

審査の結果の要旨

氏名 田 思琪

ステロールは真核生物の生体膜を構成する主要な脂質の一つである。ステロールは真核生物の細胞膜や様々なオルガネラ膜に含まれるが、その含量は膜ごとに維持されており、そのことが膜の構造と機能に重要であると考えられている。ステロールは小胞体で合成され、細胞膜やオルガネラ膜に輸送される。細胞内ステロール輸送には、脂質を膜から膜に輸送する脂質輸送タンパク質や、2つの膜が近接した膜コンタクトサイトが関与する可能性が提唱されてきたが、その具体的な機構については酵母から高等動物に至るまで未解明な点が多い。ステロールの細胞内輸送の研究が遅れている原因の一つに、ステロールの輸送を簡単に評価する系がないことがある。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、主要ステロールであるエルゴステロールはミトコンドリアおよび液胞にも含まれており、それらの形態や融合に重要であることが示されているが、小胞体からそれらオルガネラへのステロールの輸送機構には不明な点が多い。本論文は、*S. cerevisiae* において小胞体からミトコンドリアおよび液胞へのステロール輸送を解析する系を構築し、その機構について解析を行ったものである。

第1章では、酵母ステロールアシル化酵素欠損株 *are1Δare2Δ* 株において、細菌由来のステロールアシル化酵素 SatA にミトコンドリア移行シグナルおよび膜貫通領域を連結した融合タンパク質を発現させ、本融合タンパク質によるエステル化を指標に、小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を *in vivo* で解析する系を構築した。さらに酵母から単離した小胞体画分とミトコンドリア画分を用いて、小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送を *in vitro* で解析する系の構築にも成功した。

第2章では、第1章で構築した系を用いて酵母オキシステロール結合タンパク質 (OSBP) ホモログの小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送における機能を解析した。*S. cerevisiae* において OSBP ホモログ遺伝子 *OSH1~OSH7* を全て欠損させた株の膜画分および細胞質画分あるいは精製した Osh4 を用いた *in vitro* でのステロール輸送の解析から、Osh4 が小胞体からミトコンドリアへのステロール輸送に関わることが示唆された。さらに精製した他の Osh タンパク質や *OSH* 遺伝子を単独で発現する株の細胞質を用いた解析から、Osh タンパク質は全てステロールを輸送する能力を持つことが示唆された。

第3章では、ステロール輸送における膜コンタクトサイトの機能について解析した。小胞体とミトコンドリア間のコンタクトサイト形成に関わる Endoplasmic reticulum

(ER)-mitochondria encounter structure (ERMES)複合体および ER membrane protein complex (EMC)複合体、液胞とミトコンドリアの間のコンタクトサイトである vacuole and mitochondria patch (vCLAMP)と呼ばれる構造の欠損株を用い、第1章で構築した系を利用して小胞体-ミトコンドリア間のステロール輸送を解析することにより、これらのコンタクトサイトがステロール輸送に関わる可能性が示唆された。

第4章では、第1章と同様に *are1Δare2Δ*株において、SatA に液胞膜タンパク質である Nyv1 を連結した融合タンパク質を発現させ、液胞膜にステロールアシル化酵素を局在させた。この株では実際にステリルエステルが合成されたことから、本融合タンパク質によるステロールのエステル化を指標に、液胞へのエルゴステロール輸送が評価できると期待された。

以上本論文では、酵母におけるオルガネラ間のステロール輸送を *in vivo* および *in vitro* で解析する系を構築して解析を行うことにより、ステロール輸送に関わる脂質輸送タンパク質を明らかにすると共に、ステロール輸送に膜コンタクトサイトが関与することを示唆した。ステロールの細胞内輸送はヒトを含む高等真核生物においても未解明な課題であり、これらの研究成果は、学術上応用上寄与するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。