

Regulatory mechanism of nitrogen metabolism and stress response in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*  
(メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* における窒素代謝とストレス応答の制御機構)

白石晃将

植物表層に棲息する微生物は、乾燥、UV 照射、貧栄養源などのストレスや温度、湿度などの様々な環境変化に対応するため、自らの生存戦略機構・分子機能を最大限に駆使していると考えられる。これまでの研究から、メタノール資化性酵母 *Candida boidinii* がシロイヌナズナ葉上で増殖すること、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。しかしながら、本酵母の窒素代謝制御、ストレス応答機構に関しては不明な点が多い。本論文では、宿主植物のライフステージに伴い *C. boidinii* の窒素源が硝酸からメチルアミンへと変化し、不要となった硝酸レダクターゼがオートファジーにより分解されることを明らかにした。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がわかった。

第1章では、窒素代謝に関わる酵素として、メチルアミン代謝に関わるアミノキシダーゼ (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 *AMO1*、*YNR1* を同定し、*in vitro* においてこれらの遺伝子の発現制御を調べた。RT-PCR の結果から、*AMO1* はメチルアミンにより、*YNR1* 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、*YNR1* 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、*AMO1* 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、その発現が強く抑制された。

第2章では、葉上における本酵母の窒素源を調べるため、葉上に接種した本酵母を、定量PCR、RT-PCR、蛍光顕微鏡観察等によって増殖と遺伝子発現を追跡した。その結果、若葉上では硝酸が、老化した葉上ではメチルアミンが本酵母の主要な窒素源であることがわかった。続いて、このような宿主植物のライフステージに伴う窒素源の変化に着目し、硝酸代謝に必要な硝酸レダクターゼ (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伴い、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を示した。また、この Ynr1 の Cvt 経路を介した分解は、硝酸からメチルアミン+硝酸への窒素源変化においても起きていることがわかった。以上の結果は、葉上微生物の窒素源を初めて明らかにしたのみならず、恒常的な生合成経路として知られていた Cvt 経路の分解経路としての役割を示した点に意義がある。

第3章では、代表的なストレス応答因子である Hog1 の細胞内動態を解析した。4属の異なる酵母を用いて、高温ストレス、浸透圧ストレスにおける Hog1 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 が細胞質にドット状の局在を示した。メタノール資化性酵母 *C. boidinii* を用いて、解析を進めたところ、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共局在すること、ストレス顆粒との共局在には CbHog1 の N 末端領域が必要十分であることがわかった。さらに、高温ストレス条件下において、ストレス顆粒との共局在を示す CbHog1、示さない ScHog1 を発現する株の細胞生育度を確認したところ、ScHog1 発現株において生育度の低下が見られた。これらの結果より、高温ストレス時、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に一時隔離しておくことが、酵母の生存戦略として重要であることが示唆された。