

(続紙 1)

京都大学	博士 (農 学)	氏名	白 石 晃 将
論文題目	Regulatory mechanism of nitrogen metabolism and stress response in the methylotrophic yeast <i>Candida boidinii</i> (メタノール資化性酵母 <i>Candida boidinii</i> における窒素代謝とストレス応答の制御機構)		
(論文内容の要旨)			
<p>メタンやメタノールなどの還元型C1化合物を炭素源・エネルギー源として利用できるC1微生物は自然界に広く分布している。C1化合物は、土壌、水圏の他、地球上のあらゆる環境に存在するが、近年、メタンやメタノールが植物地上部の表層、特に葉面などの地上部から直接大気中に放出されることが知られるようになり、植物葉圏がC1微生物の棲息環境として重要視されるようになってきた。これまでにC1微生物の葉上での増殖にはメタノール代謝が重要な役割を果たすことが明らかになっている。しかしC1微生物の植物葉上での生存戦略・分子機構に関しては不明な点が多く、炭素源以外の栄養やストレス・環境変化への適応機構の解明は重要な課題である。</p> <p>本論文では、メタノール資化性酵母<i>Candida boidinii</i>を用い、宿主植物の生育ステージにともない、本酵母の窒素源が硝酸からメチルアミンなど他の窒素源へと変化すること、宿主植物の老化にともない不要となった硝酸レダクターゼが選択的オートファジー経路により分解されることを見出した。またストレス応答因子の一つとして知られるHog1が、高温ストレス条件下で細胞内にドット状の構造を形成し、この局在変化が高温ストレス耐性に重要な役割を果たしていることを明らかにした。主な内容は以下の通りである。</p>			
<ol style="list-style-type: none">1. <i>C. boidinii</i>のメチルアミン代謝に関わるアミノオキシダーゼ (Amo1) および硝酸代謝に関わる硝酸レダクターゼ (Ynr1) をコードする遺伝子<i>AMO1</i>、<i>YNR1</i>を同定し、これらの遺伝子の発現制御を調べた。RT-PCR の結果から、<i>AMO1</i>はメチルアミンにより、<i>YNR1</i>は硝酸または亜硝酸によりその発現が誘導されることがわかった。窒素源が複数存在する環境下においては、<i>YNR1</i>は硝酸以外の窒素源が存在する条件下でもその発現が抑制されなかったのに対し、<i>AMO1</i>はメチルアミン以外の窒素源、特にアンモニウムとグルタミンの存在により、その発現がmRNAレベルで強く抑制されることがわかった。2. <i>AMO1</i>と<i>YNR1</i>が植物葉上での増殖に必要なかどうかを調べるため、<i>amo1Δ</i>株と<i>ynr1Δ</i>株を作製した。これら遺伝子破壊株と野生株のシロイヌナズナ葉上における増殖を定量PCR、蛍光顕微鏡観察により追跡したところ、<i>ynr1Δ</i>株でのみ増殖がみられなかった。また蛍光タンパク質Venusをレポーターとした菌株の葉上での顕微鏡観察、RT-PCR法により、若いシロイヌナズナ葉上においては<i>YNR1</i>のみの発現が見られたことから、<i>YNR1</i>が若い葉上での増殖に重要な役割を果たしていることが明らかになった。一方、老化した葉上においては、<i>AMO1</i>の発現が認められ、メチルアミン代謝が誘導されていることがわかった。以上の結果より、本酵母は、若葉上においては硝酸を主要な窒素源として利用し、老化した葉上においてはメチルアミンなどの他の窒素源を利用するようになることが明らかとなった。続いて、このような宿主植物の生育ステージにとまなう窒素源の変化に着目し、硝酸代謝に必要なYnr1の細胞内動態を調べたところ、硝酸からメチルアミンへの窒素源変化にともない、Ynr1が選択的オートファジー経路の一つ、Cvt (Cytoplasm-to-vacuole targeting) 経路により液胞へ運ばれ分解されていることが明らかとなった。このYnr1のCvt経路を介した分解は、硝酸培地からメチルアミン/硝酸培地に移した際にも起きていることがわかった。			

3. 植物表層に棲息する微生物は、様々なストレスや環境変化に適応するため、自らの生存戦略機構を最大限に駆使していると考えられる。代表的なストレス応答因子であるHog1について、蛍光タンパク質との融合タンパク質を発現させることでその細胞内動態を解析した。*C. boidinii* と属が異なる3種の酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*、*Pichia pastoris*、*Schizosaccharomyces pombe*) を用いて、高温ストレス、浸透圧ストレス時におけるHog1-Venus/GFP/YFPの細胞内動態を調べたところ、高温ストレス条件下では*S. cerevisiae*を除く3属の酵母において、Hog1-Venus/GFP/YFPが細胞質にドット状の局在を示した。*C. boidinii*を用いて、さらに解析を進めたところ、ドット形成にはCbHog1のN末端領域が必要十分であること、このドットがストレスにより形成が誘導されるストレス顆粒とこのドットが部分的に共局在することがわかった。続いて、Hog1-Venusのドット形成の生理的意義を調べるため、高温ストレス条件下、ドット局在を示すCbHog1-Venusまたは局在を示さないScHog1-Venusを*C. boidinii*内で発現させ細胞生育度を調べたところScHog1-Venus発現株において*C. boidinii*の生育度の低下が見られた。一方で、ScHog1の機能発現に必要なアミノ酸置換変異体（キナーゼ不活性変異体、リン酸化部位変異体、細胞膜アンカー型変異体）の発現株は全て、細胞生育度がCbHog1-Venus発現株と同レベルにまで回復した。これらの結果より、高温ストレス条件下においては、細胞内でリン酸化により活性化されたHog1がキナーゼとしての役割を果たさないよう、ストレス顆粒などの細胞内コンパートメントに一時的に隔離しておくことが、酵母の高温ストレス時の生存戦略として重要であることが示された。

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、植物葉上で増殖する*C. boidinii*において、宿主植物の生育ステージともなう利用窒素源の変化とオートファジー制御を初めて明らかにしたものである。また、代表的なストレス応答因子である酵母Hog1の新たな細胞内局在変化とその生理的意義を示した。評価すべき点は以下の通りである。

1. 窒素代謝に関わるアミノキシダーゼ (Amo1) と硝酸レダクターゼ (Ynr1) を同定した。
2. メチルアミンにより発現誘導されるAmo1は、他の窒素源の存在により、mRNAレベルで抑制されるのに対し、硝酸または亜硝酸で発現誘導されるYnr1は他の窒素源により抑制を受けないことを示した。
3. 宿主植物のライフステージにともない、葉上微生物の窒素源が硝酸からメチルアミンなど他の窒素源に変化すること、その際不要となったYnr1が、恒常的な生合成経路として知られていたCvt経路を介して液胞へと運ばれ分解されていることを示した。
4. 高温ストレス時におけるHog1のドット形成は広く酵母に保存された現象であることを見出した。またこのドット形成はストレス顆粒などの細胞内コンパートメントへのHog1の隔離を示し酵母の熱耐性に重要であることを明らかにした。

以上のように、本論文は、メタノール資化性酵母*C. boidinii*を用いて、C1微生物の植物葉上での窒素代謝制御を分子レベルで明らかにし、酵母Hog1の新たな細胞内局在変化とその生理的意義を示した初めてのものである。これらの成果は、葉上微生物の利用栄養源やストレス・環境変化への適応機構の解明に重要な知見を提供するもので、制御発酵学、分子細胞生物学、応用微生物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29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。

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。

おって、当該学生は、本学博士課程教育リーディングプログラム「思修館プログラム」を履修し、平成29年2月8日に同プログラムにおける学修内容と提出学位論文との関連性等に関する事項について試問を行い、同プログラムの修了要件基準を満たしていることを確認し、次いで、平成29年2月23日に本学博士課程教育リーディングプログラム運営委員会において、上記と同様の基準を満たしていることを確認し、それぞれ合格と認められていることを併せて報告する。

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）