 : S. Kasahara, T. Yabe, H. Yamada, Y. Furuichi, T. Nakajima and E. Ichishima  
Function of the *Saccharomyces cerevisiae* gene *HKR1* in cell wall  $\beta$ -glucan synthesis  
manuscript in preparation

## 参考論文

- 1 : S. Kasahara, T. Nakajima, C. Miyamoto, K. Wada, Y. Furuichi and E. Ichishima (1992) Characterization and mode of action of exo-1,3- $\beta$ -D-glucanase from *Aspergillus saitoi*. *J. Ferment. Bioeng.*, **74**, 238-240

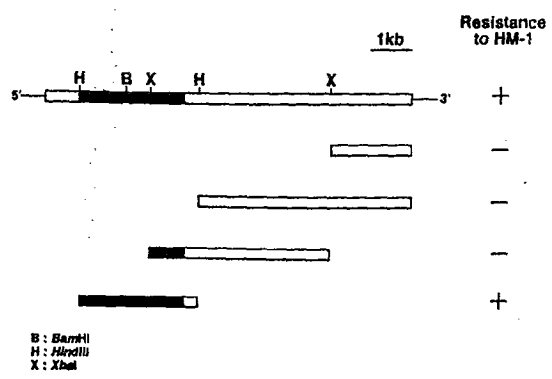
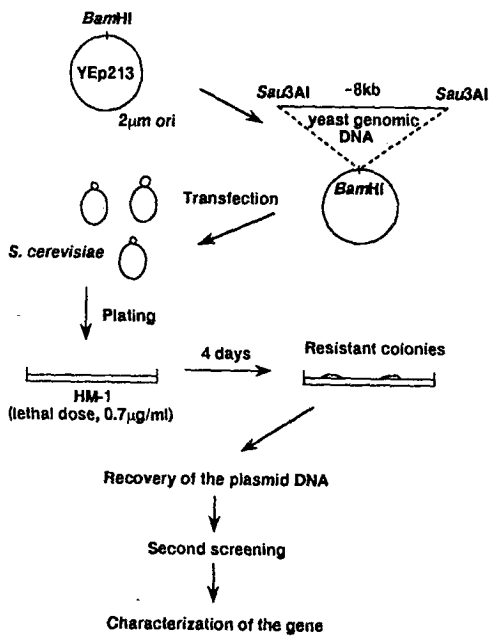


Fig. 3 Identification of the region required for the resistance to HM-1toxin

Fig. 1 Cloning strategy of the HM-1 toxin resistant gene from *Saccharomyces cerevisiae*

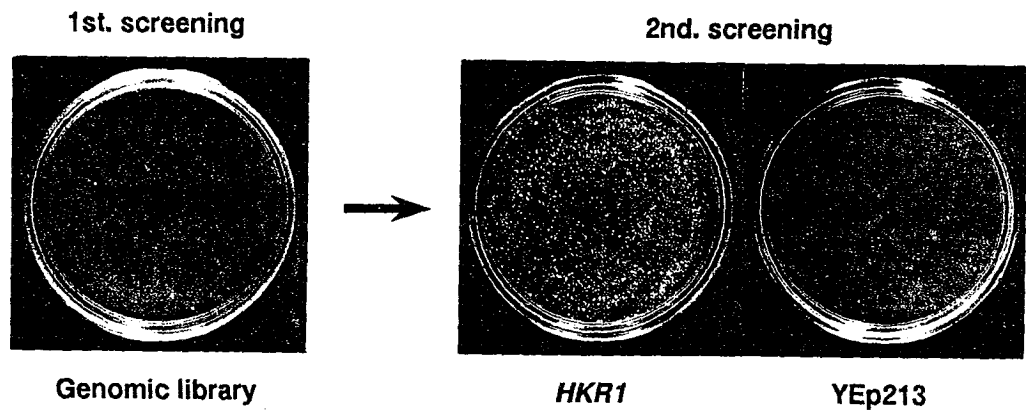


Fig. 2 Screening of the HM-1 toxin resistant gene

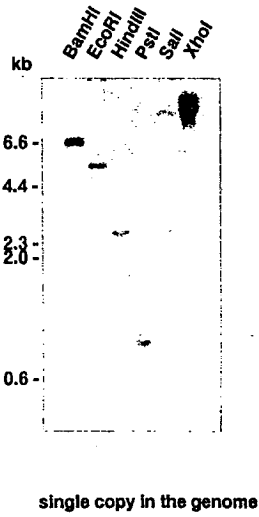


Fig. 4 Southern blot analysis of *HKR1*

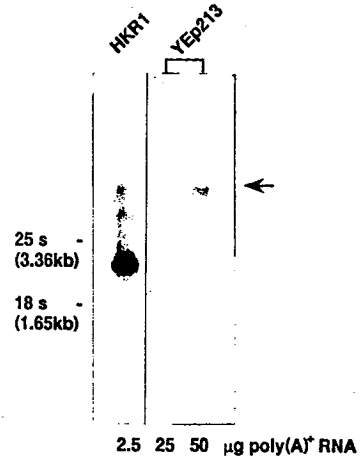
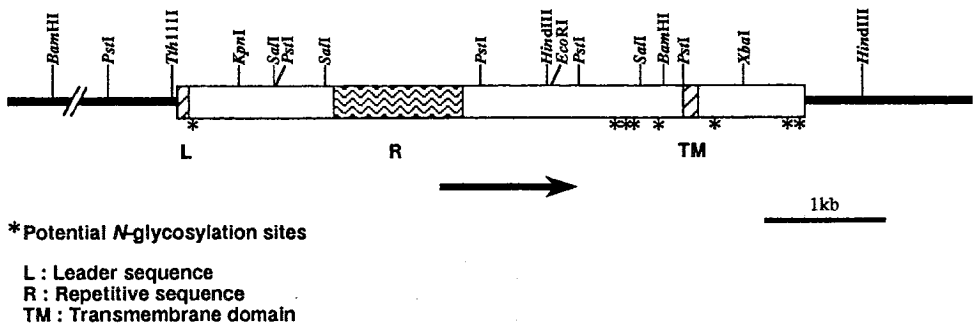


Fig. 5 Northern blot analysis of *HKR1* message



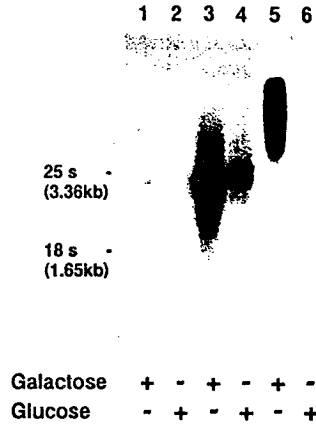
*Hansenula mrakii* Killer toxin Resistant gene 1  
 New gene (homologous to the multicopy  
 suppressor gene of *cdc24*, *MSB2*)

Fig. 6 Restriction map and structural characteristics of *HKR1* and Hkr1p



|  |                                 |
|--|---------------------------------|
| Consensus<br>(EF-hand)                             | DXDXNGXIXXXD<br>N N D V E<br>S  |
| Hkr1p  | <sup>1645</sup><br>DVDENGDIRLYD |
| Troponin C<br>[human]                              | <sup>148</sup><br>DKNNDGRIDYDE  |
| Parvalbumin<br>[human]                             | <sup>55</sup><br>DKDKSGFIEEDE   |
| Calmodulin<br>[ <i>P. hybrida</i> (plant)]         | <sup>98</sup><br>DKDQNGYISAAD   |
| Calmodulin<br>[ <i>S. cerevisiae</i> ]             | <sup>99</sup><br>DKNGDGLISAAE   |
| Cdc31p<br>[ <i>S. cerevisiae</i> ]                 | <sup>147</sup><br>DLDGGEINENE   |
| H <sup>+</sup> pump<br>[ <i>S. cerevisiae</i> ]    | <sup>85</sup><br>DSDNDGPVAAGE   |
| Glucanase<br>[ <i>C. thermocellum</i> (bacterium)] | <sup>714</sup><br>DVDGNGRINSTD  |

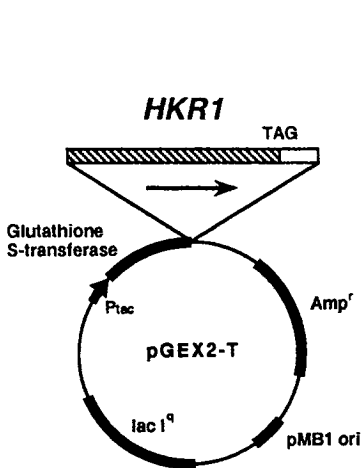
*P. hybrida* : *Petunia hybrida*  
*S. cerevisiae* : *Saccharomyces cerevisiae*  
*C. thermocellum* : *Clostridium thermocellum*



1, 2 : Vector  
3, 4 : GAL7-HKR1 C-terminal half  
5, 6 : GAL7-HKR1 full length

Fig. 10 Induction of *HKR1* mRNA

Fig. 8 EF-hand motifs within Hkr1p and other calcium binding proteins



pGEX-2T

Thrombin cleavage site

|     |     |     |     |               |            |     |              |               |            |
|-----|-----|-----|-----|---------------|------------|-----|--------------|---------------|------------|
| L   | V   | P   | R   | G             | S          |     |              |               |            |
| CTG | GTT | CCG | CGT | GGA           | TCC        | CCG | GGA          | ATT           | CAT        |
| GAC | CAA | GGC | GCA | <u>CCT</u>    | <u>AGG</u> | GGC | <u>CCT</u>   | <u>TAA</u>    | <u>GTA</u> |
|     |     |     |     | <i>Bam</i> HI |            |     |              | <i>Eco</i> RI |            |
|     |     |     |     |               |            |     | <i>Sma</i> I |               |            |

*HKR1*

|     |     |            |            |              |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|------------|------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| S   | G   | I          | L          | D            | V   | D   | E   | N   | G   | D   |
| TCA | GCC | ATT        | CTA        | GAT          | GTT | GAT | GAA | AAT | GGT | GAT |
| AGT | CCG | <u>TAA</u> | <u>GAT</u> | <u>CTA</u>   | CAA | CTA | CTT | TTA | CCA | CTA |
|     |     |            |            | <i>Xba</i> I |     |     |     |     |     |     |

(pGEX-2T / *Eco*RI) filled + (*HKR1* / *Xba*I) filled

|        |        |
|--------|--------|
| GGAATT | CTAGAT |
| CCTTAA | GATCTA |

P G I L D  
CCG GGA ATT CTA GAT  
GGC CCT TAA GAT CTA

Fig. 9 Construction of the plasmid for the expression of GST-*HKR1* fusion protein

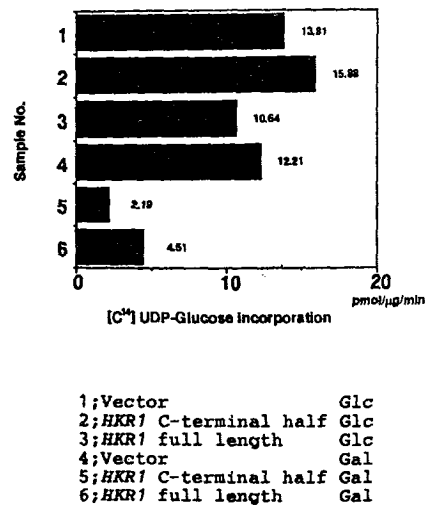
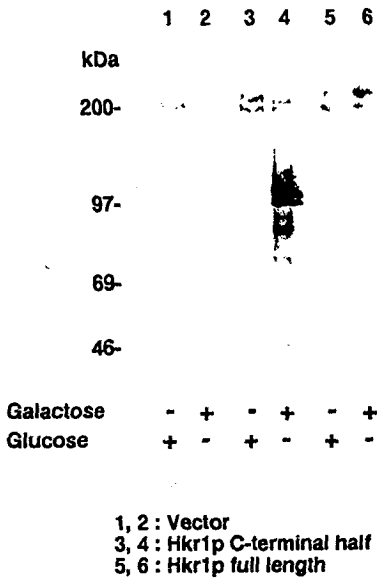


Fig. 13  $\beta$ -1,3-glucon synthase activity

Fig. 11 Western blot analysis of Hkr1p

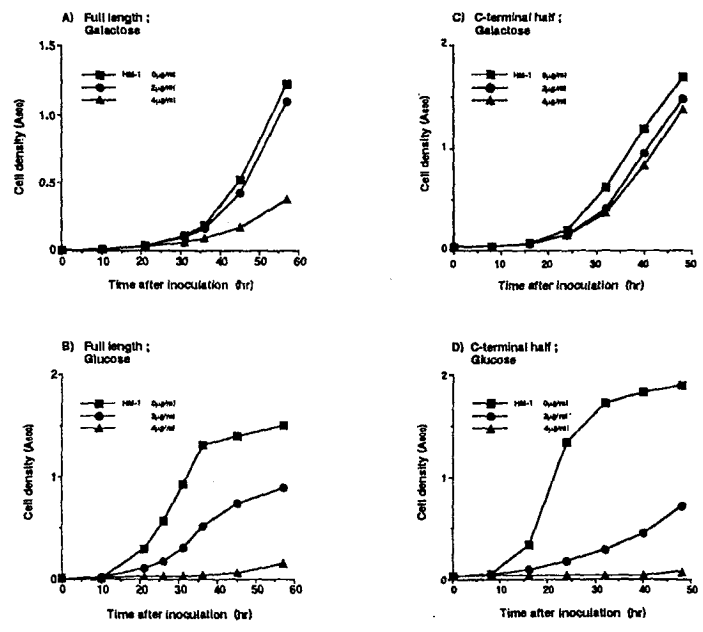
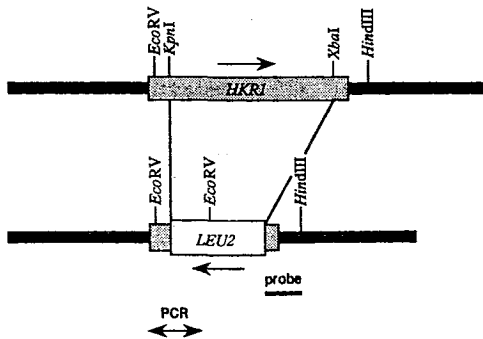
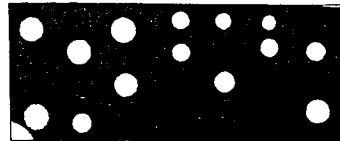


Fig. 12 Growth of each transformant in the presence of HM-1 toxin

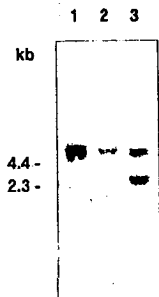
**A) Disruption strategy**



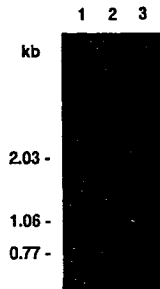
A)



**B) Southern blotting**



**C) PCR**



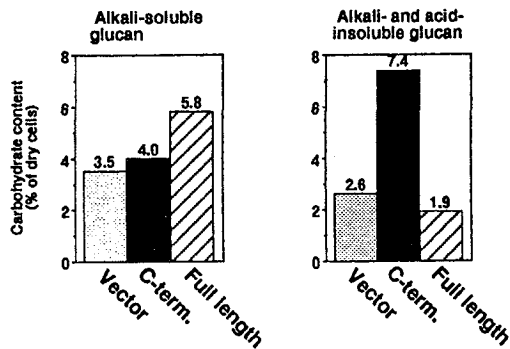
B)

| Transformant | Viable spores per tetrad |   |    |   | Ratio of spores |  |
|--------------|--------------------------|---|----|---|-----------------|--|
|              | 4                        | 3 | 2  | 1 | leu+ : leu-     |  |
| 1            | 0                        | 0 | 12 | 0 | 0 24            |  |
| 2            | 0                        | 0 | 12 | 0 | 0 24            |  |
| 3            | 0                        | 0 | 12 | 0 | 0 24            |  |

**Fig. 16 Tetrad analysis of *hkr1/HKR1* transformants**

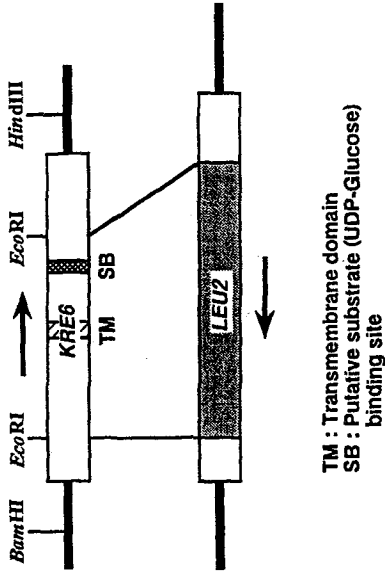
1 : Parental diploid (RAY 3 A-D)  
 2 : Haploid from a viable spore  
 3 : Diploid with disrupted allele

**Fig. 15 Disruption of *HKR1***

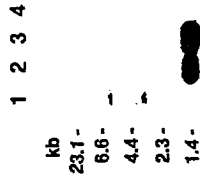


**Fig. 14 Cell wall  $\beta$ -glucan content of each transformant**

**A) Disruption strategy of *KRE6***

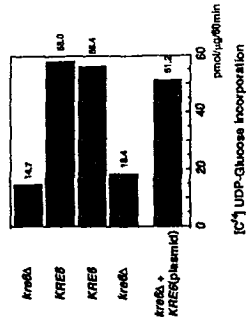


**B) Southern blotting**

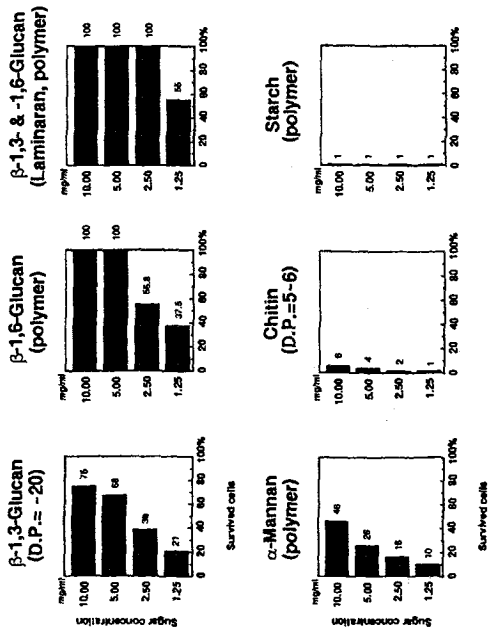


1 : *kre6Δ*  
2 : *KRE6*  
3 : *KRE6*  
4 : *kre6Δ*

**C)  $\beta$ -1,3-Glucan synthase activity**



**Fig. 17 Inhibition of HM-1 cytocidal activity by various sugars**



**Fig. 18 Disruption of *KRE6***



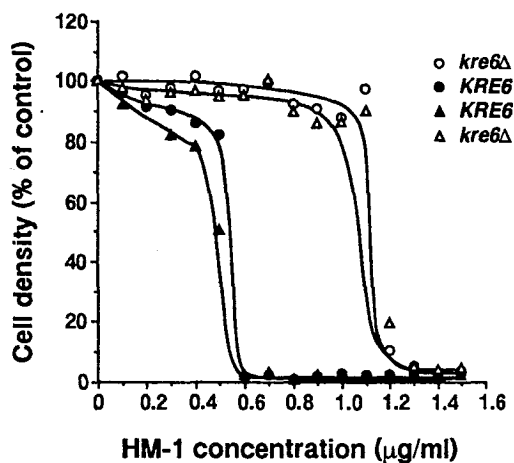


Fig. 19 Sensitivity to HM-1 toxin of *KRE6* and *kre6Δ* cells

Table I Methylation analysis of cell wall  $\beta$ -glucans from *KRE6* and *kre6Δ* cells

| Alditol acetates       | Linkages  | Alkali-soluble glucan |              | Alkali- and acid-insoluble glucan |              |
|------------------------|---|-----------------------|--------------|-----------------------------------|--------------|
|                        |   | <i>KRE6</i>           | <i>kre6Δ</i> | <i>KRE6</i>                       | <i>kre6Δ</i> |
| 2,3,4,6-Tetra-O-Me-Glc | G <sup>1</sup>  | 1.1                   | 1.2          | 1.1                               | 1.0          |
| 2,4,6-Tri-O-Me-Glc     | <sup>3</sup> G <sup>1</sup>                               | 12.1                  | 10.9         | 14.5                              | 15.1         |
| 2,3,4-Tri-O-Me-Glc     | <sup>6</sup> G <sup>1</sup>                               | 3.3                   | 1.9          | 2.0                               | 1.3          |
| 2,4-Di-O-Me-Glc        | <sup>3</sup> G <sup>1</sup>                               | 1.0                   | 1.0          | 1.0                               | 1.0          |
|                        | <sup>3</sup> G <sup>1</sup> / <sub>6</sub> G <sup>1</sup> | 3.7                   | 5.7          | 7.3                               | 11.6         |

## 論文審査の要旨

酵母は古くから発酵食品をもたらすものとして人類にとって極めて有用な微生物である。一方、病原性を持つ酵母や糸状菌は今日なお良い治療薬がないと恐れられる存在である。後者に対処するためには、真菌類に選択毒性を持つ抗真菌剤の開発が期待されている。

本研究者は *Hansenula mrakii* のキラートキシンが感受性株である *Saccharomyces cerevisiae* の  $\beta$ -グルカン合成を阻害するという既報に目をとめ研究を開発した。 $\beta$ -グルカンは真菌に存在するが、人類にはない成分である。本研究者はまず *H. mrakii* のキラートキシン耐性の表現型を与える遺伝子を *S. cerevisiae* から単離した。この遺伝子を *HKRI* と命名した。*HKRI* は5406 bp よりなり1802残基のアミノ酸、分子量 189,000のタンパク質をコードしている。その hydropathy plot よりN末端にはシグナルペプチドとして機能しうる疎水性に富むリーダー配列が、中央付近には大変に珍しい繰り返し配列が、そしてC末端付近には膜貫通領域と推定される非常に疎水性の高い領域が存在することを明らかにした。また、8箇所のN-グリコシド結合部位が存在することから酵母細胞表層にあり高度に糖修飾を受けているものと推定された。本遺伝子のヌクレオチド配列はジーンバンクのデータベースにより検討した結果、従来全く報告のない新規の遺伝子であることを明らかにした。

*HKRI* 遺伝子を発現させその遺伝子産物を取るために、本研究者は *HKRI* のC末端部分をグルタチオン-S-トランスフェラーゼとの融合タンパク質の形で大腸菌内に発現させ精製し抗体を得た。*HKRI* の過剰発現によるキラートキシン耐性の獲得には *HKRI* のC末端側のみで十分であることを明らかにした。さらに、この部分を過剰発現させた酵母細胞はアルカリ、酸不溶グルカン含量が増大していた。メチル化分析では  $\beta$ -1, 3-結合の含量が減少していた。*HKRI* の遺伝子破壊を行い、孢子の四分子解析をした結果、四孢子中二個のみが発芽し、*HKRI* は致死的な遺伝子であることを明らかにした。

キラートキシンは  $\beta$ -1, 3-および  $\beta$ -1, 6-グルカン系の多糖と強い相互作用を持つ。*HKRI* 過剰発現によるキラートキシン耐性獲得機構を検討し、*HKRI* タンパク質が細胞壁  $\beta$ -グルカン合成に直接関与することを明らかにした。

以上の結果、審査員一同本研究者に博士（農学）の学位を授与するに値するものと認定した。