

氏 名	三 輪 拓 也
学位(専攻分野)	博 士 (農 学)
学 位 記 番 号	農 博 第 1337 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	農 学 研 究 科 応 用 生 命 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	Studies on G-protein Coupled Receptor Regulating Morphological Switching in Yeasts (酵母の形態変化を制御する G タンパク質共役型受容体に関する研究)
論文調査委員	(主 査) 教 授 熊 谷 英 彦 教 授 清 水 昌 教 授 永 尾 雅 哉

論 文 内 容 の 要 旨

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の Gpr1 は、7 回膜貫通構造をもつ、いわゆる G タンパク質共役型受容体である。即ち、Gpr1 は、膜局在性のタンパク質であり、ヘテロ三量体 G タンパク質の α サブユニット Gpa2 と相互作用し、細胞外グルコースに応答して細胞内 cAMP 濃度を制御している。cAMP は細胞内の二次メッセンジャーとして機能し、真核細胞においてアデニリルシクラーゼによる cAMP の産生とそれに伴う cAMP 依存性キナーゼ (PKA) の活性化 (cAMP-PKA 経路) を通して、様々な細胞機能を制御している。最近、*S. cerevisiae* 並びにその近縁種である病原性真菌 *Candida albicans* において、その酵母型から菌糸型への形態変化が cAMP-PKA 経路と MAP キナーゼ経路により制御されていることが明らかにされている。そこで本論文の著者は、Gpr1 及び *C. albicans* の Gpr1 ホモログ CaGpr1 が、この形態変化のスイッチングに関与しているのではないかと考え、それらのシグナル伝達経路の解析を行った。

本論文は、その研究結果を取りまとめたものであり、内容は以下のように要約できる。

1. *S. cerevisiae* の 2 倍体細胞は、高グルコース、低窒素源環境下で偽菌糸形成を行う。また 1 倍体細胞は、富栄養環境下で寒天培地中に食い込む浸潤成長を行う。これらの形態変化は MAP キナーゼ経路及び cAMP-PKA 経路の二つのシグナル伝達系路によって制御されていることが明らかにされてきた。そこで著者は、Gpr1 並びに Gpa2 の遺伝子欠損株を作成し、形態変化に及ぼす影響について観察したところ、両欠損株において偽菌糸形成並びに浸潤成長への形態変化は著しく阻害された。またこれらの表現型は細胞膜透過性 cAMP 誘導体 (dibutyryl cAMP, db-cAMP) を培地に加えることにより抑圧された。更に、偽菌糸形成に必要な、cAMP-PKA 経路の標的分子である *FLO11* の転写量が両欠損株において減少することを明らかにした。

2. *C. albicans* は周囲の様々な要因、例えば血清や温度の上昇、飢餓などにより、酵母型から菌糸型へとその形態を変化させることが知られている。最近になって、*C. albicans* における形態変化が cAMP-PKA 経路並びに MAP キナーゼ経路により制御されていることが示され、そのシグナル伝達機構が *S. cerevisiae* のそれと非常に似通っていることが明らかとなった。

著者は、*C. albicans* ゲノムデータベースに *S. cerevisiae* の *GPR1* 並びに *GPA2* と相同性を示す遺伝子を見出し、それらのクローニングを行い、それぞれ *CaGPR1*, *CaGPA2* と命名した。*CaGpr1* のアミノ酸配列を解析した結果、典型的な 7 回膜貫通構造を有し、その膜貫通領域のアミノ酸配列は Gpr1 との間に高い相同性を示した。そこで、*CaGpr1* と *CaGpa2* との相互作用を Two-Hybrid 法により調べ、*CaGpr1* の c 末端領域が *CaGpa2* と相互作用することを明らかにした。

C. albicans は 2 倍体である。そこで *CaGPR1* 並びに *CaGPA2* について、それぞれ二対の対立遺伝子を欠損した株を作成し、機能解析を行った。その結果 *CaGPR1* 欠損株においては、グルコース依存的な細胞内 cAMP 濃度の上昇が減衰することを見出した。この結果、*C. albicans* においても *S. cerevisiae* と同様、*CaGpr1* は *CaGpa2* を介して細胞内 cAMP 濃

度を制御していることを明らかにした。

3. 次に, *CaGPR1* 並びに *CaGPA2* 欠損株の菌糸形成に関する表現型を調べた。その結果, 両欠損株では, 固体培地上における形態変化が著しく阻害されていたが, この表現型は培地中に db-cAMP を添加することにより抑圧された。また *CaGPR1* 欠損株に活性化型 *CaGpa2* を大量発現させることで, 形態変化能は回復した。これらの結果から, *CaGpr1* は *CaGpa2* の上流に位置し cAMP-PKA 経路にシグナルを伝達することにより形態変化を制御していることを明らかにした。

最近, *C. albicans* において菌糸形成時に特異的に発現する遺伝子群が数多く同定された。そこで, *CaGPR1* 遺伝子の欠損がこれらの遺伝子群の転写に与える影響について検討した。その結果, *CaGPR1* 欠損株においては, *HWP1* と *ECE1* という二つの菌糸形成時特異発現遺伝子の転写量が, 菌糸形成を固体培地上で誘導した場合に減少することを明らかにした。これらの遺伝子の転写は cAMP-PKA 経路に依存的な転写因子 Efg1 により制御されている。これらの結果から, *CaGpr1* が cAMP-PKA 経路を介して形態変化を制御していることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

酵母はアルコール発酵やパンの製造など, 発酵と醸造分野で重要な役割を果たすが, それとともに真核生物のモデル生物として分子細胞生物学分野での重要な研究材料でもある。真核細胞における情報伝達とそれが制御する遺伝子発現調節機構は, 酵母細胞を用いてよく研究されてきた。本論文において著者は, 先ず, 出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において見出された受容体タンパク質 (*Gpr1*) が, 細胞外の栄養源を認識して偽菌糸形成や浸潤成長という形態変化のスイッチングを行う細胞情報の最上流で機能する分子であることを明らかにした。次いで, *Candida albicans* において, 同様の受容体タンパク質の存在を見出し, これが制御する菌糸形成の情報伝達機構を解明した。成果として評価できる主な点は以下のとおりである。

1. *S. cerevisiae* において *GPR1* 並びに *GPA2* 遺伝子の欠損は, 偽菌糸形成及び浸潤成長への形態変化を著しく阻害した。またそれらの表現型は, 培地中に細胞膜透過性 cAMP 誘導体 db-cAMP を添加することにより回復した。更に両欠損株において, 偽菌糸形成に必要な, cAMP-PKA 経路の標的分子である *FLO11* の転写量が減少していた。これらの結果から *Gpr1* は *Gpa2* を介した cAMP-PKA 経路の活性化により形態変化を制御していることを示した。

2. *C. albicans* において, *GPR1*, *GPA2* のそれぞれのホモログである *CaGPR1*, *CaGPA2* 遺伝子をクローニングした。また, *CaGpr1* と *CaGpa2* が相互作用することを見出した。*CaGPR1* 欠損株ではグルコース依存的な細胞内 cAMP 濃度の上昇が減衰することを見出した。これらの結果から *C. albicans* においても *S. cerevisiae* と同様, *CaGpr1* が *CaGpa2* を介して細胞内 cAMP 濃度を制御していることを明らかにした。

3. *CaGPR1* 欠損株並びに *CaGPA2* 欠損株では, *C. albicans* の固体培地上における形態変化が著しく阻害されることを見出した。これらの表現型は培地に db-cAMP を添加することで抑圧された。また *CaGPR1* 欠損株に活性化型 *CaGPA2* を大量発現させることによっても回復を見ることが出来た。*CaGPR1* 欠損株では菌糸形成時に特異的に発現される遺伝子の転写量が減少することを見出した。これらの結果から, *CaGpr1* が *CaGpa2* を介して cAMP-PKA 経路にシグナルを伝達することにより形態変化を制御していることを明らかにした。

以上のように, 本論文は, 酵母の受容体に関して, それに端を発する情報伝達と発現制御機構を解析し, 酵母細胞の形態形成のスイッチとしての役割を明らかにしたものであり, 分子微生物学及び細胞情報応答学に寄与するところが大きい。

よって, 本論文は, 博士(農学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお, 平成15年2月13日, 論文並びにそれに関連した分野にわたり試問した結果, 博士(農学)の学位を授与される学力が十分あるものと認めた。