

(続紙 1)

| | | | |
|--|--|----|---------|
| 京都大学 | 博士 (農 学) | 氏名 | 西 田 奈 央 |
| 論文題目 | Studies on the mechanism of organic solvent tolerance of yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> triggered by a transcription factor Pdr1p (転写因子Pdr1pによる酵母 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> の有機溶媒耐性の獲得機構の解析) | | |
| (論文内容の要旨) | | | |
| <p>微生物の細胞全体を用いた物質生産は、温和な条件下で高い特異性で進行し、多段階反応が可能という利点があるが、有機溶媒を含む反応系内への応用には、有機溶媒の細胞毒性が障壁となっている。この問題を解決するため、有機溶媒に耐性を持つ微生物が期待されている。細菌と比較して真核微生物は酸化還元力が強いなど物質生産における利点があるが、有機溶媒耐性を持つものはほとんど報告例がなかった。</p> <p>当研究室では、有機溶媒耐性酵母<i>Saccharomyces cerevisiae</i> KK-211株を世界で初めて単離して解析している。KK-211株は転写因子Pdr1pの821番目のアミノ酸残基がArgからSerに変異した1アミノ酸変異を持ち、この1アミノ酸変異が有機溶媒耐性の原因であることを明らかにしてきている。そこで、本研究では、酵母のこの有機溶媒耐性の獲得機構の解明を目的とした。</p> | | | |
| 1. 有機溶媒耐性に関与する実行因子の決定 | | | |
| <p>有機溶媒耐性酵母 KK-211 株で転写量が上昇した遺伝子群の中で、実際に有機溶媒耐性に関与している遺伝子の同定を行った。これまでの当研究室での研究で、真核生物の有機溶媒耐性に関与する転写因子として特定されたのは Pdr1p のみであった。トランスクリプトーム解析の結果、有機溶媒耐性酵母 KK-211 株では、有機溶媒に関与する実行因子として、4 つの ABC トランスポーターをコードする遺伝子 (PDR10、SNQ2、YOR1、PDR15) 及び 6 つの細胞壁タンパク質をコードする遺伝子 (TIP1、WSC3、CIS3、PRY3、PIR1、YNL190W) の転写量が上昇していた。そこで、転写量が上昇した遺伝子群の中から実際に有機溶媒耐性に関与する遺伝子の特定を行った。</p> <p>調べる対象の遺伝子をそれぞれ実験室酵母で過剰発現し、有機溶媒を添加した液体培地及び固体培地における生育で有機溶媒耐性を評価した。疎水性有機溶媒として <i>n</i>-デカン、<i>n</i>-ノナン、イソオクタンを、親水性有機溶媒としてジメチルスルホキシド (DMSO) を使用した。その結果、ABC トランスポーター群のうち Pdr10p、Snq2p、Yor1p が有機溶媒耐性に関与しており、特に、Pdr10p は疎水性有機溶媒耐性に、Yor1p は親水性有機溶媒耐性に特異的に関与していることが明らかになった。さらに細胞壁タンパク質群のうち、Wsc3p、Pry3p、Ynl190wp は疎水性・親水性有機溶媒耐性の両方に関与していることが明らかになった。Wsc3p は細胞壁の維持に関わるストレスセンサーであり、細胞壁の強化に関わっている可能性があった。Ynl190wp は Gly 含量が 6% より高く、hydrophilicity index 1.0 以上のヒドロフィリンであるため、細胞壁の親水化に関与していることが考えられた。</p> | | | |
| 2. 有機溶媒ストレスへの応答経路 | | | |
| <p>次に、野生株の酵母において有機溶媒に応答して転写量を制御する有機溶媒ストレス応答経路の決定を行い、多剤耐性にも関与するPleiotropic drug resistance (PDR) 経</p> | | | |

路、及び、細胞壁の強度維持に関わる cell wall integrity pathway (CWI) 経路の関与を明らかにした。

有機溶媒耐性への関与を明らかにした ABC トランスポーター Pdr10p、Snq2p、Yor1p、及び転写因子 Pdr1p は、多剤耐性に関わる PDR 経路の構成因子であるため、PDR 経路の有機溶媒ストレス応答への関与を調べた。PDR 経路の代表的な転写因子 Pdr1p、及びその相同タンパク質 Pdr3p の変異体は有機溶媒耐性を示した。また、PDR 経路で中心的な役割を果たす薬剤排出ポンプ Pdr5p の過剰発現株は有機溶媒耐性を示したが、一方で薬剤排出活性を失った変異型 Pdr5p の過剰発現株では耐性の向上が見られなかった。従って、Pdr5p は、薬剤の場合と同様に有機溶媒を細胞外に能動的に排出すると推測した。さらに、野生株の酵母において有機溶媒に応答して PDR5 の転写量が上昇することから、野生株の有機溶媒ストレスへの対処にも Pdr5p が関わっていることを示した。以上の結果より、有機溶媒ストレス応答には PDR 経路が関与することを明らかにした。

次に、有機溶媒に応答して細胞壁タンパク質をコードする WSC3、YNL190W を誘導発現する経路を探索した。WSC3 と YNL190W の転写量は有機溶媒に応答して上昇したが、WSC3 と YNL190W の転写誘導は PDR 経路の制御下にはないことを明らかにした。そこで、Wsc3p が細胞壁の強度維持に関わる cell wall integrity (CWI) 経路の細胞壁センサーであることから、CWI 経路が関与する可能性を調べた。CWI 経路を構成する因子の欠損株における有機溶媒による転写量の変動を調べ、CWI 経路でも特に細胞壁センサー Wsc3p、Mid2p や転写因子 Swi4p、Swi6p の関与を明らかにした。

3. 有機溶媒ストレス応答における Pdr1p と Pdr3p の機能の解析

転写因子 Pdr1p と Pdr3p は遺伝子重複から生じた相同遺伝子であり、多剤耐性において重複した機能を持っている。しかし今回、有機溶媒ストレスへの応答に対しては Pdr1p と Pdr3p の作用に違いがあることを見出した。

Pdr1p と Pdr3p の欠損株 (*pdr1Δ*、*pdr3Δ*) では、有機溶媒に応答した時の PDR5 の転写量の変動が異なっていた。*pdr1Δ* では野生株の場合と比較して PDR5 の転写量が大きく上昇し、逆に *pdr3Δ* では上昇しなかった。この結果より有機溶媒ストレスへの応答に直接関係しているのは Pdr3p であり、Pdr1p は関与していないと考えられた。Pdr1p の非存在下で転写量が大きく上昇するのは、Pdr1p と Pdr3p が同一の認識配列 Pleiotropic Drug Response Element (PDRE) に対して競合しているためであると推測された。また、最初に単離された有機溶媒耐性株 KK-211 では Pdr1p に変異が入っており、Pdr1p と Pdr3p は転写制御する遺伝子も重複しているため、結果的に有機溶媒耐性の獲得につながったものと考えられた。さらに、Pdr1p は関与しないが、Pdr3p が関与する経路の一つであるミトコンドリアのゲノム欠失による PDR5 の転写活性化の経路が、有機溶媒ストレスによる転写誘導にも関与する可能性を示唆した。

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)

これまでほとんど分かっていなかった酵母の有機溶媒耐性に関与する実行因子としてABCトランスポーター及び細胞壁タンパク質を決定し、有機溶媒によるストレスを受けた際にこれらの耐性に関与する実行因子を誘導するシグナル伝達経路としてPDR経路とCWI経路を決定した。また、多剤耐性機構では同一の機能を持つ転写因子Pdr1pとPdr3pについて、有機溶媒ストレス応答の解析を行った。成果として評価すべき点は以下の通りである。

1. 有機溶媒耐性を付与する実行因子を決定した。有機溶媒耐性に関与する実行因子は、有機溶媒耐性酵母で過剰発現している遺伝子にコードされる因子のうち、Pdr10p、Snq2p、Yor1pというABCトランスポーターと、Wsc3p、Ynl190wpという細胞壁タンパク質であることを初めて特定した。
2. 酵母が有機溶媒にさらされた際、有機溶媒ストレス応答として薬剤の多剤耐性と共通のPDR経路と、細胞壁の強度維持に関わるCWI経路が同時に活性化されることを初めて示した。この結果は、有機溶媒耐性では複合的なストレスがかかることを示唆している。またPDR経路は薬剤のみならず有機溶媒ストレスにも対応できることを示し、PDR経路の重要性に新たな知見を加えた。
3. PDR経路の転写因子Pdr1pとPdr3pは、多剤耐性機構においては重複する機能を持つが、有機溶媒ストレス応答においては機能が異なることを初めて明らかにした。さらに有機溶媒ストレスはミトコンドリアを介してPdr3pに伝えられる可能性を明らかにした。

以上のように、本論文は、酵母の有機溶媒耐性の分子機構を初めて解明し、野生株の酵母における有機溶媒ストレス応答経路を明らかにした。また、有機溶媒耐性と薬剤の多剤耐性の両方で機能する相同な転写因子について作用機構の違いを見出し、新たな転写制御機構の存在を示唆した。これらの結果は、生体高分子化学、エネルギー変換細胞学、分子微生物科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）