

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	井上 紘一
論文題目	Molecular mechanism of concentration-regulated methanol induction and its signaling pathway in methylotrophic yeasts (メチロトロフ酵母における濃度応答性メタノール誘導とシグナル伝達の分子機構)		
(論文内容の要旨)			
<p><i>Komagataella phaffii</i> (synonym. <i>Pichia pastoris</i>)や<i>Candida boidinii</i>などのメチロトロフ酵母は、メタノールを単一の炭素源・エネルギー源として生育でき、メタノールによって強力かつ特異的に発現誘導される遺伝子プロモーターを有していることから、異種有用タンパク質生産の宿主として広く利用されている。メタノール培養時にはメタノール代謝に必要なペルオキシソームが顕著に発達する一方で、メタノール代謝が不要な培養条件に移行すると、ペルオキシソームがオートファジーにより選択的に分解(ペキソファジー)されるため、ペルオキシソーム合成・分解過程を解析するためのモデル生物として利用されている。メチロトロフ酵母のメタノール代謝は、アルコールオキシダーゼ(AOX)によるメタノールのホルムアルデヒドへの酸化により始まり、その後、CO₂へと変換されてエネルギーを獲得するホルムアルデヒド酸化経路と、ジヒドロキシアセトンシンターゼ(DAS)によってホルムアルデヒドを固定し、細胞構成成分を合成する資化経路に分岐する。これらの遺伝子発現は、メタノール濃度により厳密に制御されており、AOXをコードする遺伝子<i>AOX1</i>の転写産物量は、メタノール濃度が0.1%程度までは濃度に応じて増加するものの、0.1%を超えると減少する。このような遺伝子発現制御は自然界における生存戦略としても重要である。実際、メチロトロフ酵母は生きている植物の葉面でも増殖し、約0.01-0.2%の範囲で日周変動する葉上メタノール濃度に応答して細胞内代謝を調節していることがわかっている。しかし、このようなメタノール濃度に依存した遺伝子発現誘導の分子機構については不明であった。そこで本研究では、メタノール濃度に応答した誘導性遺伝子発現を「濃度応答性メタノール誘導 (concentration-regulated methanol induction; CRM I)」と定義し、その遺伝子発現制御の分子機構とシグナル伝達経路について明らかにすることを目的とした。</p> <p>第一章では、<i>K. phaffii</i>の転写因子KpMxr1がメタノール誘導性遺伝子のCRM Iに重要であることを明らかにした。グルコース培地で生育させた<i>K. phaffii</i>をメタノール培地に移行すると、KpMxr1のセリン残基は培地中のメタノール濃度には関係なく脱リン酸化される一方で、トレオニン残基はメタノール濃度依存的にリン酸化されることがわかった。また、KpMxr1は他のメチロトロフ酵母ホモログにも保存される複数のドメインを持つことを見出した。これを基にKpMxr1のC末端ドメイン欠失体発現株を多数作成し、メタノール濃度に応答した<i>AOX1</i>遺伝子のmRNA量を測定した結果、KpMxr1におけるCRM Iに重要な機能領域を同定した。KpMxr1のリン酸化修飾をLC-MS/MSによって詳細に解析したところ、多数の新規リン酸化修飾されたセリン・トレオニン残基を同定した。この結果を基に、主要なリン酸化残基のアラニン置換体発現株を作成して解析したところ、これらの株では適切なCRM Iが損なわれており、CRM Iには</p>			

KpMxr1のセリン残基・トレオニン残基の厳密なリン酸化制御が重要であることがわかった。メチロトロフ酵母は細胞表層に存在するセンサータンパク質KpWsc1/3により外界のメタノール濃度を検知する。その下流にあるCRMIのシグナル伝達経路を調べたところ、KpWscからのメタノール濃度シグナルは、キナーゼKpPkc1を経てKpMxr1へと伝達され、KpMxr1のリン酸化状態をメタノール濃度に応答して変化させることにより、メタノール誘導性遺伝子AOX1のCRMIを制御していることがわかった。

第二章では、*C. boidinii*においてメタノールによってその発現が誘導される転写因子CbMPP1の恒常発現株および過剰発現株を用いてCbMpp1の役割を調べた。その結果、CbMPP1の恒常発現株または過剰発現株では細胞内のメタノール代謝バランスがくずれ、毒性の高い代謝中間体であるホルムアルデヒドが蓄積し生育遅延が起こっていた。これらの株ではCRMIも適切に制御されていなかった。CRMIによって発現制御される転写因子CbMpp1が、複数のメタノール誘導性遺伝子プロモーターに作用して発現調節を行うことで、メタノール濃度に応じた代謝バランスと最適な細胞生育を保つことがわかった。

第三章では、*K. phaffii*のメタノール培養時におけるペキソファジーの抑制機構およびシグナル伝達経路について調べた。ペルオキシソームレセプターであるKpAtg30のリン酸化を指標としたウエスタンブロット解析より、KpWsc1により感知されたメタノール濃度情報は、KpRom2、KpRho1、KpPkc1、さらにその下流のMAPキナーゼカスケード、転写因子KpRlm1へと順次、伝達され、その後、プロテインホスファターゼKpMsg5およびKpPtp2aの遺伝子発現を介してペキソファジーを抑制制御していることを明らかにした。

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。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

本論文は、異種有用タンパク質生産の宿主として利用されているメチロトロフ酵母における濃度応答性メタノール誘導(CRMI)の分子機構を明らかにしたものである。誘導物質であるメタノールの濃度に適切に応答するためのシグナル伝達ならびに遺伝子発現制御機構の分子モデルを初めて提唱したものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. メチロトロフ酵母 *K. phaffii* において、KpMxr1 のリン酸化状態がメタノール濃度に応じて調節されることを見出し、このリン酸化制御が CRMI に重要であることを明らかにした。また、メタノール濃度情報が KpWsc タンパク質から KpPkc1 を介して KpMxr1 に伝達される CRMI 経路を明らかにした。
2. メチロトロフ酵母 *C. boidinii* において、メタノール培養時に CRMI によって発現誘導される転写因子 CbMpp1 が、複数のメタノール誘導性遺伝子プロモーターに作用して遺伝子発現誘導を制御することで、メタノール濃度に応じた代謝バランスを保っていることを示した。
3. *K. phaffii* において、KpRlm1 依存的に発現するプロテインホスファターゼ KpMsg5 および KpPtp2a が KpAtg30 のリン酸化を制御することで、メタノール存在時にはペキシファジーを抑制していることを明らかにした。

以上のように本論文は、メチロトロフ酵母 *K. phaffii* と *C. boidinii* における濃度応答性メタノール誘導(CRMI)、遺伝子発現制御に関連する転写活性化因子およびメタノール濃度の低下により誘導されるペキシファジーの制御機構について、分子レベルで明らかにし、異種タンパク質生産に資する知見が得られたことから制御発酵学、分子細胞生物学、応用微生物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、令和5年2月9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：令和 年 月 日 以降 (学位授与日から3ヶ月以内)