

( 続紙 1 )

京都大学	博士 ( 農 学 )	氏名	Tuan Anh Pham
論文題目	Transformation mechanism of budding yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (出芽酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の形質転換機構)		
(論文内容の要旨)			
<p>出芽酵母<i>Saccharomyces cerevisiae</i>は、真核生物のモデル細胞と位置づけられる真核微生物(真菌)である。そのため、出芽酵母における形質転換機構の解明は、真菌を始めとする各種真核細胞におけるDNAの取り込み過程を理解する上で重要である。出芽酵母はポリエチレングリコール(PEG)存在下で保温することにより外来DNAを細胞内に取り込み、形質転換される。その際、酢酸リチウムと一本鎖キャリアーDNA(ssDNA)を共存させることにより、形質転換能は顕著に向上する。このように形質転換法が確立されている一方、形質転換に関わる分子機構には不明な点が多く、形質転換に必要な各化合物の作用機序も明らかにされていない。</p> <p>本論文は、出芽酵母を対象に、(i) 非必須遺伝子欠損株ライブラリーを用いた形質転換能に影響を及ぼす遺伝子の特定、(ii) PEGの存在有無による遺伝子発現レベルと代謝変動の決定、(iii) 標識DNAの細胞内取り込みプロセスの可視化、並びに(iv) 酢酸リチウムとssDNAの作用による細胞壁の構造変化の発見など、ハイスループットアッセイ、各種オミクス、および細胞生物学の観点から出芽酵母の形質転換機構を解析し、本菌の新規な形質転換モデルを提唱したものである。本論文は以下のように要約される。</p> <p>第一章では、出芽酵母の非必須遺伝子欠損株ライブラリー(約5,000株)を用いて、各欠損株の形質転換能を評価し、本菌の形質転換モデルを構築した。野生株と比較して、高い形質転換能を示す3株(<i>pde2Δ</i>、<i>spf1Δ</i>、<i>pmr1Δ</i>)と低い形質転換能を示す3株(<i>she4Δ</i>、<i>arc18Δ</i>、<i>sin3Δ</i>)が選抜された。形質転換能を低下させる遺伝的背景から、形質転換に関わる分子機構を考察した。She4pはMyo3pとMyo5pのシャペロンであり、Myo3pとMyo5pは互いに補完できるアクチンに沿って動く分子モーターとして機能する。<i>she4Δ</i>に加えて<i>myo3Δ myo5Δ</i>二重欠損株の形質転換能も顕著に低下することから、これらのアクチン関連分子モーターが形質転換に関わると考えられる。Arc18pはアクチン重合化に関与するApr2/3複合体の構成成分であり、本複合体を構成する他の成分を欠損させた株も著しく低い形質転換能を示した。Apr2/3複合体によるアクチンの重合化は、Myo3pとMyo5pを始めとする種々のタンパク質(Vrp1p、Las17p、Pan1p)と会合体を形成することにより制御され、その会合体(Apr2/3複合体活性化装置)はエンドサイトーシスの発現に重要である。Vrp1p、Las17p、Pan1pの各遺伝子欠損株も低い形質転換能を示した。以上の知見から、出芽酵母はアクチン重合に関わるApr2/3複合体活性化装置に依存的なエンドサイトーシス様機構により、DNAを細胞内に取り込むことが強く示唆された。</p> <p>第二章では、形質転換法におけるPEGの機能を明らかにするため、PEGの存在有無による遺伝子発現レベルをDNAマイクロアレイで、細胞内代謝産物の変動をメタボローム解析で決定した。対数生育期にある細胞を集菌し、形質転換用緩衝液に懸濁した後PEG存在或いは非存在下で保温した。その結果、PEG存在下の細胞は、集菌前の細胞とほぼ同等な遺伝子発現レベルと代謝産物の動態を示した。一方、非存在下での細胞で</p>			

は、炭素源代謝やストレス応答に関与する遺伝子の発現が向上していた。このことから、PEGは酵母に対して、細胞応答を引き起こすのではなく、細胞に物理的影響をもたらすことに寄与していると考えられた。

第三章では、第一章で得られた高い形質転換能を示す遺伝子欠損株に着目し、標識DNAを用いた蛍光顕微鏡解析および電子顕微鏡解析によって細胞内へのDNA取り込みプロセスを可視化した。高い形質転換能を示す小胞体局在性P-type ATPase型トランスポーター欠損株 (*spf1Δ*) では、PEG存在下での細胞壁は著量のDNAと結合する。また、細胞壁のDNA結合量と形質転換能とは正の相関が見られる。残りの2株 (*pde2Δ* と *pmr1Δ*) についても、同様の結果が得られた。一方、PEG非存在下での細胞壁にはDNAが結合しなかったことから、PEGは細胞壁にDNAを結合させることに機能することが分かった。したがって、PEGによる細胞壁のDNA結合が形質転換に重要であることが明らかになった。

第四章では、形質転換過程における酢酸リチウムとssDNAの機能を明らかにするため、両者の存在下で標識DNAアナログ（負荷電性ナノゴールド粒子）を用いて、細胞内へのDNAアナログ取り込みプロセスを電子顕微鏡で解析した。酢酸リチウムとssDNAを共存させると、各々単独で用いるときよりも飛躍的に形質転換能が向上した。そこで、両者或いは単独存在下、または両者とも非存在下での細胞を用いて、形質転換過程を電子顕微鏡で追究したところ、両者存在下で最も顕著に細胞壁構造が変化することが分かった。その細胞は、弛緩した多孔性の細胞壁構造を示す。このことから、酢酸リチウムとssDNAは、細胞壁に作用し、細胞壁がDNA取り込みに適した多孔性構造を示す細胞に変化させることに機能することが明らかになった。

上記の結果に基づいて、出芽酵母における形質転換に関わる分子機構、並びに形質転換に必要な各化合物の作用機作を明らかにした。

注) 論文内容の要旨と論文審査の結果の要旨は1頁を38字×36行で作成し、合わせて、3,000字を標準とすること。

論文内容の要旨を英語で記入する場合は、400～1,100 wordsで作成し  
審査結果の要旨は日本語500～2,000字程度で作成すること。

(論文審査の結果の要旨)

出芽酵母は、真核生物のモデル細胞として重要な真核微生物である。そのため、出芽酵母の形質転換技術は真核生物細胞の機能構造解析に必須であり、種々の操作法が確立されている。しかし、その形質転換過程における酵母細胞の動態や形質転換に必要な各化合物の役割も不明である。本論文は、出芽酵母を対象に、形質転換能に関わる遺伝子の網羅的解析、形質転換に必要な化合物存在下での遺伝子発現と代謝変動の網羅的解析、並びに形質転換過程におけるDNAの細胞内取り込みプロセスの可視化を行い、出芽酵母における形質転換に関わる分子機構および形質転換に必要な各化合物 (PEG、酢酸リチウム、ssDNA) の作用機作を明らかにした一連の研究をまとめたものである。評価すべき主要な点は以下のように要約される。

1. 出芽酵母は、エンドサイトーシス様の細胞膜陥入機構により、DNAを細胞内に取り込むことが強く示唆された。
2. 出芽酵母の形質転換過程において、PEGは出芽酵母に細胞応答を惹起させることなく、細胞壁にDNAを結合させることに機能し、このPEGによる細胞壁のDNA結合が形質転換能の向上に重要であることが明らかになった。
3. 酢酸リチウムとssDNAは、出芽酵母の細胞壁に作用し、細胞壁がDNA取り込みに適した多孔性構造を示す細胞に変化させることに機能することが示された。

以上のように本論文は、出芽酵母の形質転換能に影響を及ぼす遺伝子を特定することにより、エンドサイトーシスを介したDNAの細胞内取り込みモデルを提唱し、形質転換過程における各化合物の酵母細胞、特に細胞壁に対する作用機作を明らかにしたものであり、微生物学、細胞工学、核酸科学、および生物機能変換学の発展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26年2月6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。

また、本論文は、京都大学学位規程第14条第2項に該当するものと判断し、公表に際しては、当該論文の全文に代えてその内容を要約したものとすることを認める。

注) 論文内容の要旨、審査の結果の要旨及び学位論文は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。

ただし、特許申請、雑誌掲載等の関係により、要旨を学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 年 月 日以降 (学位授与日から3ヶ月以内)