

(続紙 1)

| | | | |
|--|--|----|------|
| 京都大学 | 博士 (農 学) | 氏名 | 大澤 晋 |
| 論文題目 | 細胞表層メタノール感知因子PpWsc1/PpWsc3が支配する細胞制御の分子機構 | | |
| (論文内容の要旨) | | | |
| <p>メタノール資化性酵母のC1代謝酵素群は、その一部が局在するペルオキシソームとともに、メタノールによって特異的かつ強力に遺伝子発現が誘導される。この性質を利用したメタノール資化性酵母を宿主とする遺伝子発現系は、実験室レベルにおけるタンパク質調製のみならず工業レベルでの有用タンパク質生産に広く用いられている。これまでに約10種類のメタノール誘導性遺伝子発現に関わる核内転写因子が明らかにされているが、本酵母が細胞外のメタノールをどのように感知し、そのシグナルを細胞内に伝達、転写因子を制御しているのかについては全く不明であった。</p> <p>本論文では、メタノール資化性酵母<i>Pichia pastoris</i>において、細胞表層に局在するWscファミリータンパク質 PpWsc1とPpWsc3がメタノール誘導性遺伝子発現制御に関わる因子であることを、核内転写因子以外のものとして初めて明らかにした。PpWsc1とPpWsc3は、他の未知の因子とともに細胞表層でメタノールセンシングマシナリーを構成しメタノールを感知すると考えられる。本論文ではこのセンシングマシナリーが、メタノールをエタノールとは区別してメタノール誘導性遺伝子発現のためのシグナルを細胞表層から下流に伝達していること、オートファジーによるペルオキシソーム分解機構であるペキソファジーの抑制にPpWsc1が重要であることを見出した。主な内容は、以下の通りである。</p> | | | |
| <ol style="list-style-type: none">1. <i>P. pastoris</i>のWscファミリータンパク質であるPpWsc1とPpWsc3を、メタノール誘導性遺伝子発現制御に重要な細胞表層に局在するメタノール感知因子として同定した。PpWsc1とPpWsc3の生理機能を調べるために、<i>PpWSC1</i>または<i>PpWSC3</i>のみを発現する株を作製し、様々なメタノール濃度でのメタノール誘導性遺伝子発現レベルを測定した。その結果、低濃度メタノール (0 - 0.05%)では主にPpWsc1が、高濃度メタノール(0.05 - 2%)ではPpWsc3がメタノール誘導性遺伝子の発現を制御していることを明らかにした。さらに、PpRom2が下流シグナル伝達因子としてメタノール誘導性遺伝子発現制御に関わっていることも見出した。2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>の場合と同様に、<i>P. pastoris</i> においてもPpWsc1は細胞表層ストレス応答に必要であった。しかし、PpWsc3は細胞表層ストレス応答には不要で、メタノール誘導性遺伝子発現制御に特異的に働くことを明らかにした。3. PpWsc1の部位特異的変異体の解析を行った結果、PpWsc1(Y53A)変異体においてメタノール誘導性遺伝子発現レベルが低下したが、細胞表層ストレス応答には影響を与えなかった。このことからPpWsc1はメタノールと細胞表層ストレスを区別 | | | |

して認識し、それぞれ独立したシグナルを下流に伝達していることを明らかにした。

4. メタノール誘導性遺伝子の発現はエタノールにより誘導されず、メタノールとエタノールの共存時には抑制される(エタノール抑制)。エタノール抑制不能変異株を複数単離し、変異原因遺伝子を同定した。さらに、各遺伝子破壊株を用いた解析により、エタノールからアセチルCoAに変換する代謝酵素群PpAdh2、PpAld4、PpAcs1が、エタノール抑制に必要であることを明らかにした。これらの結果から、エタノール自身でなく、その代謝で生じるアセチルCoAがエタノール抑制に重要な化合物であることを示した。
5. エタノール抑制が不全なPpADH2破壊株においても、メタノール誘導性遺伝子群の発現がエタノールによって誘導されなかったことから、本酵母のメタノールセンシングマシナリーは、メタノールをエタノールとは区別して認識し、メタノール誘導性遺伝子発現のためのシグナルを細胞表層から下流に伝達していることを示した。
6. *P. pastoris*において、ペルオキシソームはメタノール培地で培養時に増殖・発達し、エタノール培地へ細胞をシフトした時やメタノール枯渇時には、ペキシソファジーにより分解される。PpWSC1遺伝子破壊がペキシソファジーに与える影響を調べたところ、メタノール培養時にペキシソファジーの誘導に必要なPpAtg30のリン酸化が亢進されるとともに、ペキシソファジーが野生株に先行して誘導されていた。このことから、培地中のメタノールの存在によってペルオキシソームが増殖・発達している時には、PpWsc1がペキシソファジーを抑制していることを明らかにした。また、このペキシソファジーの抑制制御に PpMpk1、PpRlm1が関与していることを示した。

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)

本論文はメタノール資化性酵母 *P. pastoris*において、PpWsc1とPpWsc3をメタノール感知に関わる細胞表層因子として同定することに初めて成功し、メタノール誘導性遺伝子発現やペルオキシソーム動態など、Wscファミリータンパク質による多様な細胞機能制御とその分子機構について明らかにしたものである。評価すべき点は以下の通りである。

1. 細胞表層タンパク質PpWsc1とPpWsc3が、メタノール誘導性遺伝子の発現制御に関わることを明らかにし、低濃度メタノール(0 - 0.05%)では主にPpWsc1が、高濃度メタノール(0.05 - 2%)ではPpWsc3がメタノール濃度の感知に関与していることを示した。
2. メタノール誘導性遺伝子発現のエタノール抑制には、エタノール自身ではなくアセチルCoAへの代謝変換が必要であることを示した。
3. *P. pastoris*の細胞表層では、PpWsc1とPpWsc3を含むメタノールセンシングマシナリーが、エタノールとは区別してメタノールを特異的に感知し、細胞表層から下流へシグナルを伝達し、メタノール濃度に応答したメタノール誘導性遺伝子発現を制御していることを示した。
4. ペルオキシソームが誘導されるメタノール培養時には、PpWsc1がペキソファジー制御因子であるPpAtg30のリン酸化を制御してペキソ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、メタノール資化性酵母 *P. pastoris*におけるメタノール感知因子として、PpWsc1とPpWsc3を初めて同定し、メタノール誘導性遺伝子発現やペルオキシソームの分解における、Wscファミリータンパク質の多様な細胞制御の分子機構を明らかにしたものである。これらの成果は、細胞表層タンパク質による新たな細胞制御機構を分子レベルで明らかにしたのみならず、本酵母を用いたタンパク質生産系の開発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4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。

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）