

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

大澤 晋

2017

目次

緒言	1
第一章 細胞表層メタノール感知因子としての PpWsc1/PpWsc3 の同定	4
第二章 エタノールによるメタノール誘導性遺伝子発現の抑制制御機構	30
第三章 メタノール感知が制御するペキソファジーの抑制制御機構	43
結論	60
参考文献	62
謝辞	69
業績リスト	70

緒言

メタノール資化性酵母は、メタノールを単一の炭素源・エネルギー源として利用することができ、1969年に初めて単離された *Candida boidinii* をはじめ (Ogata *et al.*, 1969)、*Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*)、*Ogataea polymorpha* などの種が知られている。これまでに、メタノール代謝経路、遺伝子発現、細胞内小器官の動態など様々な視点から研究が行われ、そのユニークな細胞制御や分子機構が明らかになってきている。最近では、本酵母が植物葉上にも棲息し、葉上生育に必要な因子やその分子機構も明らかになってきている (Kawaguchi *et al.*, 2011; Shiraishi *et al.*, 2015)。メタノール資化性酵母は、メタノール培地ではメタノール代謝に必要な酵素群の遺伝子を転写レベルで強力かつ特異的に誘導発現する (メタノール誘導性遺伝子発現)。このメタノール誘導性プロモーターが強力であること、安価な培地で高密度培養が可能であること、真核生物であるため高等生物由来のタンパク質の折りたたみや分泌が可能であることから、本酵母は異種遺伝子発現系の宿主として広く利用されてきた (Gellissen, 2000; Mattanovich *et al.*, 2012; Sakai *et al.*, 1999)。また、メタノール培養時にはメタノール誘導性遺伝子発現により大量に合成されたメタノール代謝酵素群はメタノール代謝の場であるペルオキシソームに輸送されるため、本オルガネラは大きく発達する。そのため、ペルオキシソームの合成や分解など、ペルオキシソーム動態研究のモデル生物としても用いられてきた (Sakai *et al.*, 1998b)。これまでの研究から、メタノール誘導性遺伝子発現の誘導や抑制の制御に関わる転写因子については、そのいくつかは、同定、機能解析されてきた (Sahu *et al.*, 2014; Yurimoto and Sakai, 2009;

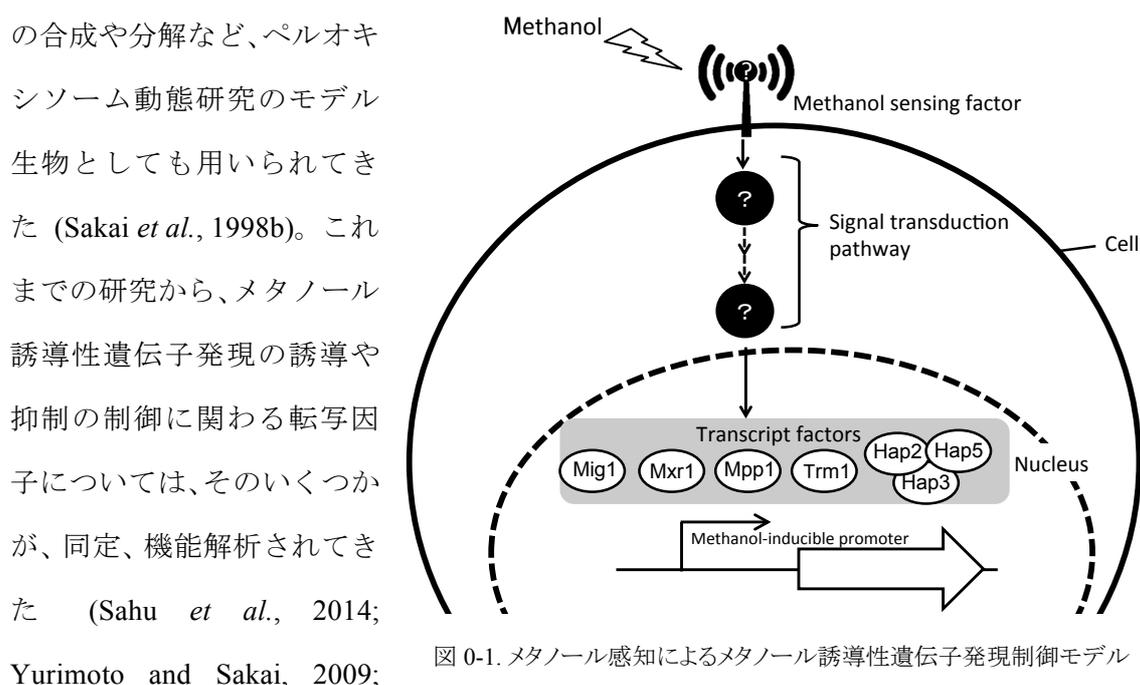


図 0-1. メタノール感知によるメタノール誘導性遺伝子発現制御モデル

Yurimoto, 2009; Lin-Cereghino *et al.*, 2006; Sasano *et al.*, 2008; Vogl and Glieder, 2013; Oda *et al.*, 2015)。しかし、細胞がどのように細胞外のメタノールを感知し、核内の転写因子にシグナル伝達しているかについての分子機構は明らかになっていない (図 0-1)。

メタノール誘導性遺伝子発現はメタノールにより強力に誘導されるが、エタノールによって抑制される (Hartner and Glieder, 2006; Yurimoto and Sakai, 2009)。また、メタノール培地で大きく発達したペルオキシソームは、エタノール培地へのシフトによってオートファジーによる分解 (ペキソファジー) を受ける (Tuttle *et al.*, 1993)。これらのことは、メタノール資化性酵母細胞がメタノールとエタノールを明確に区別し、細胞応答することを示している。また、植物葉上ではメタノールが 0-0.2%の範囲で日周変動し、メタノール資化性酵母は葉上のメタノール濃度に応じてメタノール誘導性遺伝子発現レベルを厳密に制御しながら増殖している (Kawaguchi *et al.*, 2011)。このことは、メタノール資化性酵母が細胞外のメタノール濃度を厳密に感知して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ている。このように、本酵母はメタノールとエタノールを区別し、メタノール濃度を厳密に感知することのできる感知因子を持つことが予想されるが、そのような因子は未だ同定されていなかった。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、Wsc ファミリータンパク質は細胞表層に存在する細胞表層ストレス感知因子である。Wsc ファミリータンパク質は細胞壁の構成成分と結合しており、熱や低浸透圧などといった細胞表層ストレスによって細胞壁が障害を受けると Wsc ファミリータンパク質の立体構造が変化し、細胞内にシグナルを伝達する (Jendretzki *et al.*, 2011)。*S. cerevisiae* は、複数種の Wsc ファミリータンパク質を有しており、様々な細胞表層ストレスをそれぞれの Wsc ファミリータンパク質が特異的に感知し、細胞壁合成酵素遺伝子の発現を誘導する (Rodicio and Heinisch, 2010)。しかし、それぞれの Wsc ファミリータンパク質がどのように特異的に刺激を感知するか、また複数種の Wsc ファミリータンパク質を持つ生理的意義については未だ明らかになっていない。さらに、Wsc ファミリータンパク質の細胞表層ストレス応答以外の機能についても不明である。

本論文では、メタノール資化性酵母 *P. pastoris* におけるメタノール誘導性遺伝子発現

制御に関わる新たな因子として細胞表層に存在する Wsc ファミリータンパク質 PpWsc1 /PpWsc3 を同定した。第一章では、メタノール感知因子として PpWsc1 /PpWsc3 を見出し、そのメタノール感知ならびに細胞表層ストレス感知に関する機能解析を行った。その結果、PpWsc1 /PpWsc3 が、それぞれ低濃度、高濃度のメタノールの感知に重要であることがわかった。また、PpWsc1 がメタノールと細胞表層ストレスの刺激の感知にも重要であり、これら二つの刺激を異なる刺激として感知、細胞制御していることを示した。第二章では、PpWsc1 /PpWsc3 がメタノールとエタノールを区別してメタノール誘導性遺伝子発現を制御しているかについての解析を行った。スクリーニングにより取得されたエタノール抑制不能変異株の解析から、メタノール感知因子 PpWsc1 /PpWsc3 がメタノールを特異的に感知することを明らかにした。また、エタノールによるメタノール誘導性遺伝子発現の抑制機能についての詳細な解析も行った。第三章では、PpWsc1 のペキソファジー制御に関する機能解析を行った。その結果、メタノール存在時に PpWsc1 が細胞表層ストレス応答時のシグナル伝達経路依存的にペキソファジーを抑制することを見出した。

第一章

細胞表層メタノール感知因子としての PpWsc1/PpWsc3 の同定

高濃度 (>10%) エタノールストレスへの応答と遺伝子発現制御に関わる遺伝子は出芽酵母 *S. cerevisiae* を用いて数多く同定されている (Alexandre *et al.*, 2001; Kubota *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2006; Yoshikawa *et al.*, 2009)。しかし、ストレスとは異なるエタノール特異的な感知機構についてはあまり研究が進んでいない。メタノール資化性酵母は非常に低濃度かつ広い濃度範囲 (0.01-1.0%) のメタノールを感知でき、メタノール濃度が 0-0.2% の範囲で日周変動する植物葉上で、本酵母は生育・増殖できることが分かっている (Kawaguchi *et al.*, 2011)。その際、細胞はメタノール濃度の変動に応じてメタノール誘導性遺伝子発現レベルを制御する。このような細胞外のメタノール濃度を、エタノールと区別して感知する因子の存在が予想されるが、そのような因子は未だ同定されていない。

メタノール代謝の代謝中間体であるホルムアルデヒドは毒性が非常に高いため、ホルムアルデヒドを産生する alcohol oxidase (AOX) とホルムアルデヒドを消費する dihydroxyacetone synthase (DAS) や formaldehyde dehydrogenase (FLD) や formate dehydrogenase (FDH) といったメタノール代謝酵素群の生合成のバランスは重要である (Sakai *et al.*, 1996; Yurimoto *et al.*, 2005)。低濃度メタノールにおいては、効率的なメタノール代謝に AOX の発現量を高くする必要があるが、高濃度メタノールの場合は、AOX の発現量が高すぎるとホルムアルデヒドを過剰に産生し、細胞死を引き起こす。そのため、メタノール資化性酵母は細胞外の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制御しなければならない。先行研究である *C. boidinii* を用いたメタノール誘導性遺伝子発現関連因子のスクリーニングによって得られた変異株の中に、シグナル伝達因子をコードする *CbROM2* に変異が挿入された株が取得された (Sasano *et al.*, 2007; Sasano *et al.*, 2008)。Rom2 が関わるシグナル伝達経路である cell wall integrity (CWI) 経路の上流で機能するセンサータンパク質として Wsc ファミリータンパク質が知られている (Levin, 2005)。このメタノール誘導性遺伝子発現制御に関わる Rom2 の上流因子で

ある Wsc ファミリータンパク質がメタノールの濃度を感知する因子なのではないかと考えた。

本章では、メタノール資化性酵母 *P. pastoris* を用いて、Wsc ファミリータンパク質が細胞外メタノールの濃度感知に関与していることを示した。PpWsc1 と PpWsc3 がメタノールと細胞表層ストレスの二つの刺激を異なるメカニズムで感知していること、また下流の PpRom2 を介してメタノール誘導性遺伝子発現を制御することを明らかにした。

材料および方法

使用菌株、培地、培養条件

Escherichia coli DH10B (Takara, 大津) をプラスミド調整に用いた。*E. coli* の培養には LB 培地 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) を用いた。

使用した酵母菌株は表 1-1 に示した。*P. pastoris* の培養には YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) あるいは YNB 培地 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids)。YNB 培地には次のいずれかの炭素源を加えた。2% (wt/vol) glucose, 2% (vol/vol) glycerol, 1% (vol/vol) methanol, 1% (vol/vol) ethanol。アミノ酸 (100 µg/ml) を必要に応じて、YNB 培地に加えた。生育度は 600nm の吸光度 (OD_{600nm}) によって測定した。培地中のホルムアルデヒド量は、Nash 法によって測定した(Nash, 1953)。

プラスミドの構築と遺伝子破壊

使用したオリゴヌクレオチドプライマーの配列は表 1-2 に示した。プラスミドは表 1-3 に示した。*PpWSC1* の遺伝子破壊用プラスミドは以下のように作製した。

EcoRI-PpWSC1-1-F/ KpnI-PpWSC1-1-R と BamHI-PpWSC1-2-F/ EcoRI-PpWSC1-2-R の組み合わせのプライマーによって 0.9-kb と 0.8-kb の断片をゲノム DNA を用いて増幅した。これら 2つの断片を KpnI-PpWSC1-1-R/ BamHI-PpWSC1-2-F の組み合わせのプライマーによってオーバーラップ PCR によって 1.7-kb の断片を増幅した。この断片を KpnI/BamHI で処理した 1.7-kb と SK-Zeo^r を KpnI/BamHI で処理した 4.1-kb の断片をライゲーションし、*PpWSC1* 遺伝子破壊ベクター-pOH100 を得た。同様に *PpWSC2*、*PpWSC3* のそれぞれの遺伝子破壊ベクターも構築した。EcoRI-PpWSC2-1-F/KpnI-PpWSC2-1-R と BamHI-PpWSC2-2-F/ EcoRI-PpWSC2-2-R の組み合わせのプライマーを用いて *PpWSC2* 遺伝子破壊ベクター-pOH102 を得た。EcoRI-PpWSC3-1-F / KpnI-PpWSC3-1-R と BamHI-PpWSC3-2-F/ EcoRI-PpWSC3-2-R の組み合わせのプライマーを用いて *PpWSC3* 遺伝子破壊ベクター-pOH102 を得た。*ARG4* 遺伝子を選択マーカーとして用いた *PpWSC3* 遺伝子破壊用プラスミドは PstI-PpWSC3-1-F/ EcoRI-PpWSC3-1-R と BamHI-PpWSC3-2-F/ PstI-PpWSC3-2-R の組み合わせのプライマーで断片を増幅し、こ

れら 2 つの断片を鋳型に EcoRI-PpWSC3-1-R/ BamHI-PpWSC3-2-F の組み合わせのプライマーによるオーバーラップ PCR によって 2 つの断片を連結した。pIB1 (Sears *et al.*, 1998) の *PpHIS4* 遺伝子を *ScARG4* 遺伝子に置換した pSY8200 を構築し、このプラスミドを EcoRI/BamHI によって処理した断片とオーバーラップ PCR によって連結した断片を EcoRI/BamHI 処理し、ライゲーションにより *PpWSC3* 遺伝子破壊ベクター pOH302 を得た。3xHA タグの断片を HindIII-3xHA-F/HindIII-3xHA-R の組み合わせのプライマーによって増幅し pIB1 の HindIII サイトに挿入し pSY006 ベクターを得た。*PpWSC1*、*PpWSC2*、*PpWSC3* のそれぞれの ORF と *ACT1* プロモーターと結合するための *ACT1* プロモーターの断片はそれぞれ KpnI-P_{ACT1}-F/P_{ACT1}-(PpWSC1)-R と EcoRI-P_{ACT1}-F/ P_{ACT1}-(PpWSC2)-F と EcoRI-P_{ACT1}-F/ P_{ACT1}-(PpWSC3)-R のプライマーでゲノム DNA を鋳型に増幅した。*PpWSC1*、*PpWSC2*、*PpWSC3* それぞれの ORF 領域は(P_{ACT1})-PpWSC1-F / SphI-PpWsc1-R、(P_{ACT1})-PpWSC2-F/SphI-(P_{ACT1})-PpWSC2-R、(P_{ACT1})-PpWSC3-F/SphI-(P_{ACT1})-PpWSC3-R の組み合わせのプライマーでゲノム DNA を鋳型に増幅した。これらの *ACT1* プロモーター断片とそれぞれの ORF 領域をオーバーラップ PCR によって連結した。これらの断片を KpnI/SphI で処理し、pSY006 に挿入した。これにより pOH202、pOH203、pOH204 を得た。pOH202 を KpnI/SphI で処理し、得られた 1.9-kb の *P_{ACT1}-PpWSC1* 断片を pNT205 (Tamura *et al.*, 2010) に挿入し、pOH303 を得た。pOH203 を鋳型に XmaI-P_{ACT1}-F/SphI-(P_{ACT1})-PpWSC3-R プライマーを用いて増幅した *PpACT1* promoter と *PpWSC3* ORF が連結された断片を XmaI と SphI によって処理し、pNT205 に挿入し、pOH304 を得た。*PpROM2* のプロモーターと ORF 領域を KpnI-PpROM2-F/SphI-PpROM2-R プライマーを用いて増幅した。この PCR 断片を KpnI と SphI で処理し、pSY006 に挿入し、pOH207 を得た。pOH202 と pOH203 をそれぞれ鋳型に Rom2 との結合領域をコードする *PpWSC1* と *PpWSC3* の配列を PpWSC1-310-316d-R/PpWSC1-310-316d-F と PpWsc3-359-365d-F/ PpWsc3-359-365d-R プライマーで inverse PCR することで欠失させ、増幅した断片をセルフライゲーションし pOH205、pOH206 を得た。*PpWSC1* 部位特異的変異体ベクターは pOH202 を鋳型にそれぞれ PpWSC1-Y53A-F, PpWSC1-Y53A-R, PpWSC1-Y53F-F, PpWSC1-Y53F-R,

PpWSC1-C46,50A-F, PpWSC1-C46,50A-R, PpWSC1-C64,66A-F, PpWSC1-C64,66A-R, PpWSC1-C82,86A-F, PpWSC1-C82,86A-R のプライマーペアを用いて inverse PCR によって作製した。これによって PpWsc1 変異体解析に使用する pOH208, pOH209, pOH210, pOH211, pOH212 を得た。

PpWSC1, *PpWSC2*, *PpWSC3* 遺伝子破壊株を作製するためにそれぞれの遺伝子破壊株である pOH100, pOH101, pOH102 を EcoRI によって処理し、*P. pastoris* にエレクトロポレーション法によって形質転換した。*PpWSC1PpWSC3* 二重遺伝子破壊株の作製には *PpWSC3* 遺伝子破壊ベクター pOH302 を PstI で処理し、OH1101 株を形質転換した。遺伝子破壊はコロニーPCR によって確認した。

ウエスタン解析

集菌した細胞を lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 0.1% Triton-X100, 10% (vol/vol) glycerol, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, EDTA-free complete protease inhibitor cocktail (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)] に懸濁し、Multi-Beads Shocker (安井器械、大阪) によって破碎した。細胞破碎液を 10,000 x g、5 分間 4°C で遠心分離し、上清に sample buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, a dash of bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol) を添加し、5 分間沸騰水上で加熱した。それぞれのサンプルを 12% SDS-PAGE ゲルにて電気泳動した後、セミドライブロッキング装置 (ATTO, 東京) で、タンパク質を PVDF 膜に転写した。転写されたメンブレンをそれぞれ TBS-T バッファーで 1000 倍希釈した anti-HA (F7; Santa Cruz Biotech, Dallas, TX)、anti-beta actin (Abcam, Cambridge, UK)、anti-AOX 抗体溶液に一晩つけ振盪した。そのメンブレンを 3 回 TBS-T バッファーで洗浄し、TBS-T バッファーで 10,000 倍希釈した anti-mouse-HRP (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) 抗体溶液で 1 時間振盪した。検出には Western Lightning (Perkin-Elmer Life Science, Waltham, MA) と Light Capture system (ATTO) を用いた。

蛍光顕微鏡による形態観察

P. pastoris を 5 ml の YPD 培地 28°C で定常期になるまで生育させ、その培養液 30 μ l を新たな 5 ml の YPD 培地 に植菌し、28°C で 5 時間振盪培養した。この培養液を 1,500 rpm 5 分間の遠心分離によって集菌し、この細胞を 5 ml のメタノール培地もしくは YPD 培地に移し、それぞれ 28°C もしくは 37°C で 30 分間振盪培養した。これらの細胞を遠心分離によって集菌し、IX81 蛍光顕微鏡 (Olympus, 東京) で観察した。蛍光画像は charged coupled device (CCD) camera (SenSys; PhotoMetrics, Tucson, AZ) で撮影し、MetaMorph software (Universal Imaging, West Chester, PA) を用いて解析した。

RNA 抽出と定量 PCR

シングルコロニーを YPD 培地に植菌し、一晚培養した。その酵母菌体をグルコース培地に OD_{600nm} が 0.1 になるように植菌し、対数期になるまで培養した。それをメタノール培地に OD_{600nm} が 1.0 になるように植菌し、1、2、4 時間 28°C で振盪培養した。これらの細胞を 4°C、1 分間 10,000 x g で遠心分離によって集菌した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて細胞から total RNA を抽出した。細胞を RLT buffer (QIAGEN, Hilden, Germany) で懸濁し、Multi-Beads Shocker によって細胞破碎した。ゲノム DNA の混入を防ぐために、total RNA を DNase I (RNase-Free DNase Set, QIAGEN, Hilden, Germany) によって処理した。抽出、精製した 1 μ g の total RNA を Random Primer (Promega, Fitchburg, WI) と ReverTra Ace (Toyobo, Osaka, Japan) を用いて逆転写を行った。ネガティブコントロールとして ReverTra Ace を含まない反応液を逆転写した。

定量 PCR (qRT-PCR) は Light Cycler Instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いた。PCR 反応には SYBR Premix Ex Taq (Takara) と表 1-3 に示したプライマー *GAP1*、*AOX1*、*DAS1*、*FLD1*、*FDH1* を用いた。解析、定量には Light Cycler software Version 4.1 を用いた。

表 1-1. 本章で使用した酵母菌株

Strain	Genotype	Reference
PPY12	<i>arg4 his4</i>	Sakai <i>et al.</i> (1998)
OH1101	PPY12, <i>Ppwsc1Δ::Zeo^r</i>	This study
OH1201	PPY12, <i>Ppwsc3Δ::Zeo^r</i>	This study
OH1301	PPY12, <i>Ppwsc2Δ::Zeo^r</i>	This study
OH1401	OH1101, <i>Ppwsc3Δ::ARG4</i>	This study
OH1402	PH1401, <i>his4::HIS4</i>	This study
OH1403	OH1401, <i>his4::(P_{ACT1}PpWSC1-3xHA)</i>	This study
OH1404	OH1401, <i>his4::(P_{ACT1}PpWSC3-3xHA)</i>	This study
OH1405	OH1401, <i>his4::(P_{ACT1}PpWSC1(310-316Δ)-3xHA)</i>	This study
OH1406	OH1401, <i>his4::(P_{ACT1}PpWSC3(359-365Δ)-3xHA)</i>	This study
OH1407	OH1401, <i>his4::(PpROM2-3xHA)</i>	This study
OH1408	OH1401, <i>his4::(P_{ACT1}PpWSC1(Y53A)-3xHA)</i>	This study
OH1409	OH1401, <i>his4::(P_{ACT1}PpWSC1(Y53F)-3xHA)</i>	This study
OH1410	OH1401, <i>his4::(P_{ACT1}PpWSC1(C46,50A)-3xHA)</i>	This study
OH1411	OH1401, <i>his4::(P_{ACT1}PpWSC1(C64,66A)-3xHA)</i>	This study
OH1412	OH1401, <i>his4::(P_{ACT1}PpWSC1(C82,86A)-3xHA)</i>	This study
OH1104	OH1101, <i>arg4::(P_{ACT1}PpWSC1-YFP, ARG4)</i>	This study
OH1105	OH1101, <i>arg4::(P_{ACT1}PpWSC1-YFP, ARG4), his4::HIS4</i>	This study
OH1202	OH1201, <i>arg4::(P_{ACT1}PpWSC3-YFP, ARG4)</i>	This study
OH1203	OH1201, <i>arg4::(P_{ACT1}PpWSC3-YFP, ARG4), his4::HIS4</i>	This study
GS115	<i>his4</i>	Cregg <i>et al.</i> (1985)
OH2001	GS115, <i>his4::HIS4</i>	This study
OH2101	GS115, <i>Ppwsc1Δ::Zeo^r</i>	This study
OH2201	GS115, <i>Ppwsc2Δ::Zeo^r</i>	This study
OH2301	GS115, <i>Ppwsc3Δ::Zeo^r</i>	This study
OH2103	OH2101, <i>his4::HIS4</i>	This study
OH2104	OH2101, <i>his4::(P_{ACT1}PpWSC1-3xHA)</i>	This study
OH2105	OH2101, <i>his4::(P_{ACT1}PpWSC3-3xHA)</i>	This study
OH2106	OH2101, <i>his4::(P_{ACT1}PpWSC2-3xHA)</i>	This study
OH2107	OH2101, <i>his4::(PpROM2-3xHA)</i>	This study
OH2202	OH2201, <i>his4::(PpROM2-3xHA)</i>	This study
OH2302	OH2201, <i>his4::(PpROM2-3xHA)</i>	This study
OH2002	GS115, <i>his4::(PpROM2-3xHA)</i>	This study

表 1-2. 本章で使用したオリゴヌクレオチドプライマー

Designation	DNA Sequence
EcoRI-PpWSC1-1-F	5'-TTCAGTTGAGCTTCGTCCTGGGAATTCCTTGGATATGCCGG ACTCTTC-3'
KpnI-PpWSC1-1-R	5'-GGGGTACCAATTGCAGCCAGGGCTAATA-3'
BamHI-PpWSC1-2-F	5'-CGGGATCCCTGTAGGCGGTGTTGTTGGT-3'
EcoRI-PpWSC1-2-R	5'-GAAGAGTCCGGCATATCCAAGGAATCCCAGGACGAAGCTC AACTGAA-3'
EcoRI-PpWSC2-1-F	5'-TGA CTGAATAGCTAGCATCCTTGGGAATTCGGTTGCACTTGC ATTTTGGTG-3'
KpnI-PpWSC2-1-R	5'-GGGGTACCGCGAAGGAATCCGAACAATA-3'
BamHI-PpWSC2-2-F	5'-CGGGATCCCTTCTGTTGCAGAAAGAGACGA-3'
EcoRI-PpWSC2-2-R	5'-CACCAAAATGCAAGTGCAACGGAATCCCAAGGATGCTAGC TATTCAGTCA-3'
EcoRI-PpWSC3-1-F	5'-TACTGCGGGAGTTCAGAATTTTGGGAATTCACCTCCATAACG ACCAAACG-3'
KpnI-PpWSC3-1-R	5'-GGGGTACCCCGCATTCCTCCCTACAATA-3'
BamHI-PpWSC3-2-F	5'-CGGGATCCGGTTTCATTAAGGCCGAACA-3'
EcoRI-PpWSC3-2-R	5'-CGTTTGGTCGTTATGGAGGTGGAATCCAAAATTCTGAACTC CCGCAGTA-3'
HindII-3xHA-F	5'-CCCAAGCTTTCTAGATCTATCTTTTACCCATACGATG-3'
HindII-3xHA-R	5'-CCAAGCTTTTACTGAGCAGCGTAATCTGGA-3'
KpnI-P _{ACT1} -F	5'-GGGGTACCTCGCTGGTAATCCCGGCT-3'
XmaI-P _{ACT1} -F	5'-TCCCCCGGGTCGCTGGTAATCCCGGCT-3'
P _{ACT1} -(PpWSC1)-R	5'-AGGGCTAATATTCGTAATCTCAACATTGTATTGATGAATTC TTTTACTAACTGT-3'
(P _{ACT1})-PpWSC1-F	5'-ACAGTTTAGTAAAAGAAATTCATCAATACAATGTTGAGATT ACGAATATTAGCCCT -3'
SphI-PpWSC1-R	5'-ACATGCATGCAGCATCATCAGGATTTGCTACC-3'
(P _{ACT1})-PpWSC2-F	5'-ACAGTTTAGTAAAAGAAATTCATCAATACAATGTTGATGCT ACTGAAGCTGC -3'
SphI-(P _{ACT1})-PpWSC2-R	5'-ACATGCATGCAGTTGTTCCGAATGAATTTTCA-3'
P _{ACT1} -(PpWSC2)-R	5'-GCAGCTTCAGTAGCATCAACATTGTATTGATGAATTTCTTTT ACTAAACTGT-3'

次ページに続く

表 1-2. 本章で使用したオリゴヌクレオチドプライマー（前ページからの続き）

Designation	DNA Sequence
(P _{ACT1})-PpWSC3-F	5'-ACAGTTTAGTAAAAGAAATTCATCAATACAATGACCAAGTTTATATTGATATTGGC-3'
SphI-(P _{ACT1})-PpWSC3-R	5'-ACATGCATGCAACTTCATCATCTGTGGGGTT-3'
P _{ACT1} -(PpWSC3)-R	5'-GCCAATATCAATATAAACTTGGTCATTGTATTGATGAATTTCTTTACTAAACTGT-3'
EcoRI-P _{ACT1} -F	5'-CGGAATTCTCGCTGGTAATCCCGGCT-3'
PstI-PpWSC3-1-F	5'-TACTGCGGGAGTTCAGAATTTTCTGCAGACCTCCATAACGACCAAACG-3'
EcoRI-PpWSC3-1-R	5'-CGGAATTCCCGCATTCTCCCTACAATA-3'
BamHI-PpWSC3-2-F	5'-CGGGATCCGGTTTCATTAAGGCCGAACA-3'
PstI-PpWSC3-2-R	5'-CGTTTGGTCGTTATGGAGGTCTGCAGAAAATTCTGAACTCCCGCAGTA-3'
KpnI-PpROM2-F	5'-CGGGGTACCAACCCAAGTGAACCAACAGC-3'
SphI-PpROM2-R	5'-GACATGCATGCTTCATTGACGTTCTTCAATTTCTT-3'
PpWSC1-310-316d-R	5'-CACCTTCCTGGAGTAATCTGCTTCATC-3'
PpWSC1-310-316d-F	5'-GATGCTGCATGCAAGCTTTCTAGA-3'
PpWSC2-359-365d-F	5'-TGGTGGAAACCCACAGATGATGAA-3'
PpWSC2-359-365d-R	5'-GTGGGGTTTCCACCAAGACCTGGAGA-3'
PpWSC1-Y53A-F	5'-GCCAACGCAGATTTTTTTGCTTTAACTGAGGGT-3'
PpWSC1-Y53A-R	5'-AAAATCTGCGTTGGCACAAGTCTTTGCACATTC-3'
PpWSC1-Y53F-F	5'-GCCAACTTCGATTTTTTTGCTTTAACTGAGGGT-3'
PpWSC1-Y53F-R	5'-AAAATCGAAGTTGGCACAAGTCTTTGCACATTC-3'
PpWSC1-C46,50A-F	5'-GCTGCAAAGACTGCTGCCAACTACGATT-3'
PpWSC1-C46,50A-R	5'-TTCACCTGAACTTTGATATACGTATTC-3'
PpWSC1-C64,66A-F	5'-GCTTATGCTGGGTCTTCTGCCTTTCAT-3'
PpWSC1-C64,66A-R	5'-TTTGTACCCTCAGTTAAAGCAAA-3'
PpWSC1-C82,86A-F	5'-GCTACCGTTCTGCTGTCGGA-3'
PpWSC1-C82,86A-R	5'-CTCATCGGAGGTATCTTCATCC-3'

次ページに続く

表 1-2. 本章で使用したオリゴヌクレオチドプライマー（前ページからの続き）

Designation	DNA Sequence
RT-AOX1-F	5'-AGGGCTTCTGAGTCCCAAGG-3'
RT-AOX1-R	5'-AGCAGAGTCGGAACGACGAC-3'
RT-DAS1-F	5'-TTGCGTATGGCTGCTCTTCA-3'
RT-DAS1-R	5'-GGGTTGGACCATCTTCACCA-3'
RT-FLD1-F	5'-CACGCTTTCTGGTGCAGATG-3'
RT-FLD1-R	5'-ATCCCCAACCTTCACGGACT-3'
RT-FDH1-F	5'-GCACATTCCTGACGCTGATG-3'
RT-FDH1-R	5'-GACACCAGCAACGACCAACA-3'
RT-GAP1-F	5'-CCACCGGTGTTTTCACTACT-3'
RT-GAP1-R	5'-CACCGACAACGAACATTGGA-3'

表 1-3. 本章で使用したプラスミド

Designation	Description	Reference
SK+Zeo ^r	<i>Zeo^r</i>	Yano <i>et al.</i> (2009)
pOH100	$\Delta PpWSC1::Zeo^r$	This study
pOH101	$\Delta PpWSC3::Zeo^r$	This study
pOH102	$\Delta PpWSC2::Zeo^r$	This study
pIB1	<i>HIS4</i>	Sears <i>et al.</i> (1998)
pOH202	<i>P_{ACT1}PpWSC1-3xHA HIS4</i>	This study
pOH203	<i>P_{ACT1}PpWSC3-3xHA HIS4</i>	This study
pOH204	<i>P_{ACT1}PpWSC2-3xHA HIS4</i>	This study
pOH205	<i>P_{ACT1}PpWSC1(310-316Δ)-3xHA HIS4</i>	This study
pOH206	<i>P_{ACT1}PpWSC3(359-365Δ)-3xHA HIS4</i>	This study
pOH207	<i>PpROM2-3xHA HIS4</i>	This study
pOH208	<i>P_{ACT1}PpWSC1(Y53A)-3xHA HIS4</i>	This study
pOH209	<i>P_{ACT1}PpWSC1(Y53F)-3xHA HIS4</i>	This study
pOH210	<i>P_{ACT1}PpWSC1(C46,50A)-3xHA HIS4</i>	This study
pOH211	<i>P_{ACT1}PpWSC1(C64,66A)-3xHA HIS4</i>	This study
pOH212	<i>P_{ACT1}PpWSC1(C82,86A)-3xHA HIS4</i>	This study
pNT204	pIB1 <i>ARG4</i>	Tamura <i>et al.</i> (2010)
pNT205	YFP-pIB1 <i>ARG4</i>	Tamura <i>et al.</i> (2010)
pOH302	$\Delta PpWSC3::ARG4$	This study
pOH303	<i>P_{ACT1}PpWsc1-YFP ARG4</i>	This study
pOH304	<i>P_{ACT1}PpWsc3-YFP ARG4</i>	This study
pSY006	3xHA-pIB1	This study

結果

PpWsc1 と PpWsc3 はメタノール誘導性遺伝子発現に関与する

Wsc ファミリータンパク質をコードすると推定される 3 つの遺伝子を *P. pastoris* ゲノム上に特定した。それぞれの遺伝子を *PpWSC1* (XP_002492900.1)、*PpWSC2* (XP_002490546.1)、*PpWSC3* (XP_002490545.1) と名付けた。PpWsc1、PpWsc2、PpWsc3 はそれぞれ 318、381、372 のアミノ酸残基からなり、その推定分子量は 33.4 kDa、44.1 kD、38.6 kDa である。*S. cerevisiae* Wsc1 (ScWsc1) との相同性については PpWsc1 の類似性は 62.7%、同一性は 28.4%、PpWsc2 の類似性は 62.5%、同一性は 27.9%、PpWsc3 の類似性は 67.4%、同一性は 27.4% であった。Wsc ファミリータンパク質の重要な特徴である cysteine-rich ドメイン (CRD)、serine/threonine rich 領域 (STR)、Rom2 相互作用領域、細胞膜貫通ドメイン (TMD) は、3 つの PpWsc ファミリータンパク質全てで保存されて

	CRD	
PpWsc1	---MLRLRLALAAIFMTVEAYKLG GF FEDLPS--SFSFANEVYVQSSG EG AKT AN --Y	53
PpWsc2	--MLMLKLLSILICLRHVIALTYG Y PSSQL E QSF F QSS T SL Q T I EL Q SG A SS--R	56
PpWsc3	--MTK F IL L AL V SR V FA A T Y NY Y G F ASS S V N - S L T SR G T V Q F Q S T S V Y GR E E Q D--T	54
ScWsc1	MRPNK T SL L L L LS I LS Q AN A Y E Y V N F SSL P S-- D FS K AD S Y N W Q SS H Q N SE S AK G A	58
	* : * : * : *	
	CRD	
PpWsc1	DFFALTEG N K Y CGSSASSL A DE D T S DE T V P GV G Y P Q E I Q GGDD D AY T V S MS D S F VL G	113
PpWsc2	LYLALINGTE Y CGSD S FA V ES E R-- S IE Q EV R AG N TT Q T Q GG T FS F Q V FL H ED L AN S I S	114
PpWsc3	DVAAMSG G NA F CGSS V PSS D K V ES F Q N E P Q D G V LE I AG G T N Y L S V V N ED A DD D DD D	114
ScWsc1	SYFALYNHSE Y CG-D T N P SG S EST S SS Q NT Y FG Y S S EM Q GG E D- A YS V Y Q L D S T NS N	116
	* : * : * : * : * : * : *	
	STR	
PpWsc1	SSGSSGSSSSSS R TSS Q STSS S R----- T SS S TS S T D TTSS S SV A TT S AA S N----	163
PpWsc2	SSASTSE Y PS T LP S DS N D T ST I SD G SY L FE G SS T LL T AG V Q N FT F SLSS S SP Q ---	171
PpWsc3	DDDDDE T TS S TS S SS S SS S SS----- S TS S TT S TS S TR T SS L T A SS T S---	165
ScWsc1	SISSSD S TEST S ASS S TT S TT S S----- T TS T TS T SS T SS M ASS S TV Q NS P EST	170
	* : * : * : * : * : * : *	
	STR	
PpWsc1	----- S DE S TS V Q M Y T S V TH S G S DP V TS V VY----- V TS V	194
PpWsc2	----- T FF S W N T L AN I TS S ED S EW S ET S IES Q VA E TV A P A V A NE A T Q V T VD T	224
PpWsc3	----- S SS S SS S ST N SP S PT S ASS S TT S SS S Q Q V S VI V TT S A E RS G S V EV V TT V	217
ScWsc1	QAA A S I ST S Q S SV T SE S LT S DT L AT S TS S Q S Q D AT S II Y ST T FF H EG G ST I F V T N T	230
	* : * : * : * : * : * : *	
	STR	
PpWsc1	STPS-- A ESS G NS G GG S ----- N RG A L I GG A V G V V G A L I I F S L A F F F I W	237
PpWsc2	SSDEL Q SS S Q F I P T P SP S AT A SY I EN G Q V L S T G A I V G I S V G CS S L L V F V V I C Y F V R	284
PpWsc3	IT A LD N S Q ET G SS S SS S ND S T A NR G SN S G S LS K Q A I A GT V I G S V I G GV L I I VAL A F W I W	277
ScWsc1	IT A S-- A Q N SG S AT G T A GS D ST S GS K TH K K A N V G A I V GG V GG V GA V A I AL C IL L I V R	288
	* : * : * : * : * : * : *	
	TMD	
PpWsc1	RR I H N K S D----- L SS S ST I DA I Y D E A K R N P K L A-- T N F ED P N Q E Y D H Q M N P V	287
PpWsc2	RR N I K SA Q LP----- E DE S SA E R D D Y SE F V R NY V Q N Y H Q N GS I LS S SS Q S V IS S LD T N	339
PpWsc3	RRR K SD I ES----- D LE A D N E K EA A V S DF V RS Y AV P PS-- H V A VT D P S T E ND Q V L R P N	330
ScWsc1	H N M K RE Q DR M E K E Y EA I K P VE Y PD K LY A SS F SS N H G PS-- S GS F EE E HT K G-- Q T D I N P F	346
	* : * : * : * : * : * : *	
	Rom2-interacting site	
PpWsc1	AL G RR R L S EG S L A DE A D Y SR K ----- V IR V AN P DA-----	318
PpWsc2	ST G PF G SG Q VR R FD Q DD F ED E RE-- V RI N PD N TS E NS F GT T	381
PpWsc3	N A L T RR F SH G SL P D V T Q S Y D P SP L GG R I N PD N PT D DEV---	372
ScWsc1	DD S RR I SN G TF I NG G PG G K N N----- V IR V AN P DA-----	378
	* : * : * : *	

図 1-1. PpWsc1, PpWsc2, PpWsc3 のアミノ酸配列比較

CLUSTALW を用いて PpWsc1, PpWsc2, PpWsc3, *S. cerevisiae* Wsc1 (ScWsc1) のアミノ酸配列のアライメントを行った。CRD: cysteine rich domain、STR: serine/threonine rich region、TMD: 細胞膜貫通ドメイン。8 つの保存されているシステイン残基は黒の背景、推定 TMD は黒線で囲んだ領域で示している。ScWsc1 において Rom2 との相互作用に必要な領域内 (Rom2-interacting site) の保存されているアミノ酸残基はグレーの背景で示している。

いた (図 1-1)。Zeocin 耐性遺伝子と置き換えることで、*PpWSC1*、*PpWSC2*、*PpWSC3* の遺伝子破壊株を作製し、それら破壊株のメタノール培地での生育を測定した。*PpWSC1* 破壊株 (*PpWSC1Δ*株) はメタノール培地での顕著な生育遅延が見られたが、*PpWSC2* 破壊株 (*PpWSC2Δ*株)、*PpWSC3* 破壊株 (*PpWSC3Δ*株) では生育遅延が見られなかった (図 1-2A)。

PpWSC1 の遺伝子破壊によるメタノール誘導性遺伝子発現に与える影響について調べるため、メタノール誘導性遺伝子遺伝子 *AOX* (*AOX1*、*AOX2*)、*DAS* (*DAS1*、*DAS2*)、*FLD1*、*FDH1* の発現レベルを qRT-PCR によって比較した。野生株と遺伝子破壊株の細胞をグルコース培養で前培養したのち 0.001%、0.01%、0.1%、1%メタノール培地もしくは、炭素源を含まない YNB 培地 (0%メタノール培地) に移し、28°C、2 時間振盪培養した。0%もしくは 0.001%メタノール培地では、試験したメタノール誘導性遺伝子の発現レベルに大きな違いは野生株と *PpWSC1Δ*株の間で見られなかった。一方、0.01%、0.1%、1%メタノール培地では、*PpWSC1Δ*株において顕著なメタノール誘導性遺伝子発現レベルの低下がみられた (図 1-3A)。野生株と *PpWSC2Δ*株、*PpWSC3Δ*株においては、メタノール誘導性遺伝子発現レベルに有意な差はいずれのメタノール濃度でもみられなかった (未掲載データ)。このことは、*PpWSC2Δ*株もしくは *PpWSC3Δ*株において、*PpWSC1* のみで、十分なメタノール誘導性遺伝子発現の制御が可能であることを示唆している

次に、*PpWSC1ΔPpWSC3Δ*二重破壊株におけるメタノール誘導性遺伝子の転写レベルを測定した (図 1-3B)。野生株における *AOX*、*DAS*、*FLD1*、*FDH1* の転写レベルは、メタノール濃度依存的な応答を示した。転写のピークは 0.05%-0.1%の範囲であり、それ以上の濃度では転写が低下した。一方、*PpWSC1ΔPpWSC3Δ*株では 0.005%以上の濃度では顕著に発現レベルが低下した (図 1-3B)。さらに、これら *PpWSC* 遺伝子破壊株の *AOX* タンパク質のレベルをウエスタン解析によって比較した (図 1-3C)。*PpWSC1ΔPpWSC3Δ*株では *AOX* タンパク質のレベルは *PpWSC1Δ*株より低下していた。さらに、*PpWSC1ΔPpWSC3Δ*株のメタノール培地での生育は、*PpWSC1Δ*株より顕著に遅延した (図 1-2A)。これらの結果から、*PpWSC3* もメタノール誘導性遺伝子発現制御に関わることが明らかになった。*PpWSC1Δ*株のメタノール誘導性遺伝子発現レベルの低下がメタノール培地での生育に

顕著な生育遅延を引き起こした (図 1-2B)。PpWsc1 と PpWsc2 もしくは PpWsc3 のメタノール誘導性遺伝子発現制御への機能重複を調べるために、*PpWSC1*Δ株に *ACT1* プロモーター支配下で *PpWSC1*、*PpWSC2*、*PpWSC3* 遺伝子の C 末端に 3xHA タグを融合して過剰発現する株を作製した。ウェスタン解析でタンパク質の発現を確認した (図 1-2C)。3xHA タグを融合した PpWsc1、PpWsc2、PpWsc3 の推定分子量は 36 kDa、44 kDa、42 kDa であるが、検出されたバンドは泳動度が低いので、*S. cerevisiae* で報告されているように高糖鎖修飾されていると考えられる (Lodder *et al.*, 1999)。3xHA タグを融合した PpWsc1 が *PpWSC1*Δ株のメタノール培地での生育遅延を相補することを確認した (図 1-2B)。PpWSC3Δ株はメタノール培地 28°C での生育は通常の生育を示したが、メタノール培地での *PpWSC1*Δ株の生育遅延を *ACT1* プロモーターで過剰発現した *PpWSC3* によって相補した (図 1-2B)。このことから、PpWsc3 と PpWsc1 はメタノール生育時の機能が重複することがわかった。一方、*PpWSC2* の過剰発現では相補しなかった。これらから、PpWsc1 と PpWsc3 がメタノール誘導性遺伝子発現制御に関与することが示された。

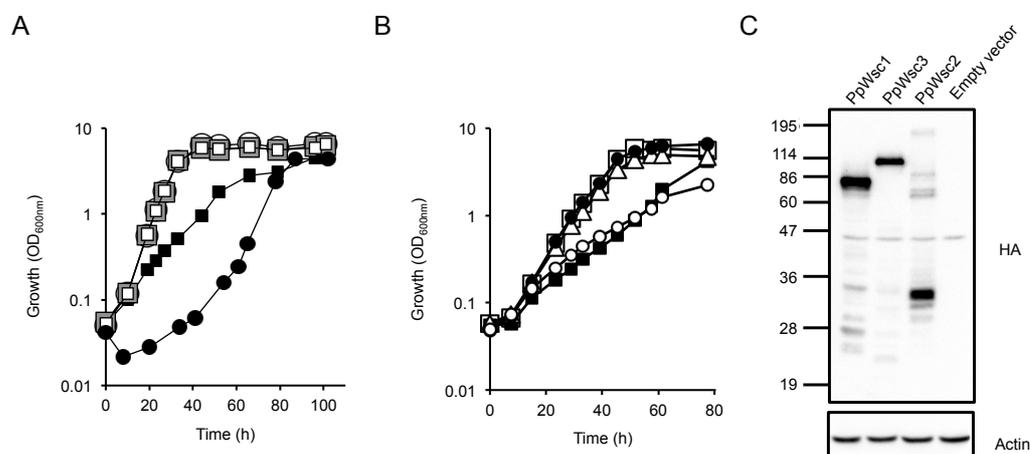


図 1-2. *PpWSC* 遺伝子破壊株のメタノール培地での生育 (A) 28°C でのメタノール生育。野生株 (□) *PpWSC1*Δ株 (■)、*PpWSC2*Δ株 (○)、*PpWSC3*Δ株 (■)、*PpWSC1*Δ*PpWSC3*Δ株 (●) (B) *PpWSC* 過剰発現による *PpWSC1*Δ株の生育遅延の相補性。野生株 (□)、*PpWSC1*Δ株 (■) *PpWSC1*Δ株の PpWsc1-3xHA 発現株 (Δ)、PpWsc2-3xHA 発現株 (○)、PpWsc3-3xHA 発現株 (●) (C) PpWsc1-3xHA、PpWsc2-3xHA、PpWsc3-3xHA のウェスタン解析

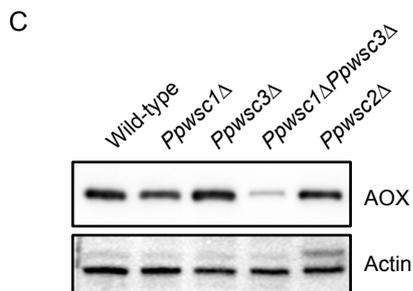
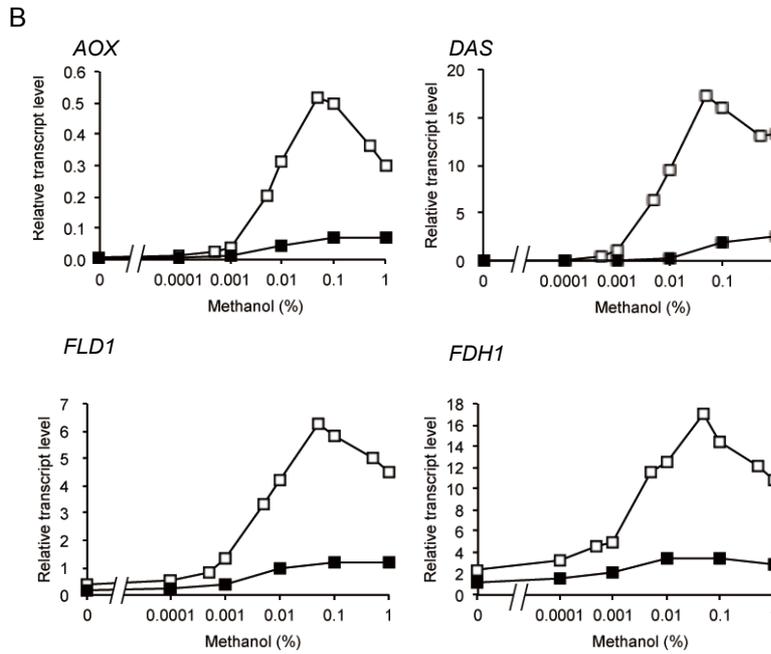
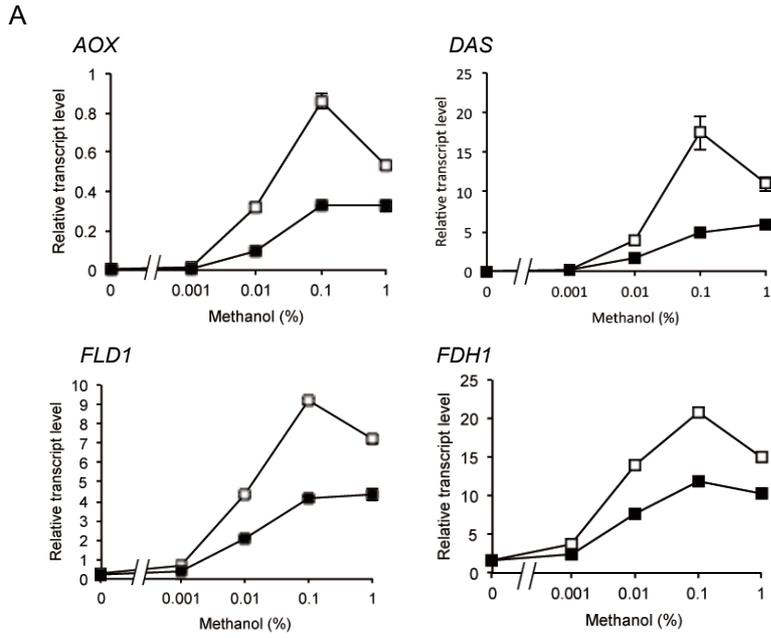


図 1-3. *Ppwsc1*Δ株、*Ppwsc1*Δ*Ppwsc3*Δ株のメタノール誘導性遺伝子発現レベル (A) 野生株 (□)、*Ppwsc1*Δ株 (■) のメタノール誘導性遺伝子発現レベル (B) 野生株 (□)、*Ppwsc1*Δ*Ppwsc3*Δ株 (■) のメタノール誘導性遺伝子発現レベル (C) *PpWSC*遺伝子破壊株のAOXタンパク質レベル

PpWsc3 はより高濃度メタノールにおけるメタノール誘導性遺伝子発現に関与する

PpWsc1 と PpWsc3 の機能を比較するために、*Ppwsc1ΔPpwsc3Δ*株に *ACT1* プロモーター支配下で *PpWSC1* と *PpWSC3* を発現させた株を作製し、メタノール濃度に対する応答を *AOX* と *DAS* の転写レベルを比較した (図 1-4)。 *PpWSC1* 発現株は、*AOX* と *DAS* の転写レベルはそれぞれメタノール濃度が 0.025% と 0.05% でピークとなった。一方、*PpWSC3* 発現株は 0.25% でピークを示した。このことから PpWsc1 は、より低濃度メタノールへの応答に、PpWsc3 は、より高濃度メタノールへの応答に重要であることがわかった。

PpWsc1 と PpWsc3 の高温条件と Congo red 存在下での機能

PpWsc1 が ScWsc1 と同様な機能をもつかどうかについて、ScWsc1 の機能として知られている高温 (37°C) や細胞壁に傷害を与える試薬である Congo red 存在下での生育を調べた (Verna *et al.*, 1997; Serrano *et al.*, 2006)。野生株、*Ppwsc1Δ*株、*Ppwsc2Δ*株、*Ppwsc3Δ*株の菌液の希釈系列を調整し、37°C でのグルコース培地と 28°C での Congo red を添加したグルコース培地それぞれにスポットした。図 1-5A に示したように、*PpWSC1* 遺伝子の破壊により高温と Congo red の両方に対して高感受性を示し、この表現型は浸透圧安定剤として知られるソルビトールの存在によって抑圧された。一方、*Ppwsc2Δ*株、*Ppwsc3Δ*株は 37°C や Congo red に対する生育の遅延は確認できなかった。この結果から、

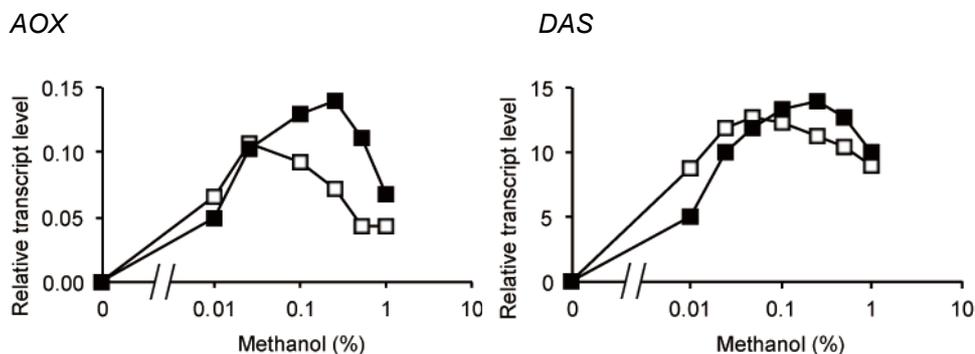


図 1-4. *Ppwsc1ΔPpwsc3Δ*の*PpWSC1*、*PpWSC3*発現株のメタノール誘導性遺伝子発現レベル
*PpWSC1*発現株 (□)、*PpWSC3*発現株 (■)

PpWsc2 は高温や細胞壁に傷害を与える試薬への応答には関わらないことが示された。さらに、*PpWSC1* の過剰発現によって *Ppwsc1ΔPpwsc3Δ* 株の高温感受性は軽減されたが、*PpWSC3* の過剰発現によつては軽減されなかった (図 1-5)。これらの結果は、*P. pastoris* において、PpWsc1 が細胞表層ストレス応答とメタノール誘導性遺伝子発現の両方に機能し、PpWsc3 は主にメタノール誘導性遺伝子発現に特異的に機能することを示している。

PpWsc1 の部位特異的変異体解析

本章の結果から、PpWsc1 はメタノール誘導性遺伝子発現と高温ストレス下の細胞表層ストレス応答の両方に機能することがわかった。そこで PpWsc1 がこれら二つの細胞外の刺激を区別して認識するかどうかについて解析を行った。PpWsc1 の CRD 領域内の変異のスクリーニングをおこない、メタノール誘導性遺伝子発現もしくは高温ストレス応答に機能欠損がある変異体の取得を試みた。Wsc ファミリータンパク質の特徴的な性質としては N 末端付近に位置する CRD 領域とそれに続く高度に O-マンノシル型糖鎖修飾される STR 領域が挙げられる。これらの領域によって、Wsc ファミリータンパク質はナノスプリングのような性質をもつ (Dupres *et al.*, 2009)。この重要な領域内に存在し、ホルムアルデヒドへの反応性が特に高いと報告例があるチロシン残基に着目した (Metz *et al.*, 2004; Metz *et al.*, 2006)。PpWsc1 の CRD に複数のチロシン残基が存在している。CRD 領域内に存在するチロシン残基への部位特異的変異体解析の結果、53 番目の

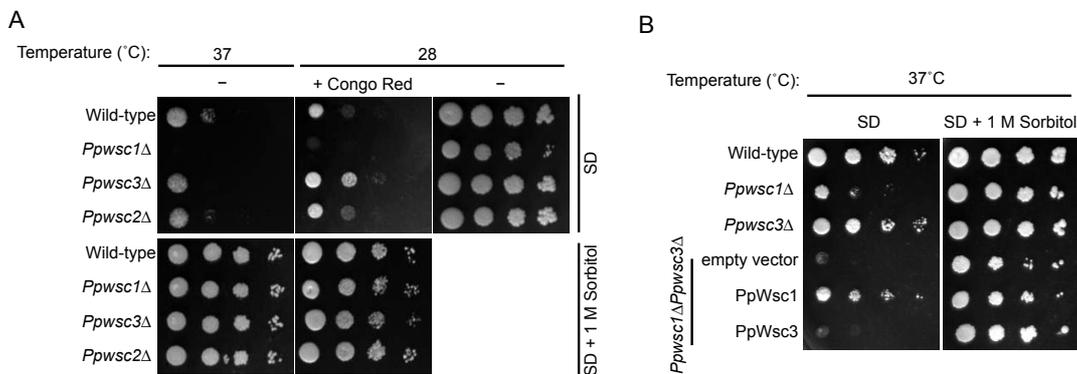


図 1-5. *PpWSC* 遺伝子の細胞表層ストレスに対する機能 (A) *PpWSC* 遺伝子破壊株の細胞表層ストレス条件下の生育 (B) *PpWSC1*、*PpWSC3* 過剰発現時の *Ppwsc1ΔPpwsc3Δ* 株の細胞表層ストレス条件下の生育

チロシン残基 (Y53) が PpWsc1 に重要な残基であることがわかった (図 1-6)。多くの PpWsc1 のチロシン残基置換株は、メタノール誘導性遺伝子発現レベルの低下と高温ストレス高感受性を示した (未掲載データ)。PpWsc1(Y53A)発現株は、*AOX* や *DAS* の転写レベルが野生株に比べ 40%程度まで低下した (図 1-6A 左)。しかし、高温ストレスへの感受性は見られなかった (図 1-6B)。一方、PpWsc1(Y53F)発現株は、高温ストレス高感受性を示したが (図 1-6B)、メタノール誘導性遺伝子発現レベルの低下は見られなかった (図 1-6A 右)。PpWsc1 変異タンパク質のタンパク質発現量はウエスタン解析で確認した (図 1-6C)。これらの結果は、Y53A と Y53F は、それぞれメタノール誘導性遺伝子発現と高温ストレスへの特異的な影響を与えることを示唆している。このことから、PpWsc1 がメタノールと細胞表層ストレスを異なる機構によって感知することを示している。高温や低浸透圧ストレス時の分子内、もしくは分子間のジスルフィド架橋形成による Wsc ファミリータンパク質分子のクラスター化に CRD 領域は機能することが報告されている (Dupres *et al.*, 2011; Heinisch *et al.*, 2010)。PpWsc1 の CRD 領域内の ScWsc1 でクラスター化に関連するシステイン残基をアラニン残基への置換変異株を作製した。PpWsc1 (C46,50A)、 PpWsc1 (C64,66A)、PpWsc1 (C82,86A) 発現株はメタノール誘導性遺伝子発現 (図 1-7B)、また 37°C グルコース培地での生育の遅延が見られた (図 1-7B)。PpWsc1 (C46,50A) と PpWsc1 (C64,66A) のタンパク質レベルは低下したが、PpWsc1 (C82,86A) は PpWsc1 と同程度にタンパク質レベルであった (図 1-7C)。このことは PpWsc1 の C46、C50、C64、C66 がタンパク質の安定性に影響を与えることを示している。

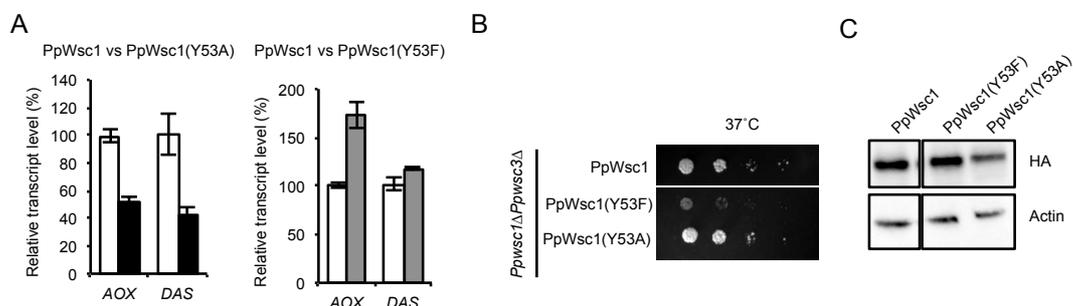


図 1-6. PpWsc1 Y53アミノ酸置換変異体の解析
(A)メタノール誘導性遺伝子発現レベル。PpWsc1ΔPpWsc3ΔのPpWsc1-3xHA発現株 (□)、PpWsc1(Y53A)-3xHA発現株 (■)、PpWsc1(Y53F)-3xHA発現株 (▣) (B) 細胞表層ストレス条件下の生育 (C) ウエスタン解析

以上の部位置換変異株の解析から CRD 領域内のシステイン残基 (C82、C86)とチロシン残基 (Y40、Y53、Y65、Y89) がメタノール誘導性遺伝子発現と細胞表層ストレス応答への機能に影響を与える。この結果から、PpWsc1 の CRD 領域の構造が細胞外の刺激の感知とシグナル伝達に重要であることがわかった (Lodder *et al.*, 1999; Heinisch *et al.*, 2010)。

高温条件下でのメタノール生育時の PpWsc1 /PpWsc3 の協調的な機能

上述の通り、PpWsc1 が 37°C でのグルコース培地での生育とメタノール生育時のメタノール誘導性遺伝子発現に重要な役割を持つが、PpWsc3 はメタノール誘導性遺伝子発現にのみ関与する。では、高温条件下におけるメタノール誘導性遺伝子発現には、PpWsc1 と PpWsc3 はどのように働くのだろうか。

細胞を 28°C のグルコース培地で生育させ、メタノール培地に移し、その 37°C での生育を比較した。図 1-8A が示すように、*Ppwsc1Δ*株は 37°C、メタノール培地で生育遅延を示した。*Ppwsc3Δ*株は 28°C のメタノール培地での生育には大きな生育遅延を示さなかったが (図 1-2A)、37°C、メタノール培地で著しい生育遅延を示した (図 1-8A 左)。37°C でグルコース培地での生育で、野生株、*Ppwsc1Δ*株、*Ppwsc3Δ*株の間で大きな違いは見られなかった (図 1-8A 右)。

37°C におけるグルコース培地での生育には、PpWsc3 は関わらないが PpWsc1 は高温ストレス応答に機能する。しかし、37°C、メタノール培地での生育で細胞は二つの刺

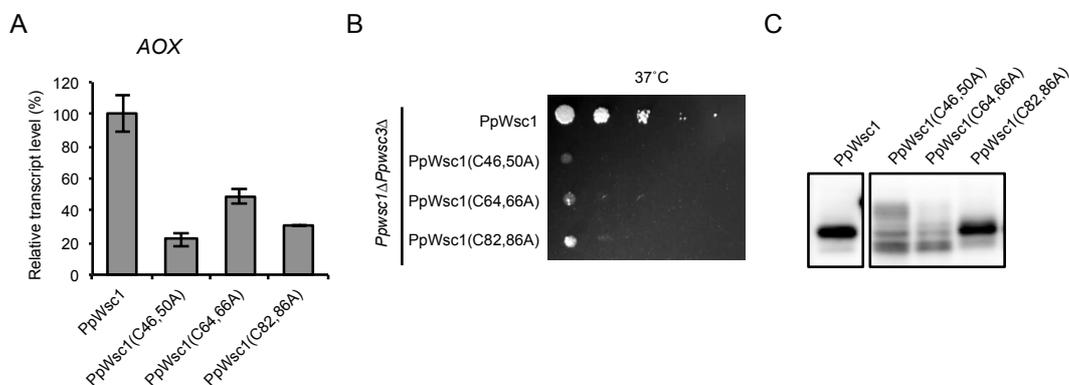


図 1-7. CRD内システイン残基のアラニン置換によるPpWsc1の機能への影響 (A)メタノール誘導性遺伝子発現レベル (B) 細胞表層ストレス条件下の生育 (C) ウェスタン解析

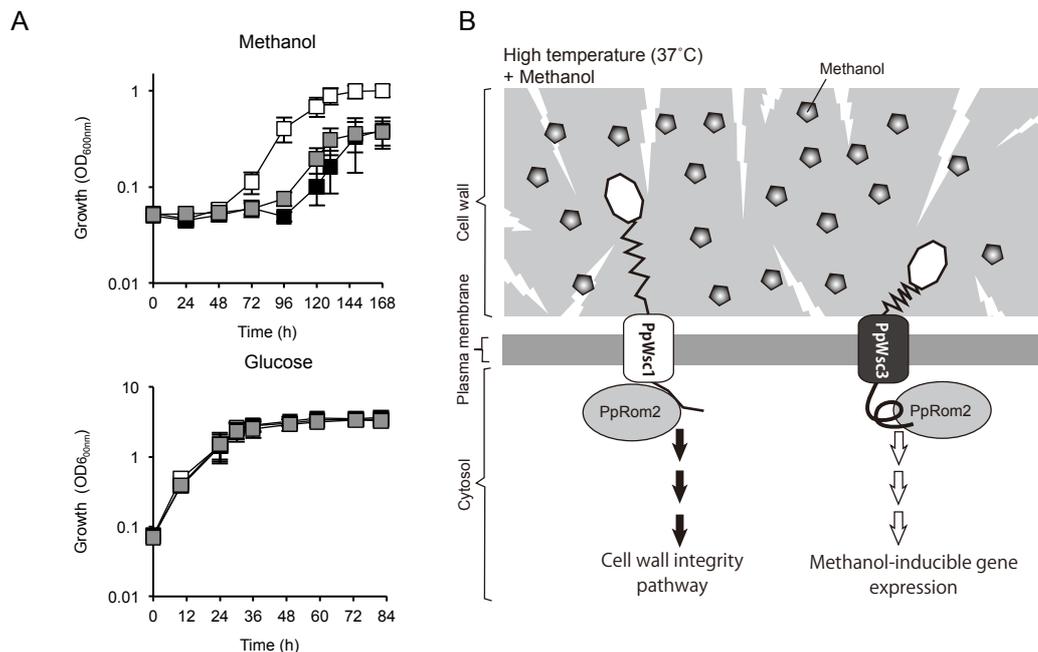


図 1-8. PpWsc1 /PpWsc3 の高温メタノール生育時の機能
 (A) 高温 (37°C) メタノール培地での生育。野生株 (□)、*Ppwsc1*Δ 株 (■)、*Ppwsc3*Δ 株 (■)
 (B) 高温メタノール生育時の PpWsc1 /PpWsc3 の機能モデル

激に対して、対応しなければならない。PpWsc1 は主に細胞表層ストレスへの対処に機能を示すと考えられる。その場合、PpWsc1 によるメタノール誘導性遺伝子発現に対する応答が不十分になるため、37°C においては PpWsc3 が主にメタノール誘導性遺伝子発現に対して重要な役割を示すと考えられる。PpWsc1 /PpWsc3 が協調的に 37°C でのメタノール生育時の細胞表層ストレス応答とメタノール誘導性遺伝子発現に対する独立して異なるシグナル伝達を行うモデルを図 1-8B に示した (考察参照)。

PpWsc1 /PpWsc3 の PpRom2 との遺伝的相互作用

次に、Wsc ファミリータンパク質の細胞表層ストレス応答経路に対する下流の因子である Rom2 が *P. pastoris* におけるメタノール誘導性遺伝子発現制御に関わるどうかについて調べた。Rom2 をコードすると予測される遺伝子を *P. pastoris* ゲノム上で同定し、*PpROM2* (CCA39932.1) とした。*Ppwsc1*Δ 株におけるメタノール生育遅延の表現型により、*PpROM2* と *PpWSC1* との間のメタノール生育時の遺伝子的相互作用をについて検討した。メタノール生育に遅延が見られる *Ppwsc1*Δ 株と野生株にそれぞれ PpRom2-3xHA を内在性のプロモーター支配下で発現させた。*Ppwsc1*Δ 株のメタノール生育時の遅延は

PpRom2-3xHA の発現により回復した (図 1-9A)。つまり、PpRom2 は *PpWSC1*Δ株のメタノールにおける生育遅延に関する表現型の 2 コピーによるマルチコピーサプレッサーであり、両者間における遺伝子の相互作用が確認された。先行研究において、*S. cerevisiae* の Wsc1 における Rom2 相互作用する領域が特定されている (Vay *et al.*, 2004)。この領域は PpWsc1 と PpWsc3 にも保存されている。*PpROM2* と *PpWSC1* との遺伝的相互作用を裏付けるために、Rom2 と ScWsc1 の相互作用領域に相当する領域の PpWsc1 と PpWsc3 変異体を作製した (図 1-1)。PpWsc-Rom2 結合領域 (PpWsc1 においては 310-316 のアミノ酸領域、PpWsc3 においては 359-365 のアミノ酸領域) を欠失した

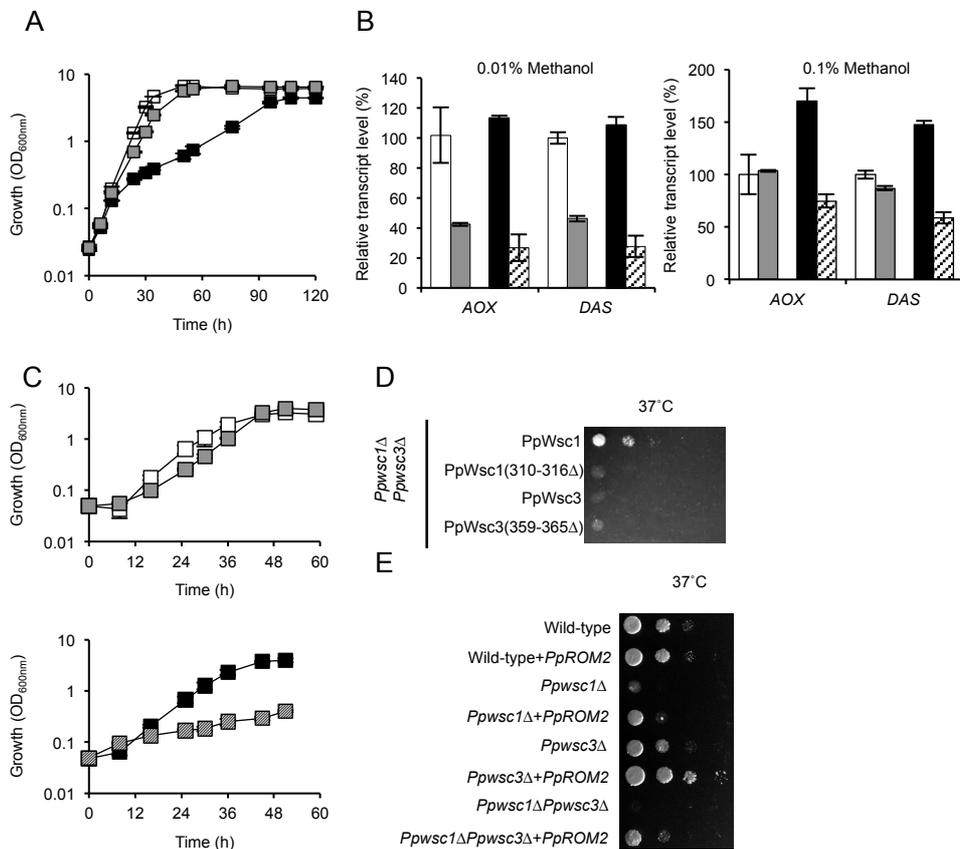


図 1-9. *PpWSC1* / *PpWSC3* と *PpROM2* とのメタノール誘導性遺伝子発現に対する遺伝的相互作用 (A) *PpROM2*-3xHA 発現株のメタノール生育。 *PpROM2*-3xHA を発現した野生株 (□)、 *PpROM2*-3xHA を *PpWSC1*Δ 株 (■)、 *PpWSC1*Δ 株 (■) (B) *PpWSC1* と *PpWSC3* の Rom2 結合領域削除変異体発現株のメタノール誘導性遺伝子発現レベル。 *PpWSC1*Δ *PpWSC3*Δ 株に次の各プラスミドを発現させた。 *PpWSC1*-3xHA (□)、 *PpWSC1*(310-316Δ)-3xHA (■)、 *PpWSC3*-3xHA (■)、 *PpWSC3*(359-365Δ)-3xHA (■) のメタノール誘導性遺伝子発現レベルの割合 (%)。 (C) *PpWSC1* と *PpWSC3* の Rom2 結合領域削除変異体発現株のメタノール生育。 *PpWSC1*-3xHA 発現株 (□)、 *PpWSC1*(310-316Δ)-3xHA 発現株 (■)、 *PpWSC3*-3xHA 発現株 (■)、 *PpWSC3*(359-365Δ)-3xHA 発現株 (■) (D) *PpWSC1* と *PpWSC3* の Rom2 結合領域削除変異体発現株の高温条件下での生育 (E) *PpROM2*-3xHA 発現株の高温条件下での生育

PpWsc1(310-316Δ)-3xHA もしくは、PpWsc3(359-365Δ)-3xHA を *PpWSC1ΔPpWSC3Δ*株に発現させた。タンパク質はこれらの変異体でも正常に発現していた (未掲載データ)。このドメイン欠損変異株のメタノール誘導性遺伝子発現への影響を解析した (図 1-9B)。0.01%のメタノールでは、PpWsc1(310-316Δ)-3xHA 発現株、PpWsc3(359-365Δ)-3xHA 発現株の *AOX* と *DAS* 転写量は野生型 PpWsc1 と PpWsc3 発現株に比べて低下した (図 1-9B 左)。0.1%メタノールでは、PpWsc3(359-365Δ)-3xHA 発現株で、野生型 PpWsc3 発現株に比べて低下した (図 1-9B 右)。この結果は、0.01%メタノールの感知には PpWsc1 と PpWsc3 が、0.1%メタノールの感知には PpWsc3 が重要であることを示している。図 1-9C が示すように、PpWsc1(310-316Δ)-3xHA 発現株と PpWsc3(359-365Δ)-3xHA 発現株はそれぞれの野生型 PpWsc1 と PpWsc3 発現株に比べ、生育遅延を示した。以上の結果、PpWsc1 /PpWsc3 と PpRom2 との相互作用がメタノール誘導性遺伝子発現制御に関与していることがわかった。

次に、グルコース培地での高温条件下での PpWsc1 もしくは PpWsc3 との PpRom2 の相互作用について解析した。*PpWSC1ΔPpWSC3Δ*株の高温感受性を *PpWSC1* 発現によって抑圧したが、PpWsc1(310-316Δ)-3xHA、PpWsc3 もしくは PpWsc3(359-365Δ) ではできなかった (図 1-9D)。PpRom2 の発現は *PpWSC1Δ*株の 37°C での生育阻害を部分的に、*PpWSC1ΔPpWSC3Δ*株の生育阻害をある程度抑圧した (図 1-9E)。これらの結果から、PpWsc1-PpRom2 の相互作用は *S. cerevisiae* と同様、*P. pastoris* の高温での生育に必要であることがわかった。

PpWsc1-YFP と PpWsc3-YFP の高温条件下もしくはメタノール誘導時における局在

PpWsc1 と PpWsc3 に黄色蛍光タンパク質 (YFP) を融合し、高温条件下での局在を観察した。28°C のグルコース培地で生育させた PpWsc1-YFP 発現細胞を 37°C のグルコース培地に移し、30 分間培養した。高温にシフト前には、PpWsc1-YFP は細胞表層、出芽部位、出芽のネック部分に局在していた (図 1-10)。37°C へのシフト後は、PpWsc1-YFP は細胞表層全体もしくは液胞に局在した。これら高温移行前と移行後での PpWsc1 の動

態は *S. cerevisiae* における ScWsc1 の動態と同様であった (Delley and Hall, 1999)。一方、PpWsc3-YFP は高温への移行前と移行後のどちらも細胞表層全体に分布していた。

PpWsc1-YFP と PpWsc3-YFP のメタノール培地へ移行時の局在を観

察した (図 1-10)。 PpWsc1-YFP も PpWsc3-YFP もグルコース培地からのメタノール培地への移行前、移行後で局在に変化は見られなかった。 PpWsc1 の高温条件下とメタノール存在下での局在の挙動の違いは、これら二つの条件下においてそれぞれ異なる機能をもつことを示唆している。

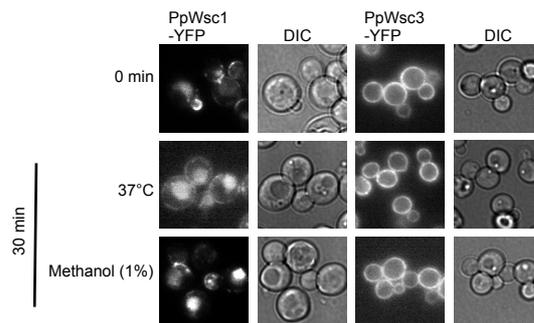


図 1-10. PpWsc1-YFPとPpWsc3-YFPの局在

考察

メタノールやエタノールといった低分子アルコールの細胞による感知に関する分子基盤の理解は薬理学や医薬、発酵技術などに新たな展開を広げる可能性がある。しかしながら、細胞外の低分子化合物をタンパク質がどのように感知、核内に情報を伝達するかといったことに関しては未解明であった。本章においては、ナノスプリング様の構造変化によって高温や低浸透圧ストレスに伴う細胞壁損傷を感知するセンサーとして知られる Wsc ファミリータンパク質がメタノール産化性酵母 *P. pastoris* においては生理的な濃度のメタノールの感知因子として働くことを明らかにした。

Wsc ファミリータンパク質は高温、低浸透圧、10%エタノールといった細胞表層へのストレスを感知するセンサーとして報告 (Jendretzki *et al.*, 2011) があるが、そのホモログである PpWsc1、PpWsc3 が低分子アルコールであるメタノールを 0.01-1% という低濃度で感知する新奇機能を明らかにした。また、PpWsc1 と PpWsc3 は 0.001-1.0% の範囲の濃度依存的なメタノール誘導性遺伝子発現に重要な役割を持つことも示した (図 1-3)。このメタノール濃度範囲はちょうど植物葉上に存在するメタノール濃度と一致する (Kawaguchi *et al.*, 2011)。さらに PpWsc1 はより低濃度 (0.01-0.05%) を、PpWsc3 はより高濃度 (0.1-0.5%) のメタノールへの応答に重要であった (図 1-4)。これらの結果から、PpWsc1 と PpWsc3 は同様の分子メカニズムでメタノールに応答するが、メタノールへの感受性が異なることを示している。また、濃度応答性の異なる二種類のメタノール感知因子によって *P. pastoris* 細胞は幅広いメタノール濃度範囲への応答が可能になると考えられる。さらに、PpWsc1 と PpWsc3 は細胞外のメタノール濃度の感知し、メタノール誘導性遺伝子を適正な発現レベルに調節するため細胞内のシグナル伝達因子である PpRom2 に伝達を介して核内に情報を伝えることもわかった (図 1-9)。この PpWsc1 と PpWsc3 のメタノール濃度に応じた転写制御はメタノール代謝のバランスを保ち、ホルムアルデヒドの異常な蓄積を防ぐ役割があると考えられる。実際、*PpwsclΔ* 株のメタノール生育において、培地中での異常なホルムアルデヒドの蓄積が観察されている (未掲載データ)。*PpwsclΔ* 株においてホルムアルデヒドが蓄積し始めるメタノール培養 18 時間の細胞を用いて、ホルムアルデヒド量のバランスに重要な AOX と FLD の酵素活性を

野生株と比較した (未掲載データ)。 *Ppwsc1Δ*株では野生株に比べ、AOX に対する FLD の比活性が 70%程度であった。このことは、 *Ppwsc1Δ*株において、バランスのとれていない AOX と FLD の活性がホルムアルデヒドの異常な蓄積を引き起こしていることを示唆している。*PpWsc3* が *PpWsc1* のある程度の機能を相補することができるが、*PpWsc1* 破壊がメタノール代謝のバランスを崩壊させ、ホルムアルデヒドの異常な蓄積を引き起こすことは、主に *PpWsc1* がメタノール生育時に重要であることを示している。

Wsc ファミリータンパク質は、様々な種類の刺激を感知することが知られているが、Wsc ファミリータンパク質がどのように特異的に刺激を感じ、特異的なシグナルを伝達するかについては大きな謎であった。*PpWsc* タンパク質は、高温ストレスとメタノールを異なる感知機構によって感知すると考えられる。その理由には、以下の 3 つが挙げられる。1 つ目に、もし同じ感知機構を持つのであればメタノール誘導性遺伝子発現は、高温ストレスによっても誘導されるはずである。しかし、メタノール誘導性遺伝子発現は、37°C においては、28°C より低下することがわかっている (未発表データ)。2 つ目に、*PpWsc3* はメタノール誘導性遺伝子発現に関与する一方で、細胞表層ストレス応答には関与しないことがあげられる。3 つ目に、 *PpWsc-YFP* の高温ストレス時や、メタノール生育時の局在の違いがあげられる。通常生育温度においては、*PpWsc1-YFP* は出芽部位や出芽のネック部分に局在する。しかしながら、高温条件下では、*PpWsc1-YFP* の蛍光は細胞表層全体に局在した。この高温条件下における *PpWsc1* の局在変化は *S. cerevisiae* での高温ストレス条件下の局在変化と同様であった。一方、メタノール培地シフト時には、*PpWsc1-YFP* の局在は変化しなかった。高温ストレス応答に関与しない *PpWsc3* は細胞表層ストレス条件下に関わらず、試験した条件では常に細胞表層全体に局在した (図 1-10)。これらの局在解析は、高温ストレスによる細胞表層ストレスとメタノールを異なる刺激として感じていることを示唆している。

部位特異的変異体の解析から細胞表層ストレスとメタノールの感知のどちらか一方のみ障害を与える *PpWsc1* の変異体の取得により、*PpWsc1* は細胞表層ストレスとメタノールの感知時において異なる立体構造変化をとることが考えられる。つまり、*PpWsc1* Y53A 変異体はメタノール感知時の構造はとれず、細胞表層ストレス時の構造をとるこ

とができる。一方、PpWsc1 Y53F 変異体は高温ストレス応答時の構造はとれるが、メタノール感知時の構造はとることができない。これら、PpWsc タンパク質の細胞外の構造の違いが、細胞質側の PpRom2 との結合を伴う立体構造変化の違いを生み、それぞれ独立して異なるシグナル伝達経路にシグナルを伝達すると考えられる。しかし、その詳細な機構については、さらなる解析が必要である。

高温条件下におけるメタノール生育時には、PpWsc1 と PpWsc3 はどのように働くのであろうか。PpWSC3 Δ 株は 28°C のメタノール培養時の生育の影響を与えなかったが、37°C のメタノール培地時の生育が遅延した。また、出芽酵母における研究 (Rodicio and Heinisch, 2010) と異なり、PpWSC3 の過剰発現は、PpWSC1 Δ PpWSC3 Δ 株の高温条件下における生育遅延を相補できない (図 1-5B) ため、PpWsc3 は高温ストレス応答には機能せず、主にメタノールの感知に機能する。そのため、この条件下では、PpWsc1 は高温ストレス時の構造をとり、高温ストレス応答に機能し、PpWsc3 が主にメタノール誘導性遺伝子発現制御に重要な機能をもつのではないかと考えている (図 1-8)。

本章においては、Wsc ファミリータンパク質にメタノールと細胞表層ストレスという細胞外の刺激を区別して感知するという新しい分子機能を明らかにした。さらに、真核生物に広く保存された Wsc ファミリータンパク質による低分子アルコール感知因子としての新奇機能を明らかにした。

第二章

エタノールによるメタノール誘導性遺伝子発現の抑制制御機構

メタノール資化性酵母のメタノール誘導性遺伝子発現は、メタノールによって誘導されるが、エタノールによっては誘導されない (Hartner and Glieder, 2006; Yurimoto and Sakai, 2009)。さらに、メタノールが存在していても、エタノールが存在すると抑制される (エタノール抑制)。また、オートファジーによるペルオキシソームの分解機構であるペキソファジーはエタノールによって誘導されるが、メタノールによっては誘導されない (Tuttle *et al.*, 1993)。このことは、メタノール資化性酵母はメタノールとエタノールを明確に区別して細胞応答することを示している。一方、メタノール資化性酵母においてメタノール代謝の初発反応を触媒するアルコールオキシダーゼは、メタノールのみならず、エタノールも基質として酸化することができ、タンパク質自身はメタノールとエタノールを区別することができない (Koch *et al.*, 2016)。したがってメタノール資化性酵母細胞やメタノールを感知している PpWsc1 などのタンパク質分子が、どのようにメタノールとエタノールを区別しているかについての詳細な分子機構を明らかにすることは、巨大なタンパク質あるいは細胞がどのようにメチル基しか違いのない2つの低分子アルコールを認識、区別しているのかという細胞生物学・生化学上の大きな問題を解くことにもつながる。

本章ではメタノール誘導性遺伝子発現におけるエタノール抑制の分子機構の解明を目的とした。まず、メタノール誘導性遺伝子発現のエタノール抑制不能株のスクリーニングを行い、エタノールからアセチル CoA への代謝に関わる酵素遺伝子がエタノール抑制に必要なことを見いだした。また、エタノール抑制不能株でも、エタノールによるメタノール誘導性遺伝子発現が見られなかったことから、PpWsc1 /PpWsc3 はエタノールを感知せず、メタノールを特異的に感知していることが明らかとなった。

材料および方法

使用菌株、培地、培養条件

Escherichia coli DH10B (Takara, 大津) をプラスミド調整に用いた。*E. coli* の培養には LB 培地 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) を用いた。

使用した酵母菌株は表 2-1 に示した。*P. pastoris* の培養には YPD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) あるいは YNB 培地 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids)。YNB 培地には以下のいずれかの炭素源を加えた。2% (wt/vol) glucose、2% (vol/vol) glycerol、1% (vol/vol) methanol、1% (vol/vol) ethanol、エタノール・メタノール共存培地では 0.5% methanol と 0.5% ethanol。アミノ酸 (100 µg/ml) を必要に応じて、YNB 培地に加えた。生育度は 600nm の吸光度 (OD_{600nm}) によって測定した。

プラスミドの構築と遺伝子破壊

使用したオリゴヌクレオチドプライマーの配列は表 2-2 に示した。プラスミドは表 2-3 に示した。*PpADH2* の遺伝子破壊用プラスミドは以下のように作製した。PpADH2-1-F/PpADH2-1-R と PpADH2-2-F/PpADH2-2-R をゲノム DNA を鋳型に増幅し、PpAHD2-Zeo-F/PpADH2-Zeo-R を SK+Zeo^r を鋳型に増幅し、得られた 3 つの断片を PpADH2-1-F/PpADH2-2-R の組み合わせのプライマーによってオーバーラップ PCR によって増幅した。この断片を TOPO TA cloning キット (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) の pCR2.1 にクローニング、pSN100 を得た。同様に、*PpALD4*、*PpACS1* のそれぞれの遺伝子破壊ベクターも構築した。EcoRI-PpWSC2-1-F/KpnI-PpWSC2-1-R と BamHI-PpWSC2-2-F/EcoRI-PpWSC2-2-R の組み合わせのプライマーを用いて *PpWSC2* 遺伝子破壊ベクター-pOH102 を得た。PpALD4-1-F/PpALD4-R と PpALD4-2-F/PpALD4-2-R と PpALD4-Zeo-F/PpALD4-Zeo-R の組み合わせのプライマーを用いて *PpALD4* 遺伝子破壊ベクター-pSN200 を得た。PpACS1-1-F/PpACS1-1-R と PpACS1-2-F/PpACS1-2-R と PpACS1-Zeo-F/PpACS1-Zeo-R の組み合わせのプライマーを用いて *PpACS1* 遺伝子破壊ベクター-pSN201 を得た。

KpnI-PpACS1-F/ SphI-PpACS1-R の組み合わせのプライマーでゲノム DNA を鋳型に増

幅した断片を KpnI/SphI で処理し、pSY004 に挿入した。これにより pSN400 を得た。pOH202、pOH203、pOH204 を得た。pOH202 を KpnI/SphI で処理し、得られた 1.9-kb の *P_{ACT1}-PpWSC1* 断片を pNT205 (Tamura *et al.*, 2010) に挿入し、pOH303 を得た。

PpADH2、*PpALD4*、*PpACS1* 遺伝子破壊株を作製するためにそれぞれの遺伝子破壊株である pSN100、pOH200、pOH201 をそれぞれ SacI/XhoI、BamHI/SpeI、BamHI/XhoI によって処理し、エレクトロポレーション法によって形質転換した。

エタノール抑制不能変異株のスクリーニング

変異株の取得と変異点の特定には、pREMI-Z をランダムにゲノムに挿入するジーンタギング法を用いた (Mukaiyama *et al.*, 2002)。pREMI-Z を BamHI で処理し、YSP1 株にエレクトロポレーション法によって形質転換した。得られた形質転換体コロニーをエタノール・メタノール共存寒天培地上に植菌し、LED illuminator FAS-Digi (ニッポンジーオン, 東京) によって、GFP を励起し、蛍光が観察されたコロニーをエタノール抑制不能変異株として取得した。この変異株よりゲノムを抽出し、EcoRI で処理し、セルフライゲーションさせ、大腸菌に形質転換した。得られたプラスミドを鋳型に FW-SEQ と RV-SEQ をプライマーにシークエンスを行い、ゲノム上変異挿入点を特定した。

蛍光顕微鏡による形態観察

P. pastoris を 5 ml の YPD 培地 28°C で定常期になるまで生育させ、その培養液 30 µl を新たな 5 ml の SD 培地に植菌し、28°C で 12 時間振盪培養した。この培養液を 1,500 rpm 5 分間の遠心分離によって集菌し、この細胞を 5 ml の様々な炭素源の培地に移し、それぞれ 28°C で振盪培養した。これらの細胞を遠心分離によって集菌し、IX81 蛍光顕微鏡 (Olympus, 東京) で観察した。蛍光画像は charged coupled device (CCD) camera (SenSys; PhotoMetrics, Tucson, AZ) で撮影し、MetaMorph software (Universal Imaging, West Chester, PA) を用いて解析した。

RNA 抽出と定量 PCR

シングルコロニーを YPD 培地に植菌し、一晚培養した。その酵母菌体をグルコース培地に OD_{600nm} が 0.1 になるように植菌し、対数期になるまで培養した。それを様々な炭素源の培地に OD_{600nm} が 1.0 になるように植菌し、2 時間 28°C で振盪培養した。これらの細胞を 4°C、1 分間 10,000 x g で遠心分離によって集菌した。RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて細胞から total RNA を抽出した。細胞を RLT buffer (QIAGEN, Hilden, Germany) で懸濁し、Multi-Beads Shocker によって細胞破碎した。ゲノム DNA の混入を防ぐために、total RNA を DNase I (RNase-Free DNase Set, QIAGEN, Hilden, Germany) によって処理した。抽出、精製した 1 µg の total RNA を Random Primer (Promega, Fitchburg, WI) と ReverTra Ace (Toyobo, 大阪) を用いて逆転写を行った。ネガティブコントロールとして ReverTra Ace を含まない反応液を逆転写した。

定量 PCR (qRT-PCR) は Light Cycler Instrument (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いた。PCR 反応には SYBR Premix Ex Taq (Takara) と表 2-3 に示したプライマー *GAP1*、*AOX1*、*DAS1*、*FLD1*、*FDH1* を用いた。解析、定量には Light Cycler software Version 4.1 を用いた。

表 2-1. 本章で使用した酵母菌株

Strain	Genotype	Reference
YSP1	<i>arg4</i>	Wiemer <i>et al.</i> (1996)
SN1001	YSP1, <i>Ppadh2Δ::Zeo^r</i>	This study
SN1002	YSP1, <i>Ppald4Δ::Zeo^r</i>	This study
SN1003	YSP1, <i>Ppacs1Δ::Zeo^r</i>	This study
SN1100	YSP1, <i>arg4::ARG4</i>	This study
SN1101	SN1001, <i>arg4::ARG4</i>	This study
SN1102	SN1002, <i>arg4::ARG4</i>	This study
SN1103	SN1003, <i>arg4::ARG4</i>	This study
SN1500	PPY12, <i>his4::(P_{ACSI}PpACSI-CFP)</i>	This study
SN1500	PPY12, <i>his4::(P_{ACSI}PpACSI-CFP), arg4::ARG4</i>	This study

表 2-2. 本章で使用したオリゴヌクレオチドプライマー

Designation	DNA Sequence
PpADH2-1-F	5'-CCCGAGCTCCAAATTGCACGACCAGAGTG-3'
PpADH2-1-R	5'-TTTGAAGCTATGGTGTGTGGGCAATAGGCAGGGTGAAAGGA-3'
PpAHD2-Zeo-F	5'-TCCTTTCACCCTGCCTATTGCCACACACCATAGCTTCAAA -3'
PpADH2-Zeo-R	5'-CCACAACGGTTTGATCACAGAGCTTGCAAATTAAGCCTTCG -3'
PpADH2-2-F	5'-CGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTCTGTGATCAAACCGTTGTGG-3'
PpADH2-2-R	5'-CCGCTCGAGATGGTACCCAGGCAAAGAGA-3'
PpALD4-1-F	5'-CGGGATCCTGTCAGTTCAGACCAGCAG-3'
PpALD4-R	5'-TTTGAAGCTATGGTGTGTGGGTTGGGCAAGGAAAAATCAAG-3'
PpALD4-Zeo-F	5'-CTTGATTTTTCTTGGCCCAACCCACACACCATAGCTTCAAA -3'
PpALD4-Zeo-R	5'-TCGTTGTAGGTGTTGACCCAAGCTTGCAAATTAAGCCTTCG -3'
PpALD4-2-F	5'-CGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTTGGGTCAACACCTACAACGA-3'
PpALD4-2-R	5'-GACTAGTTCCTCGTCCTCGACAAAGTT-3'
PpACS1-1-F	5'-AACTGCAGGCTCAGCGTTATGTTGGTT-3'
PpACS1-1-R	5'-TTTGAAGCTATGGTGTGTGGGACGAGCGTCAGTGAAAGGAG-3'
PpACS1-Zeo-F	5'-CTCCTTTCCTGACGCTCGTCCACACACCATAGCTTCAAA -3'
PpACS1-Zeo-R	5'-ATGGTCCAATCTCTTTTCTGACAAGCTTGCAAATTAAGCCTTCG -3'
PpACS1-2-F	5'-CGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTTGTGAGAAAAGAGATTGGACCAT-3'
PpACS1-2-R	5'-GACTAGTCAAAAACCTTTTGTATCATACTGTGG-3'
KpnI-PpACS1-F	5'-GGGGTACCCAGCAAAATCATCTGGCTCA-3'
SphI-PpACS1-R	5'-ACATGCATGCTTTGCGGGCATCCCTTTTAA-3'
RT-AOX1-F	5'-AGGGCTTCTGAGTCCCAAGG-3'
RT-AOX1-R	5'-AGCAGAGTCGGAACGACGAC-3'
RT-DAS1-F	5'-TTGCGTATGGCTGCTCTTCA-3'
RT-DAS1-R	5'-GGGTTGGACCATCTTCACCA-3'
RT-FLD1-F	5'-CACGCTTCTGGTGCAGATG-3'
RT-FLD1-R	5'-ATCCCCAACCTTCACGGACT-3'
RT-FDH1-F	5'-GCACATTCCTGACGCTGATG-3'
RT-FDH1-R	5'-GACACCAGCAACGACCAACA-3'
RT-ACT1-F	5'-TCCGTATGGATCGGTGGTTC-3'
RT-ACT1-R	5'-TTGAGGTGCACAATGGATGG-3'
RT-GAP1-F	5'-CCACCGGTGTTTTACCACT-3'
RT-GAP1-R	5'-CACCGACAACGAACATTGGA-3'
FW-SEQ	5'-GTGGAACGAAAACCTCACGTAAAGGGAT-3'
RV-SEQ	5'-GAGTAAAAAAGGAGTACAAACATTTTGAAGCTATGGTG -3'

表 2-3. 本章で使用したプラスミド

Designation	Description	Reference
pSN100	$\Delta Ppadh2::Zeo^r$	This study
pSN200	$\Delta Ppald4::Zeo^r$	This study
pSN201	$\Delta Ppacs1::Zeo^r$	This study
pSN400	$P_{PpACSI}PpACSI-CFP HIS4$	This study
pNT204	pIB1 <i>ARG4</i>	Tamura <i>et al.</i> (2010)
pSY004	pIB1 <i>CFP HIS4</i>	Yamashita <i>et al.</i> (2009)
SK+Zeo ^r	<i>Zeo^r</i>	Yano <i>et al.</i> (2009)
pREMI-Z	<i>Zeo^r</i>	Mukaiyama <i>et al.</i> (2002)

結果

エタノール抑制不能変異株の取得

エタノール抑制不能変異株を取得するために、親株としてメタノール誘導性プロモーターである *AOX1* プロモーターの支配下にペルオキシソーム輸送シグナルを付加した GFP (GFP-SKL) を発現する YSP1 株を用いた (Sakai *et al.*, 1998a)。この株の GFP 蛍光を観察することで、メタノール誘導性遺伝子発現とそれによるペルオキシソームの発達を簡単に評価できる。また、メタノール誘導性遺伝子発現は非常に強力であるため、コロニーに GFP の励起波長を含む光を直接照射すると、コロニーの蛍光として遺伝子発現を確認することができる。従来のメタノール誘導性遺伝子発現の評価方法は、細胞を破砕して酵素活性を測定する方法や、プレート上のコロニーを試薬で処理し、その呈色反応によって確認する方法であるため、経時的に観察することができなかった。しかし、今回開発したメタノール誘導性遺伝子発現のアッセイ系では、直接、コロニーの提示する GFP 蛍光を追跡することができるため、細胞破砕などの操作を必要とせず、リアルタイムでのメタノール誘導性遺伝子発現の評価が可能である。

次に、染色体上にランダムに挿入することにより欠失変異体を誘導することのできるプラスミドベクター pREMI-Z の形質転換体コロニーをメタノールとエタノールの共存下で培養し、GFP 蛍光を発する変異株をエタノール抑制不能変異株として取得した (図 2-1)。取得したエタノール抑制不能変異株 2 株について、ゲノム上の pREMI-Z 挿入座位を同定したところ、*PpADH2* (PAS_chr2-1_0472) と *PpALD4* (PAS_chr2-1_0853) に、プラスミド挿入されていることがわかった。

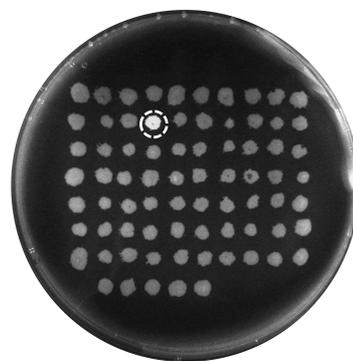


図 2-1. エタノール抑制不能変異株のスクリーニング
エタノール・メタノール共存寒天培地上で、GFP 蛍光が観察されるコロニー (破線円内) をエタノール抑制不能変異株として取得した。

エタノール代謝関連遺伝子 *PpADH2*、*PpALD4*、*PpACS1* はエタノール抑制に関与する

PpADH2 と *PpALD4* 遺伝子破壊株 (*Ppadh2Δ*, *Ppald4Δ*) を作製し、エタノール・メタノール共存培地での GFP 蛍光を蛍光顕微鏡によって観察した。エタノール・メタノール共存培地において、野生株ではエタノール抑制により、GFP 蛍光は観察されなかったが、*Ppadh2Δ*株と *Ppald4Δ*株では、ともに GFP 蛍光が観察された (図 2-2A)。このことから、PpAdh2 と PpAld4 がエタノール抑制に関与することが明らかになった。PpAdh2 と PpAld4 は *P. pastoris* におけるエタノール代謝において、それぞれエタノールからアセトアルデヒド、アセトアルデヒドから酢酸への変換を担うアルコールデヒドロゲナーゼ、アセトアルデヒドデヒドロゲナーゼである。

さらにエタノール代謝において酢酸からアセチル CoA への変換を担うアセチル CoA シンターゼ (ACS) と予測される *PpACS1* (PAS_chr2-1_0767) にも着目した。*PpACS1* 破壊株 (*Ppacs1Δ*) を作製し、グルコース培地で培養後、エタノール・メタノール共存培地での GFP 蛍光を観察したところ、一部の細胞において蛍光が観察された (図 2-2A)。

出芽酵母 *S. cerevisiae* においては、ACS をコードする 2 つの遺伝子 *ScACS1* と *ScACS2* が同定されており、それぞれエタノールとグルコースによって転写が誘導され (Kratzer and Schuller, 1995)、培養炭素源によりアセチル CoA 合成に寄与する ACS の異なることが知られている。そこで、前培養をグルコース培地からエタノール培地に変更し、エタノール・メタノール共存培地での GFP 蛍光を観察したところ、*Ppacs1Δ*株においては多くの細胞で GFP 蛍光が観察された

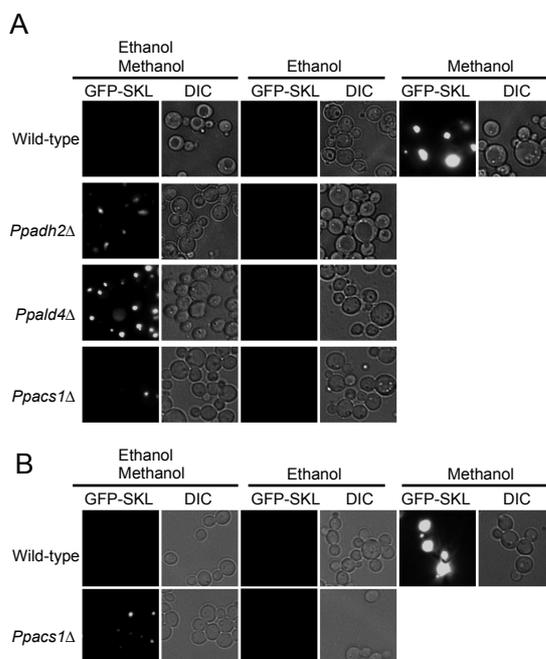


図 2-2. GFP-SKL発現酵母細胞を用いたメタノール誘導性遺伝子発現評価 (A) グルコース前培養 (B) エタノール前培養

(図 2-2B)。このことから、エタノール培地でアセチル CoA の合成に機能すると考えられる PpAcs1 が、エタノール抑制にも必要であることが明らかとなった。以上の結果より、エタノールをアセチル CoA へと代謝する酵素 PpAdh2、PpAld4、PpAcs1 がエタノール抑制に関与することがわかった。

***PpADH2*、*PpALD4*、*PpACS1* は様々なメタノール代謝関連酵素遺伝子のエタノール抑制に関与する**

PpAdh2、PpAld4、PpAcs1 が *AOX1* 以外のメタノール代謝関連遺伝子 *DAS1*、*FLD1*、*FDH1* のメタノール誘導性遺伝子発現のエタノール抑制にも関わっているかについて、qRT-PCR によって解析した。*Ppadh2*Δ株、*Ppald4*Δ株をグルコース培地で前培養した細胞、もしくは、*Ppacs1*Δ株をグルコース培地とエタノール培地のそれぞれで前培養した細胞をエタノール・メタノール共存培地にシフトし、2 時間後の細胞を用いて RNA を抽出し、qRT-PCR 解析に供した。その結果、*Ppadh2*Δ株、*Ppald4*Δ株において、試験したすべてのメタノール誘導性遺伝子の転写レベルは野生株より高くなっていた (図 2-3A)。*Ppacs1*Δ株では、グルコース培地で前培養した場合、野生株に比べ、転写レベルが増加したが、エタノール培地で前培養した *Ppacs1*Δ株の細胞の方が、転写レベルはさらに増加していた (図 2-3B)。以上の結果から、*PpADH2*、*PpALD4*、*PpACS1* は複数のメタノール代謝関連酵素のエタノール抑制に関与することがわかった。

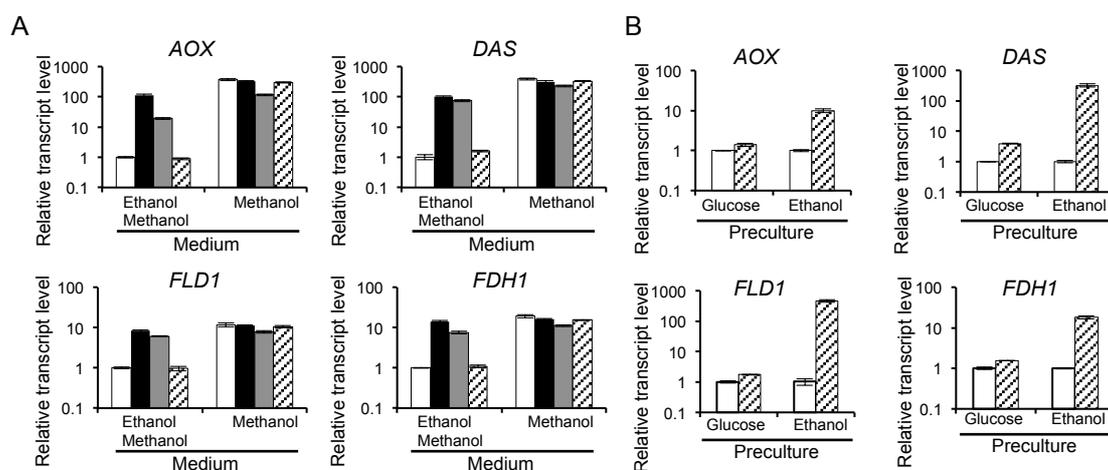


図 2-3. PpAdh2、PpAld4、PpAcs1はメタノール代謝関連酵素遺伝子のエタノール抑制に関与する (A) 野生株 (□)、*Ppadh2*Δ株 (■)、*Ppald4*Δ株 (■)、*Ppacs1*Δ株 (▨) のメタノール誘導性遺伝子発現レベル (B) 前培養の炭素源による野生株 (□)、*Ppacs1*Δ株 (▨) のメタノール誘導性遺伝子発現レベルに与える影響

エタノール代謝産物によるメタノール誘導性遺伝子発現の抑制

これまでの結果は、エタノールのアセチル CoA への代謝がメタノール誘導性遺伝子発現におけるエタノール抑制に必要なことを示している。これを検証するために、野生株のメタノール培養時にアセトアルデヒドもしくは酢酸として酢酸塩を添加したところ、GFP 蛍光が観察されなかったことから、エタノール代謝産物であるアセトアルデヒドと酢酸はメタノール誘導性遺伝子発現を抑制することが明らかとなった (図 2-4A)。

さらに、*Ppadh2Δ*株、*Ppald4Δ*株、*Ppacs1Δ*株の各遺伝子破壊株をメタノール培地で培養時に、アセトアルデヒドまたは酢酸を添加した後、それぞれの GFP 蛍光を観察した。その結果、*Ppadh2Δ*株においては、エタノール添加時には GFP 蛍光は観察されたが、アセトアルデヒド・酢酸の添加時には GFP 蛍光は観察されなかった。*Ppald4Δ*株においては、エタノール・アセトアルデヒド添加時には、GFP 蛍光が観察されたが、酢酸添加時には GFP 蛍光は観察されなかった。エタノール培地で前培養してからメタノール培地で培養した *Ppacs1Δ*株においては、アセトアルデヒドと酢酸の添加時においても、GFP 蛍光が観察された。さらに、*Ppacs1Δ*株におけるエタノール、アセトアルデヒド、酢酸のメタノール培地への添加時におけるメタノール代謝関連酵素遺伝子の転写レベル

を測定したところ、どの培地においても野生株に比べ転写レベルが増加していた (図 2-5)。

以上の結果から、エタノール抑制には、エタノール自身ではなくエタノールのアセチル CoA への代謝が必要であることが明らかとなった (図 2-6B)。

PpAcs1 の C 末端に CFP を融合し、その局在を蛍光顕微鏡によって観察したところ *PpAcs1* は細胞質に拡散していた (図 2-6A)。このことから、エ

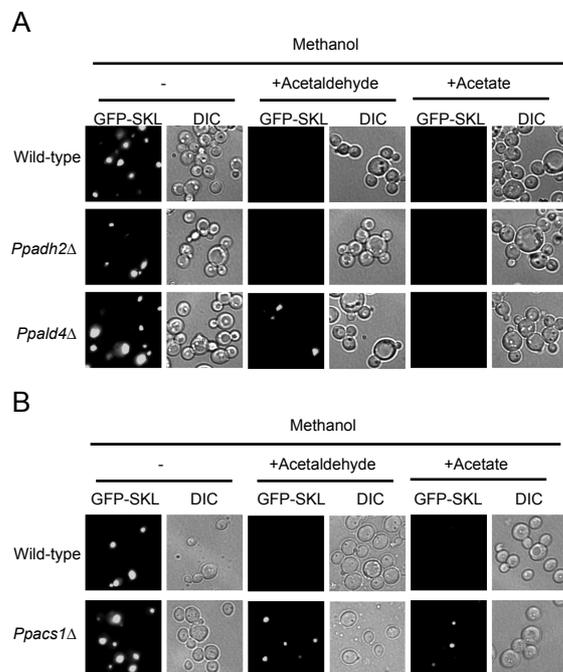


図 2-4. エタノール代謝酵素遺伝子破壊株におけるエタノール代謝産物によるメタノール誘導性遺伝子発現の抑制 (A) グルコース前培養 (B) エタノール前培養

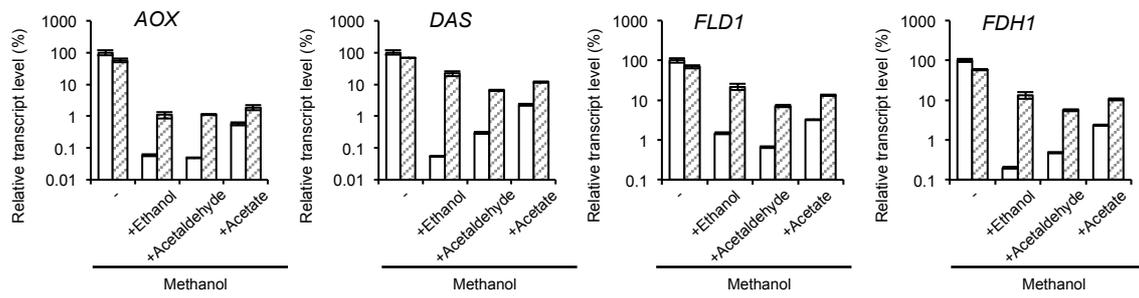


図 2-5. エタノールとその代謝産物によるメタノール誘導性遺伝子発現の抑制
野生株 (□)、*Ppacs1*Δ株 (▨)

タノール代謝によって合成されるアセチルCoAは細胞質中で生じることが示唆された。

考察

本章では、エタノールによるメタノール誘導性遺伝子発現の抑制には、エタノール自身ではなく、エタノールからアセチル CoA に代謝変換されることが必要であることがわかった。局在解析から PpAcs1 は細胞質に拡散して存在することため (図 2-6A)、エタノール代謝によって合成されるアセチル CoA は細胞質中に生じることが示唆された。

細胞質中のアセチル CoA は核と単純な拡散により自由に行き来できるが、この核および細胞質のアセチル CoA が転写や細胞応答に影響を与えることが報告されている (Pietrocola *et al.*, 2015)。そのため、エタノール代謝によって細胞質と核内のアセチル CoA 濃度が高くなることで、メタノール誘導性遺伝子発現の制御に関わる因子の活性を制御することが考えられる。その一つとして、アセチル CoA はアセチル基の供与体であることからタンパク質のアセチル化が挙げられる。核内には多くのアセチル化酵素が存在しており、アセチル CoA のアセチル化酵素非依存的なアセチル化も知られているため、核内アセチル CoA の増加により、様々なタンパク質のアセチル化修飾が引き起こされると考える。アセチル化されるタンパク質の候補としては、転写誘導に関わるヒストンやメタノール誘導性遺伝子発現制御に関わる転写制御因子が考えられる。メタノール誘導性遺伝子発現に関わる重要な転写因子である Mxr1 はエタノール培養時にはリン酸化によって不活化され、メタノール培養時には脱リン酸化により活性化される (Lin-Cereghino *et al.*, 2006)。このように、メタノールとエタノールの違いが Mxr1 の活性に反映され、メタノール誘導性遺伝子発現を制御できることから、アセチル化による Mxr1 の活性制御がエタノール抑制に関与しているのかもしれない。

図 2-3A が示すように、*Ppadh2*Δ株、*Ppald4*Δ株においてはエタノール抑制不能となるものの、これら破壊株のエタノール・メタノール共存培養時の発現レベルは、メタノールだけの培地での発現レベルより低い。このことは、*Ppadh2*Δ株、*Ppald4*Δ株においてエタノール抑制が不完全であることを示している。実際、*Ppadh2*Δ株、*Ppald4*Δ株、*Ppacs1*Δ株はエタノールでの生育遅延を示すものの生育不能とはならないことから(未発表データ)、これらの破壊株では、エタノール代謝が完全に欠損せず、他の酵素や経路により少量のアセチル CoA が生じているのかもしれない。

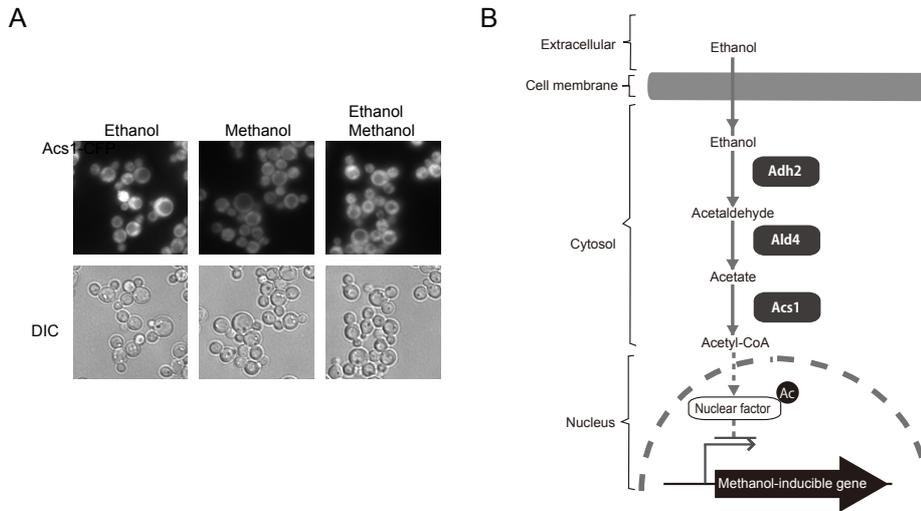


図 2-6. PpAcs1が核内因子のアセチル化修飾によるメタノール誘導性遺伝子発現におけるエタノール抑制を制御しているモデル
 (A) PpAcs1-CFPの局在 (B) エタノールによるメタノール誘導性遺伝子発現の抑制モデル。
 Ac: アセチル化

本研究では、エタノール抑制不能変異株のスクリーニングによって、エタノール抑制不能となる株の取得に成功した。そのエタノール抑制不能変異株においてもエタノール培養時にメタノール誘導性遺伝子発現が全く観察されなかった (図 2-2)。このことは、第一章で同定されたメタノール感知因子 PpWsc1 /PpWsc3 がエタノールとメタノールをどちらも低分子アルコール分子として感知しているのではなく、エタノールに感知せず、メタノールを特異的に感知していることを示している。

第三章

メタノール感知が制御するペキシファジーの抑制制御機構

オートファジーは、真核生物において保存されたタンパク質・オルガネラ分解機構の1つであり、液胞（哺乳細胞ではリソソーム）に分解標的を輸送する過程を中心とする。オートファジーには非選択的な経路と選択的な経路がある。非選択的なオートファジーは、窒素飢餓条件で誘導され、タンパク質分解により生じたアミノ酸の再利用に貢献していることが知られている (Takeshige *et al.*, 1992)。一方、選択的なオートファジーはペルオキシソームやミトコンドリア等のオルガネラ、および細胞内凝集体を特異的に分解する機構として知られる。オートファジーによるオルガネラ分解は、機能不全となったオルガネラの除去や、細胞内外の環境変動に応じたオルガネラの大きさや数の制御を担うことから、オルガネラ機能の恒常性維持に重要である (Zaffagnini and Martens, 2016)。

これまでに非選択的なオートファジーについては、その誘導や抑制について、多くの研究がなされてきた (Meijer and Codogno, 2006)。選択的なオートファジーにおいても、その誘導条件や、誘導に関わる因子・シグナル伝達経路については解明が進んでいる (Suzuki, 2013)。一方、非誘導条件において選択的なオートファジーを抑制する機構についての分子レベルの解析例はほとんど報告されていない。

メタノール資化性酵母において、メタノール培養時に強力に発現誘導された酵素群の多くは代謝の主要な場であるペルオキシソームに輸送されるため、本オルガネラは大きく発達する。一方、生育炭素源をメタノール以外に変換するとペルオキシソームはオートファジーによる選択的な分解、すなわちペキシファジーにより分解される。このようなペルオキシソーム発達・分解のバランスを精緻に制御するメカニズムとして、PpWsc1によるメタノール感知が、前章までに示した代謝酵素群の発現誘導調節だけでなく、オルガネラ動態の調節にも機能する、という仮説をたてた。そこでこの仮説を検証するために、PpWsc1 および本タンパク質を開始点とするシグナル伝達経路と、ペキシファジー誘導を支える分子機構との連関を調べた。

ペキシファジーの誘導には、ペルオキシソーム膜上タンパク質のレセプタータンパク

質である PpAtg30 のリン酸化が必要であることがわかっている (Farre *et al.*, 2008)。本章では、メタノール感知因子 PpWsc1 が PpAtg30 のリン酸化抑制を介して、ペキシファジンを抑制していることを明らかにした。

材料および方法

使用菌株、培地、培養条件

Escherichia coli DH10B (Takara, 大津) をプラスミド調整に用いた。*E. coli* の培養には LB 培地 (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.5% NaCl) を用いた。

使用した酵母菌株は表 3-1 に示した。*P. pastoris* の培養には YPD 培地 (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) あるいは YNB 培地 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids)。YNB 培地には以下のいずれかの炭素源を加えた。2% (wt/vol) glucose、2% (vol/vol) glycerol、1% (vol/vol) methanol、1% (vol/vol) ethanol。アミノ酸 (100 µg/ml) を必要に応じて、YNB 培地に加えた。生育度は 600nm の吸光度 (OD_{600nm}) によって測定した。

プラスミドの構築と遺伝子破壊

使用したオリゴヌクレオチドプライマーの配列は表 3-2 に示した。プラスミドは表 3-3 に示した。*PpATG11* の遺伝子破壊用プラスミドは以下のように作製した。

EcoRI-PpATG11-1-F/ PpATG11-1-R と PpATG11-2-F/BamHI-PpATG11-2-R の組み合わせのプライマーによってゲノム DNA を鋳型に増幅し、PpATG11-BSD-F/PpATG11-BSD-R の組み合わせのプライマーで pPIC6A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を鋳型に増幅し、得られた 3つの断片を EcoRI-PpATG11-1-F/ BamHI-PpATG11-2-R の組み合わせのプライマーによってオーバーラップ PCR によって増幅した。この断片を EcoRI/BamHI を処理して pUC19 (Takara, 大津) にクローニングし、pIS100 を得た。*PpATG30* の遺伝子破壊用プラスミドは以下のように作製した。HindIII-PpATG30-1F/ PpATG30-1R と PpATG30-2F/ PstI-PpATG30-2R の組み合わせのプライマーによってゲノム DNA を鋳型に増幅し、PpATG30-BSD-F/PpATG30-BSD-R の組み合わせのプライマーによって、Zeocin 耐性遺伝子をマーカーとして用いる場合は SK-Zeo^r、Blasticidin 耐性遺伝子を用いる場合は、pPIC6A を鋳型に増幅し、得られたそれぞれの 3つの断片を HindIII-PpATG30-1F/ PstI-PpATG30-2R の組み合わせのプライマーによってオーバーラップ PCR によって増幅した。この断片を KpnI/PstI を処理して pIB1 (Sears *et al.*, 1998) に

クローニングし、pOH104 と pOH105 を得た。*PpMPK1* 遺伝子破壊ベクターは以下のよう
に作製した。NotI-PpMPK1-1-F/KpnI-PpMPK1-1-R と SacI-PpMPK1-2-F/
NotI-PpMPK1-2-R の組み合わせのプライマーによってゲノム DNA を鋳型に増幅した。
これら 2 つの断片を KpnI-PpMPK1-1-R/SacI-PpMPK1-2-F の組み合わせのプライマーに
よってオーバーラップ PCR した。この断片を KpnI/SacI し SK-Zeo^r にライゲーションに
し、*PpMPK1* 遺伝子破壊ベクター pIS101 を得た。同様に *PpRLM1*、*PpSWI4* のそれぞれ
の遺伝子破壊ベクターも構築した。NotI-PpRLM1-1-F/KpnI-PpRLM1-1-R と
SacI-PpRLM1-2-F / NotI-PpRLM1-2-R の組み合わせのプライマーを用いて *PpRLM1* 遺
伝子破壊ベクター pOH103 を得た。NotI-PpSWI4-1-F / KpnI-PpSWI4-1-R と SacI-PpSWI4-2-F
/ NotI-PpSWI4-2-R の組み合わせのプライマーを用いて *PpSWI4* 遺伝子破壊ベクター
pOH106 を得た。*PpATG30* をクローニングするために XhoI-PpATG30-subclo-F/
SphI-PpATG30-subclo-R を用いてゲノム DNA を鋳型に増幅した。この断片を XhoI/SphI
で処理し、pSY006 (Ohsawa *et al.*, 2017) にクローニングし、pRN001 を得た。KpnI-P_{ACT1}-F/
SpeI-PpWSC1-subclo-R と KpnI-P_{ACT1}-F/ SpeI-PpWSC1(310-316Δ)-R のそれぞれの組み合わ
せのプライマーで pOH202 (Ohsawa *et al.*, 2017) を鋳型に増幅し、得られた断片をそれぞ
れ KpnI/SpeI で処理し、pNT206 (Tamura *et al.*, 2013) にクローニングし、pOH213 と
pOH214 を得た。XmaI-MPK1-F/(YFP)-PpMPK1-R と (PpMPK1)-YFP-F/BamHI-YFP-R のプ
ライマーでそれぞれゲノム DNA と pNT205 (Tamura *et al.*, 2013) を鋳型に増幅した。得
られた二つの断片を鋳型に XmaI-MPK1-F/BamHI-YFP-R の組み合わせのプライマーで
オーバーラップ PCR した。得られた断片を XmaI/BamHI で処理し、pNT204 (Tamura *et al.*,
2013) にクローニングし、pIS001 を得た。*PpMPK1* 部位特異的変異体ベクターは pIS001
を鋳型にそれ PpMPK1(T188AY190F)-F/PpMPK1(T188AY190F)-R のプライマーペアを用
いて inverse PCR し、pIS002 を得た。

PpWSC1 遺伝子破壊株を作製するために pOH100 を EcoRI によって処理した。

PpATG11 遺伝子破壊株を作製するために pIS100 を EcoRI/BamHI によって処理した。

PpATG30 遺伝子破壊株を作製するために、pOH104 と pOH105 をそれぞれ HindIII/PstI

で処理した。*PpMPK1*、*PpRLM1*、*PpSWI4* 遺伝子破壊株を作製するために、pIS101、pOH103、

pOH106 をそれぞれ NotI で処理した。これら制限酵素処理後の断片を *P. pastoris* にエレクトロポレーション法によって形質転換した。遺伝子破壊はコロニーPCR によって確認した。

ウエスタン解析

集菌した細胞を lysis buffer [50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, EDTA-free complete protease inhibitor cocktail (Roche diagnostics), phosphatase inhibitor PhosSTOP (Roche diagnostics)] に懸濁し、Multi-Beads Shocker (安井器械, 大阪) によって破碎した。細胞破碎液を 10,000 x g、5 分間 4°C で遠心分離し、上清に sample buffer (125 mM Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, bromophenol blue, 10% 2-mercaptoethanol) を添加し、5 分間沸騰水上で加熱した。それぞれのサンプルを 12% SDS-PAGE ゲルにて電気泳動した後、セミドライブロットティング装置 (ATTO, 東京) で、タンパク質を PVDF 膜に転写した。転写されたメンブレンをそれぞれ TBS-T バッファーで 1000 倍希釈した anti-HA (F7; Santa Cruz Biotech, Dallas, TX)、anti-beta actin (Abcam, Cambridge, UK) 抗体溶液に一晩つけ振盪した。そのメンブレンを 3 回 TBS-T バッファーで洗浄し、TBS-T バッファーで 10,000 倍希釈した anti-mouse-HRP (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) 抗体溶液で 1 時間振盪した。検出には Western Lightning (Perkin-Elmer Life Science, Waltham, MA) と Light Capture system (ATTO) を用いた。

Pex11-YFP 解析

2 OD 分の酵母細胞を集菌し、1 ml の solution I (0.2 N NaOH, 0.5% (v/v) 2-mercaptoethanol) を加え懸濁し、10 分間氷上に静置した。0.1 ml の TCA 溶液 (100% (w/v)) を加え、混和した。これを 20,000 x g、4°C で 5 分間、遠心分離し、ペレットに 1 ml のアセトンを加え、ソニケーションによってペレットを溶液中に分散させた。これを 20,000 x g、4°C で 5 分間、遠心分離し、上清を除き、ペレットを風乾させた。このペレットに 80 µL の sample buffer を加え、ソニケーションによって溶液中に分散させたのち、65°C で 10 分間、熱変性を行った。このサンプルを 20,000 x g、1 分間、遠心分離

し、上清を 10 μ L を SDS-PAGE に用いた。ウエスタン解析の際、anti-GFP antibody (JL-8; Takara, 大津) を TBS-T バッファーで 1000 倍希釈した抗体溶液を用いた。

蛍光顕微鏡による形態観察

P. pastoris を 5 ml の YPD 培地 28°C で定常期になるまで生育させ、その培養液 30 μ l を新たな 5 ml の YPD 培地 に植菌し、28°C 5 時間振盪培養した。この培養液を 1,500 rpm 5 分間の遠心分離によって集菌し、この細胞を 0.93 μ g/ml となるように FM4-64 (Molecular Probes, Eugene, OR) を添加した 5 ml のメタノール培地に移し、培養 24 時間後に細胞を遠心分離によって集菌し、IX81 蛍光顕微鏡 (Olympus, 東京) で観察した。蛍光画像は charged coupled device (CCD) camera (SenSys; PhotoMetrics, Tucson, AZ) で撮影し、MetaMorph software (Universal Imaging, West Chester, PA) を用いて解析した。

培地中メタノール濃度測定

培養液を 10,000 x g で 2 分間遠心分離し、その上清を 2 μ l をガスクロマトグラフィーによって検出した。カラムには Porapak Q (Agilent technologies, Santa Clara, CA) を用い、オーブン温度は 120°C、インジェクション温度は 180°C、検出温度は 180°C の条件で行った。

表 3-1. 本章で使用した酵母菌株

Strain	Genotype	Reference
PPY12	<i>arg4 his4</i> (parental strain)	Sakai <i>et al.</i> (1998)
OH2002	GS115, <i>his4::(P_{ACT1}PpATG30-3xHA)</i>	This study
IS10020	GS115, <i>P_{AOXI}CFP-SKL::HIS4</i>	This study
IS17020	IS10020, <i>Ppatg30::BSD</i>	This study
IS20000	PPY12, <i>P_{PEX11}PpPEX11-YFP::ARG4</i>	This study
IS20009	IS20000, <i>his4::HIS4 P_{PEX11}PpPEX11-YFP::ARG4</i>	This study
IS20110	PPY12, <i>Ppatg11:: BSD, P_{ATG30}PpATG30-3xHA:: HIS4</i>	This study
IS20111	IS20110, <i>arg4::ARG4</i>	This study
IS22110	IS20110, <i>Ppmpk1::Zeo^r</i>	This study
IS22111	IS22110, <i>arg4::ARG4</i>	This study
IS22112	IS22110, <i>P_{MPK1}PpMPK1-YFP::ARG4</i>	This study
IS22113	IS22110, <i>P_{MPK1}PpMPK1(TAYF)-YFP::ARG4</i>	This study
IS23110	IS20110, <i>Pprlm1::Zeo^r</i>	This study
IS23111	IS23110, <i>arg4::ARG4</i>	This study
IS23116	IS20110, <i>Ppswi4::Zeo^r</i>	This study
IS23116	IS23116, <i>arg4::ARG4</i>	This study
IS24110	IS20110, <i>Ppwsc1::Zeo^r</i>	This study
IS24111	IS24110, <i>arg4::ARG4</i>	This study
IS24112	IS24110, <i>P_{ACT1}PpWSC1-5xFLAG::ARG4</i>	This study
IS24113	IS24110, <i>P_{ACT1}PpWSC1(310-315Δ)-5xFLAG::ARG4</i>	This study
IS27009	IS2009, <i>Ppatg30::Zeo^r</i>	This study
IS27009	IS2009, <i>Ppwsc1::Zeo^r</i>	This study

表 3-2. 本章で使用したオリゴヌクレオチドプライマー

Designation	DNA Sequence
PpATG11-BSD-F	5'-GGATCTCAACAAACTGCGGTAGCCCACACACCATAGCTTC-3'
PpATG11-BSD-R	5'-CAGTCCATCGATCTCCGTTTTTGTAAATAGAACAAGAAAAATGA AACTGA-3'
EcoRI-PpATG11-1-F	5'-CGGAATTCAACGCAACACAAGTCCTTCC-3'
PpATG11-1-R	5'-GAAGCTATGGTGTGTGGGCTACCGCAGTTTGTTGAGATCC-3'
PpATG11-2-F	5'-TCAGTTTCATTTTTCTTGTCTATTACAAAAACGGAGATCGATG GACTG-3'
BamHI-PpATG11-2-R	5'-CGGGATCCGGAGACGACACCACATTGAA-3'
HindIII-PpATG30-1F	5'-CCCAAGCTTTGCCATTTAGCTCCCTGATT-3'
PpATG30-1R	5'-GAAGCTATGGTGTGTGGGCTATATTCTTGCTCGGCATCGT-3'
PpATG30-2F	5'-CGAAGGCTTTAATTTGCAAGCTCCAATCCCAGTCCACATCT-3'
PstI-PpATG30-2R	5'-TGCACTGCAGTGCCAAGTCTGACTCCCTTT-3'
PpATG30-BSD-F	5'-ACGATGCCGAGCAAGAATATAGCCCACACACCATAGCTTC-3'
PpATG30-BSD-R	5'-AGATGTGGACTGGGAATTGGAGCTTGCAAATTAAGCCTTCG-3'
NotI-PpMPK1-1-F	5'-CGATTATTTCTTCGGTGCCTGCGGCCGCCCTGAAGAGGGGAAA GAAGG-3'
KpnI-PpMPK1-1-R	5'-GGGGTACCCACCTTTTTGATGGCCACTT-3'
SacI-PpMPK1-2-F	5'-CCCGAGCTCCGATTGGATCGGTATGGTA-3'
NotI-PpMPK1-2-R	5'-CCTTCTTTCCCCTCTTCAGGGCGGCCGCAGGCACCGAAGAAAT AATCG-3'
NotI-PpRLM1-1-F	5'-ATTGCCAGAAAGCAACGTCTGCGGCCGCAACTCATCAGGCGTG CTTTT-3'
KpnI-PpRLM1-1-R	5'-GGGGTACCAAAGCCCAGCTTTCCTCTTC-3'
SacI-PpRLM1-2-F	5'-CCCGAGCTCCGAGATTTCCAAGCAGTGTG-3'
NotI-PpRLM1-2-R	5'-AAAAGCACGCCTGATGAGTTGCGGCCGCAGACGTTGCTTTCTG GCAAT-3'
NotI-PpSWI4-1-F	5'-GAGTGGACGTCAGCATTTTCAGCGGCCGCGGAGCATCGAGTGTG TTGTG-3'
KpnI-PpSWI4-1-R	5'-GGGGTACCACCTCCTTGGATCCTCTGGT-3'
SacI-PpSWI4-2-F	5'-CCCGAGCTCCGCATGAAGCTGGTAAATGA-3'
NotI-PpSWI4-2-R	5'-CACAACACACTCGATGCTCCGCGGCCGCTGAAATGCTGACGTC CACTC-3'

次ページに続く

表 3-2. 本章で使用したオリゴヌクレオチドプライマー (前ページからの続き)

Designation	DNA Sequence
XhoI-PpATG30-subclo-F	5'-CCGCTCGAGGGCGATGAGAGGAAGCATTA-3'
SphI-PpATG30-subclo-R	5'-ACATGCATGCTAAAATCTCCTGTTTGAGCTTTGA-3'
KpnI-P _{ACT1} -F	5'-GGGGTACCTCGCTGGTAATCCCCGGCT-3'
SpeI-PpWSC1-subclo-R	5'-GGACTAGTAGCATCATCAGGATTTGCTACC-3'
SpeI-PpWSC1(310-316Δ)-R	5'-GGACTAGTAGCATCCACCTTCCTGGAGTAATCTGCT-3'
XmaI-MPK1-F	5'-TTCCCCCGGGTCGAGAAAACGCAAACCTCTG-3'
(YFP)-PpMPK1-R	5'-CATGCCTGCAGCTCGAGCTGTGTACCATAACCGATCCAATC -3'
(PpMPK1)-YFP-F	5'-GATTGGATCGGTATGGTACACAGCTCGAGCTGCAGGCAT G-3'
BamHI-YFP-R	5'-CGCGGATCCTTACTTGTACAGCTCGTCCATGC-3'
PpMPK1(T188AY190F)-F	5'-TTTCTTGCTGAATTTGTTGCTACCAGGTGGTAT-3'
PpMPK1(T188AY190F)-R	5'-AGCAACAAATTCAGCAAGAAAGCCAGCATTCTT-3'

表 3-3. 本章で使用したプラスミド

Designation	Description	Reference
pIS100	$\Delta Ppatg11::Bsd^r$	This study
pOH105	$\Delta Ppatg30::Zeo^r$	This study
pOH104	$\Delta Ppatg30::Bsd^r$	This study
pOH100	$\Delta Ppwscl::Zeo^r$	Ohsawa <i>et al.</i> (2017)
pIS101	$\Delta Ppmpk1::Zeo^r$	This study
pOH103	$\Delta Pprlm1::Zeo^r$	This study
pOH106	$\Delta Ppswi4::Zeo^r$	This study
pRN001	$P_{ATG30}PpATG30-3xHA HIS4$	This study
pOH213	$P_{ACT1}PpWSC1-5xFLAG ARG4$	This study
pOH214	$P_{ACT1}PpWSC1(310-316\Delta)-5xFLAG ARG4$	This study
pIS001	$P_{MPK1}PpMPK1-YFP ARG4$	This study
pIS002	$P_{MPK1}PpMPK1(TAYF)-YFP ARG4$	This study
pYA006	$P_{AOX1}CFP-SKL HIS4$	Ano <i>et al.</i> (2005)
pNT206	pIB1 5xFLAG ARG4	Tamura <i>et al.</i> (2013)
pSY006	pIB1 3xHA HIS4	Ohsawa <i>et al.</i> (2017)

結果

PpWsc1 は PpAtg30 のリン酸化を抑制する

第一章において細胞表層ストレスを感知することが知られていた Wsc ファミリータンパク質 PpWsc1 が細胞外のメタノール濃度を感知し、メタノール誘導性遺伝子発現を適切なレベルに制御することを明らかにした。そこで、PpWsc1 がメタノール生育時の PpAtg30 のリン酸化制御を介して、ペキシファジーを抑制しているのではないかと考え、以下の実験をおこなった。はじめに、PpAtg30 がペキシファジーによって分解されない *PpATG11* 破壊株 (*Ppatg11Δ*) を親株とし、本株と *PpWSC1* をさらに破壊した株 (*Ppwsc1ΔPpatg11Δ*) との間で、メタノール培養時の PpAtg30 リン酸化レベルを比較した。PpAtg30 はリン酸化によって SDS-PAGE での電気泳動速度が低下するため、ウェスタン解析において検出バンドパターンの上方への分布移動で検知することができる (Farre *et al.*, 2008)。親株においては PpAtg30 のリン酸化レベルは、メタノール減少に伴い培養の後期、特に培養 36 時間後以降に顕著に増加することがわかった (図 3-1A)。一方で、初期メタノール 0.5% で培養した *Ppwsc1ΔPpatg11Δ* 株では、培養 24 時間後では培地中にメタノールが 0.15% 残っているにもかかわらず、親株に比べリン酸化の顕著な亢進が見られた (図 3-1A)。また同様に、初期メタノール濃度 1.0% での培養においても、培養 24 時間ではメタノールが 0.6% 残存しているにもかかわらず、PpAtg30 のリン酸化レベルの増加が認められた (図 3-1A, B)。この結果は PpWsc1 がメタノール存在時の PpAtg30 のリン酸化の抑制に機能することを強く示唆している。次に野生型 PpWsc1 または PpRom2 結合に必要な領域を削除した変異体 PpWsc1(310-316Δ) を *Ppwsc1ΔPpatg11Δ* 株に発現させ、PpAtg30 リン酸化レベルに与える影響を調べた。野生型 PpWsc1-3xHA を発現させると PpAtg30 のリン酸化レベルが低下し、その相補性が確認された (図 3-1C)。一方、PpWsc1(310-316Δ)-3xHA の発現では相補しなかった。この結果は、PpWsc1 と PpRom2 の結合によるシグナル伝達が、PpAtg30 のリン酸化抑制に重要であることを示している。

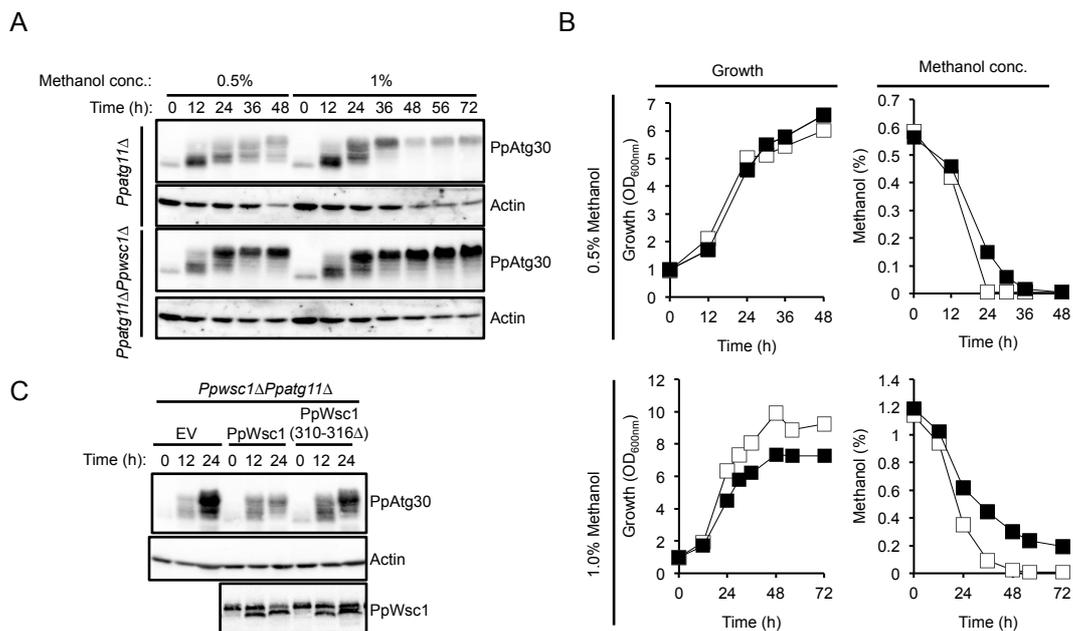


図 3-1. *PpWSC1* 遺伝子破壊が *PpAtg30* のリン酸化に与える影響
 (A) *Ppwsc1*Δ株における *PpAtg30* のリン酸化レベル (B) 生育とメタノール濃度 *Ppatg11*Δ株 (□)、*Ppwsc1*Δ*Ppatg11*Δ株 (■) (C) *PpWsc1* の *PpRom2* 結合領域削除変異株の *PpAtg30* のリン酸化レベル

PpMpk1 は *PpAtg30* のリン酸化を抑制する

次に、*Wsc* ファミリータンパク質のシグナル下流の因子である MAP キナーゼ *PpMPK1* (XP_002493131.1) を *P. pastoris* ゲノム上に同定した。*PpMpk1* がメタノール存在時の *PpAtg30* のリン酸化抑制に関与するかどうかについて、解析を行った。*Ppmpk1*Δ *Ppatg11*Δ株における *PpAtg30* リン酸化レベルは培養 24 時間後に親株と比較して顕著に亢進した (図 3-2)。本株に野生型の *PpMpk1*-YFP を発現させた株では、*PpAtg30* リン酸化レベルは親株と同程度までに減少した。一方で *Ppmpk1*Δ*Ppatg11*Δ株に *PpMpk1* の上流からリン酸化を受けない変異体である T188 と Y190 をそれぞれアラニン、フェニルアラニンに置換した *PpMpk1*(TAYF)-YFP を発現させても、*PpAtg30* リン酸化レベルは亢進したままであった (図 3-2)。蛍光顕微鏡観察から、*PpMpk1*(TAYF)-YFP と *PpMpk1*-YFP の局在に大きな差はなく、そのタンパク質量にも大きな差はなかった

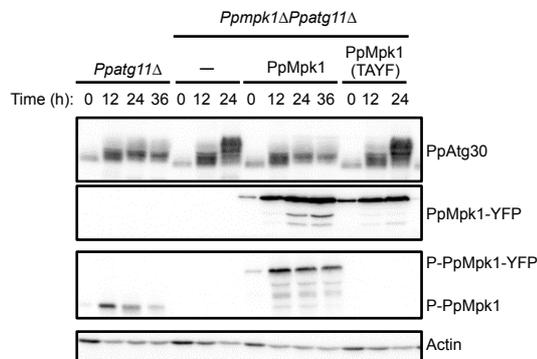


図 3-2. *PpMPK1* 遺伝子破壊が *PpAtg30* のリン酸化に与える影響

(未掲載データ)。これらの結果から、PpMpk1 はメタノール存在時に、上流のキナーゼ (Mkk1/Mkk2) からのシグナルを T188 と Y190 に受け、PpAtg30 のリン酸化を抑制することがわかった。メタノール培養時の PpMpk1 リン酸化レベルを Phospho-p40/42 抗体を用いて経時的に調べたところ、PpMpk1 はメタノール培養 12 時間後以降にリン酸化されることがわかった (図 3-2)。この結果は、メタノール培養時における PpMpk1 のリン酸化が PpAtg30 リン酸化の抑制に重要であることを示唆している。

PpRlm1 は PpAtg30 のリン酸化抑制に必要である

出芽酵母 *S. cerevisiae* の Mpk1 は CWI 経路において、転写因子 Rlm1 と Swi4-Swi6 複合体をリン酸化することで、その活性を制御し、細胞壁合成や細胞周期に関わる遺伝子の発現を制御する (Rodicio and Heinisch, 2010)。*P. pastoris* ゲノム上にこれら転写因子をコードする *PpRLM1* (XP_002493499.1) と *PpSWI4* (XP_002489438.1) を同定し、それぞれの遺伝子破壊株を作製した。*Pprlm1ΔPpatg11Δ*株においては、親株 (*Ppatg11Δ*) と比較して PpAtg30 リン酸化の顕著な亢進が見られた (図 3-3)。一方、*Ppswi4ΔPpatg11Δ*株は、PpAtg30 のリン酸化レベルは親株と同程度だった。これらの結果から PpMpk1 は PpSwi4 ではなく PpRlm1 を介して、PpAtg30 リン酸化を抑制することがわかった。

メタノール培養後期に PpAtg30 に依存したペキシファジーが誘導される

メタノール培養後期のメタノール減少に伴ってペキシファジーが誘導されるのかを調べるために、生化学的な手法と形態学的な手法によってペキシファジー活性を評価した。ペキシファジーの生化学的な評価には Pex11-YFP 発現株を用いた。ペルオキシソーム膜上のタンパク質である Pex11 は、ペキシファジーによって液胞に運ばれると液胞内プロテアーゼによって分解されるが、蛍光タンパク質はこれらプロテアーゼによって分解されにくい性質をもっているため、Pex11-YFP から生じた YFP 単体をウエスタ

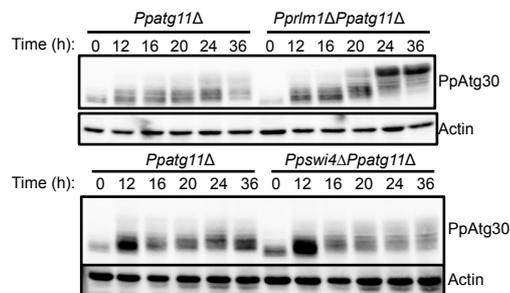


図 3-3. *PpRLM1* と *PpSWI4* 遺伝子破壊が PpAtg30 のリン酸化に与える影響

ン解析により検出することで、ペキソファジー活性を評価することが可能である (Welter *et al.*, 2010)。培養 20 時間以降の野生株の細胞では、YFP のバンド強度が増加した (図 3-4A)。このタイミングは、メタノールが枯渇するタイミングと一致していた (図 3-4B)。PpATG30 破壊株 (*Ppatg30Δ*) では、YFP のバンド強度の時間経過による増加は観察されなかった。次に、CFP-SKL (peroxisome targeting signal1) の形態学的な解析によってペキソファジー活性を評価した。CFP-SKL に由来する CFP 蛍光の液胞内拡散のパターンは、ペキソファジーの進行を示す。野生株ではメタノール培養 24 時間で 80% の細胞がそのような蛍光パターンを示した (図 3-4C)。一方、*Ppatg30Δ* 株の細胞においては、液胞内の CFP 蛍光はほとんど観察されなかった (図 3-4C)。このことから、メタノール減少に伴い PpAtg30 に依存したペキソファジーが誘導されることがわかった。

CWI 経路はペキソファジーを抑制する

上記の通り、PpWsc1、PpMpk1 と PpRlm1 はメタノール培養時における PpAtg30 のリン酸化を抑制することから、*PpWSC1* の遺伝子破壊がペキソファジーに与える影響を Pex11-YFP のウェスタン解析によって評価した。ペキソファジー活性はメタノール濃度の影響を受けることが予想されたことから、異なる株間のペキソファジー活性を正確に

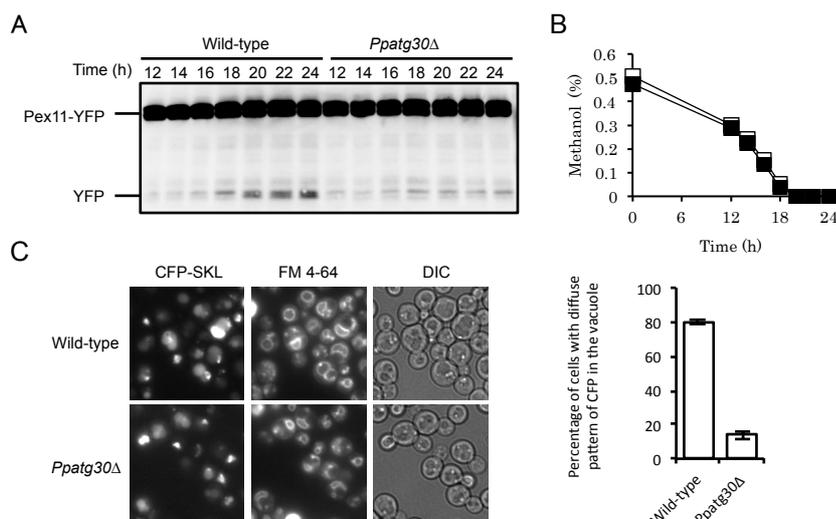


図 3-4. メタノール濃度減少に伴う PpAtg30 依存性ペキソファジーの進行 (A) Pex11-YFP を用いたペキソファジー進行の評価 (B) 野生株 (□) と *Ppatg30Δ* 株 (■) の培地中メタノール濃度 (C) CFP-SKL の液胞内拡散を指標としたペキソファジー進行の評価

比較するためには、比較株同士の培養メタノール濃度変化を揃える必要があると考えた。そこで、2つの培養槽におけるメタノール培養時のメタノール濃度を揃えるためにフラスコ内がメンブレンで仕切られている別府フラスコを用いた。別府フラスコのメンブレンは、酵母細胞を通さないがメタノールを含む培地成分を透過することができる透析培養フラスコであり (Ohno *et al.*, 1999)、メタノールを含む培地成分濃度を2つの培養槽内で揃えることができる (図 3-5A)。まず、野生株と *Ppatg30Δ*株を別府フラスコによる共培養に供し、両株を同じメタノール濃度変化で培養できること、さらに Pex11-YFP を用いたウエスタン解析から PpAtg30 に依存したペキシファジーがメタノール濃度の減少に伴い誘導されることがわかった (図 3-5B, C)。同様に、野生株と *Ppwsc1Δ*株を別府フラスコによる共培養・Pex11-YFP のウエスタン解析に供した。その結果、*Ppwsc1Δ*株ではメタノール培養 13 時間後に YFP 単体のバンドが野生株より強く検出された (図 3-5D)。これらの結果から、PpWsc1 はメタノール存在時におけるペキシファジー抑制に関与することが明らかになった。

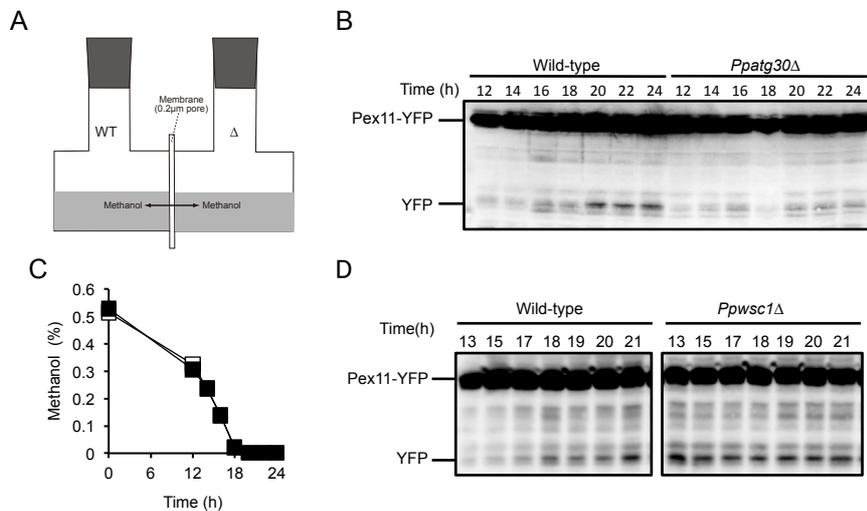


図 3-5. *PpWSC1*破壊がペキシファジーに与える影響

(A) 別府フラスコ (B) 別府フラスコによる共培養時の野生株と *Ppatg30Δ*株のペキシファジーの比較 (C) 共培養時の野生株 (□) と *Ppatg30Δ*株 (■) の培地中メタノール濃度 (D) 共培養の野生株と *Ppwsc1Δ*株のペキシファジー進行の評価

考察

本章において、細胞表層ストレス応答に関わる PpWsc1、PpMpk1、PpRlm1 が PpAtg30 のリン酸化の抑制に重要であることがわかった。また、PpWsc1 の PpRom2 との結合に必要な領域が PpAtg30 リン酸化抑制に必要であることから、これらの因子がシグナル伝達経路として PpAtg30 のリン酸化抑制に関連していることが示唆された。また、これらの因子の PpAtg30 のリン酸化抑制がペキシファジー抑制に重要であることがわかった。このことは、メタノール培養時に PpWsc1 によるメタノール感知機構がペキシファジーのブレーキとして働くことを強く示唆している。

本章において、PpMpk1 もペキシファジーの抑制に機能することを明らかにした。一方、*S. cerevisiae* を用いた研究においては、Wsc ファミリータンパク質と機能が重複する Mid2 から Mpk1 までの細胞表層ストレス応答経路は、ペキシファジーやミトコンドリアの選択的オートファジーであるマイトファジーの抑制ではなく誘導に働くことが報告されている(Mao *et al.*, 2011; Manjithaya *et al.*, 2010)。*P. pastoris* と *S. cerevisiae* のペキシファジーについては、相違点として以下のようなことが知られている。i) まず、*P. pastoris* のメタノール培養時のペルオキシソームは *S. cerevisiae* のペルオキシソームと比べて非常に大きく、ペルオキシソームの大きさによってペキシファジーに用いられる因子は異なる (Nazarko *et al.*, 2009)。ii) 実験に用いられているペキシファジー誘導条件も異なり、*S. cerevisiae* においてはオレイン酸培養後、窒素源を含まないグルコース培地へシフトすることで誘導されているが、*P. pastoris* においてはメタノール培養からメタノール枯渇、またはグルコースやエタノール培地へのシフトによって誘導されている。iii) *S. cerevisiae* と *P. pastoris* のペキシファジーに関わる因子も異なり、*S. cerevisiae* で同定されている ScAtg36 は、*P. pastoris* にホモログはなく、相同性のない PpAtg30 が代わりに機能する。さらに *P. pastoris* で同定されている PpAtg37 オルソログが *S. cerevisiae* においては同定されていない(Motley *et al.*, 2012; Farre *et al.*, 2008)。以上のことから、*S. cerevisiae* と *P. pastoris* とで、誘導や抑制機構において、そのシグナル伝達経路が異なることが考えられる。

本章では、*P. pastoris* においては、PpMpk1 がペキシファジーの抑制に関わることを

示したが、このような MAP キナーゼによるオートファジーの抑制はほかにも報告されている。出芽酵母においては、Hog1 の緩やかな過剰発現が非誘導条件でもマイトファジーを誘導するが、強い過剰発現では抑制することが報告されている (Manjithaya *et al.*, 2010)。これらから、MAP キナーゼはオートファジーの誘導・抑制の両方の機能を司っているのかもしれない。

メタノール培養時においても PpAtg30 の 5-10%程度が常にリン酸化されている (Farre *et al.*, 2008)。S. cerevisiae においてもオレイン酸の培養初期にペキシファジーが ScAtg36 のリン酸化に依存して起こる (Motley *et al.*, 2012; Tanaka *et al.*, 2014)。これらのことは、ペキシファジーの非誘導条件下であっても、レセプタータンパク質のリン酸化が誘導されうることを示しており、ペルオキシソームの恒常的なリサイクリングに重要な働きを示しているのであろう。また、ペキシファジー非誘導条件であるメタノール培養時においても PpAtg30 を過剰発現するとペキシファジーが誤誘導され、生育が著しく阻害される (Farre *et al.*, 2008)。このことは、細胞内リン酸化 PpAtg30 の絶対量が増加するだけで、ペキシファジーが誘導される状態にあることを示している。そのため、本章で示した PpWsc1 による PpAtg30 リン酸化レベル抑制機構は、ペキシファジーの過剰亢進を防ぎペルオキシソーム量を維持するための重要な生理学的意義をもつと考える。

メタノール資化性酵母はメタノールを炭素源に植物葉面にも棲息している。このとき、メタノール代謝に必要な遺伝子のみならず、ペルオキシソーム合成やペキシファジー関連遺伝子も必要であることが知られている (Kawaguchi *et al.*, 2011)。植物葉面ではメタノール濃度が 0-0.2%の間で日周変動し、メタノール資化性酵母が、ペルオキシソームの合成と分解を、毎日、繰り返しながら細胞増殖している。そのため、細胞外のメタノール濃度を感知し、ペルオキシソームの合成だけでなく、その分解も厳密に制御する必要がある。その制御に PpWsc1 が重要な役割をしているのではないかと考えられる。

本章で明らかにしたように、PpAtg30 リン酸化抑制に転写因子である PpRlm1 が機能していることから、PpRlm1 が PpAtg30 のリン酸化・脱リン酸化酵素やその活性を制御するタンパク質の発現を制御しているモデルが考えられる。ScAtg36 のリン酸化にはリン酸化酵素 Hrr25 が重要であるが (Tanaka *et al.*, 2014)、PpAtg30 のリン酸化酵素は未だ

明らかになっていない。また PpAtg30 のリン酸化制御にはペルオキシソーム膜上に存在し、ペルオキシソーム生合成にもペキシファジーにも関わる PpPex3 やペキシファジー誘導に関与する PpAtg37 が PpAtg30 のリン酸化制御に重要であると考えられている (Burnett *et al.*, 2015; Nazarko *et al.*, 2014)。これらのことから、PpRlm1 の支配下の遺伝子に PpAtg30 のリン酸化を直接制御する因子もしくは、PpPex3 や PpAtg37 を制御する新規因子が存在しているのかもしれない。また、このように PpRlm1 の転写制御に依存したモデル以外に、PpRom2 依存的なモデルも考えられる。PpAtg37 は palmitoyl CoA 結合部位をもち、その部位は PpAtg30 と結合するが、palmitoyl CoA と PpAtg30 の間で競合的である (Nazarko *et al.*, 2014)。palmitoyl CoA は極長鎖脂肪酸 (very-long-chain fatty acids : VLCFA) 合成の初発物質として知られているが、palmitoyl CoA から VLCFA への代謝の律速酵素である Elo2 のリン酸化を Rom2 が促進し不活性化することが報告されている (Kihara, 2012; Oh *et al.*, 1997; Olson *et al.*, 2015)。これらのことから、細胞表層ストレス応答経路の Rom2 がメタノールの存在によって活性化され、Elo2 のリン酸化を介して不活性化し、palmitoyl CoA が蓄積するによって、PpAtg37 に palmitoyl CoA が結合し、PpAtg30 と結合できずペキシファジーを抑制するのかもしれない。また、*S. cerevisiae* では Elo2 のリン酸化には Sit4 が重要な因子である (Zimmermann *et al.*, 2013)。*P. pastoris* SIT4 の遺伝子破壊株はペキシファジーの抑制ができないことがわかっている (未発表データ)。これらの結果は、Elo2 の活性制御を介したペキシファジーの抑制モデルも支持している。

本章では、PpWsc1 が細胞表層ストレス応答経路依存的に PpAtg30 のリン酸化を抑制し、ペキシファジーを抑制していることを示した。このことから、PpWsc1 がメタノール誘導性遺伝子発現とペキシファジーといったメタノール生育時における様々な細胞制御を支配する重要な因子であることがわかった。

結論

本論文では *P. pastoris* 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 /PpWsc3 がメタノール誘導性遺伝子発現制御に関わることを初めて明らかにした。さらに、ペルオキシソームのオートファジーによる分解機構であるペキシソファジーの抑制に PpWsc1 が重要であることを見出した。

第一章では、PpWsc1 /PpWsc3 を遺伝子発現制御に関わるメタノール感知因子として初めて同定し、その機能解析を行った。主に、PpWsc1 が低濃度メタノール (0-0.05%)、PpWsc3 が高濃度メタノール (0.05-2%) で、シグナル伝達因子である PpRom2 を介してメタノール誘導性遺伝子発現制御に関わることを見出した。PpWsc1 は細胞表層ストレス時にも機能するが、PpWsc3 はメタノール感知に特異的であった。また PpWsc1 がメタノールと細胞表層ストレスの刺激を区別して感知し、独立して、下流にシグナルを伝達していることを示した。

第二章では、エタノール抑制不能変異株を複数単離し、その変異原因遺伝子としてエタノールからアセチル CoA に変換する代謝酵素をコードする *PpADH2*、*PpALD4*、*PpACSI* を同定した。これら遺伝子の破壊株を用いた解析によって、エタノール自身でなく、エタノール代謝によってアセチル CoA が生じることがエタノール抑制に必要であることを示した。さらに *PpADH2* 破壊株においても、エタノールによるメタノール誘導性遺伝子群の発現が見られなかったことから、メタノール感知因子 PpWsc1 /PpWsc3 がエタノールとメタノールを同じ低分子アルコール分子として感知しているのではなく、エタノールに感知せず、メタノールを特異的に感知していることを示した。

第三章では、PpWsc1 のペルオキシソームの動態制御における機能について調べた。*PpWSC1* 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。このことからペルオキシソーム増殖・発達時に PpWsc1 がペキシソファジーの抑制に機能することを示し、その抑制制御には PpMpk1 や PpRlm1 の細胞表層ストレス応答経路が関与していた。

このように、本論文では、メタノール資化性酵母における Wsc ファミリータンパク

質 PpWsc1 /PpWsc3 のメタノール誘導性遺伝子発現やペルオキシソーム動態制御に対する新規機能を明らかにした。PpWsc1 /PpWsc3 はメタノールの感知因子であると考えられるが、生理的濃度の低分子アルコールを感知する因子や分子メカニズムはこれまで明らかになってなかった。本論文はメタノール誘導性遺伝子発現の高度な制御技術に繋がるだけでなく、真核細胞における低分子アルコール感知の分子機構の解明にも大きく貢献するものと考えられる。

参考文献

- Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S. and Blondin, B. (2001) Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **498**: 98-103.
- Burnett, S.F., Farre, J.C., Nazarko, T.Y. and Subramani, S. (2015) Peroxisomal Pex3 activates selective autophagy of peroxisomes via interaction with the pexophagy receptor Atg30. *J Biol Chem* **290**: 8623-8631.
- Delley, P.A. and Hall, M.N. (1999) Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of *RHO1*. *J Cell Biol* **147**: 163-174.
- Dupres, V., Alsteens, D., Wilk, S., Hansen, B., Heinisch, J.J. and Dufrene, Y.F. (2009) The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring *in vivo*. *Nat Chem Biol* **5**: 857-862.
- Dupres, V., Heinisch, J.J. and Dufrene, Y.F. (2011) Atomic force microscopy demonstrates that disulfide bridges are required for clustering of the yeast cell wall integrity sensor Wsc1. *Langmuir* **27**: 15129-15134.
- Farre, J.C., Manjithaya, R., Mathewson, R.D. and Subramani, S. (2008) PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev Cell* **14**: 365-376.
- Fujita, K., Matsuyama, A., Kobayashi, Y. and Iwahashi, H. (2004) Comprehensive gene expression analysis of the response to straight-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* using cDNA microarray. *J Appl Microbiol* **97**: 57-67.
- Fujita, K., Matsuyama, A., Kobayashi, Y. and Iwahashi, H. (2006) The genome-wide screening of yeast deletion mutants to identify the genes required for tolerance to ethanol and other alcohols. *FEMS Yeast Res* **6**: 744-750.
- Gellissen, G. (2000) Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 741-750.
- Hartner, F.S. and Glieder, A. (2006) Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. *Microb Cell Fact* **5**: 39.

- Heinisch, J.J., Dupres, V., Wilk, S., Jendretzki, A. and Dufrene, Y.F. (2010) Single-molecule atomic force microscopy reveals clustering of the yeast plasma-membrane sensor Wsc1. *PLoS One* **5**: e11104.
- Jendretzki, A., Wittland, J., Wilk, S., Straede, A. and Heinisch, J.J. (2011) How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur J Cell Biol* **90**: 740-744.
- Kawaguchi, K., Yurimoto, H., Oku, M. and Sakai, Y. (2011) Yeast methylotrophy and autophagy in a methanol-oscillating environment on growing *Arabidopsis thaliana* leaves. *PLoS One* **6**: e25257.
- Kihara, A. (2012) Very long-chain fatty acids: elongation, physiology and related disorders. *J Biochem* **152**: 387-395.
- Koch, C., Neumann, P., Valerius, O., Feussner, I. and Ficner, R. (2016) Crystal Structure of Alcohol Oxidase from *Pichia pastoris*. *PLoS ONE* **11**: e0149846.
- Kratzer, S. and Schuller, H.J. (1995) Carbon source-dependent regulation of the acetyl-coenzyme A synthetase-encoding gene *ACSI* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **161**: 75-79.
- Kubota, S., Takeo, I., Kume, K., Kanai, M., Shitamukai, A., Mizunuma, M., Miyakawa, T., Shimoi, H., Iefuji, H. and Hirata, D. (2004) Effect of ethanol on cell growth of budding yeast: genes that are important for cell growth in the presence of ethanol. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**: 968-972.
- Levin, D.E. (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262-291.
- Lin-Cereghino, G.P., Godfrey, L., de la Cruz, B.J., Johnson, S., Khuongsathiene, S., Tolstorukov, I., Yan, M., Lin-Cereghino, J., Veenhuis, M., Subramani, S. and Cregg, J.M. (2006) Mxr1p, a key regulator of the methanol utilization pathway and peroxisomal genes in *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* **26**: 883-897.
- Lodder, A.L., Lee, T.K. and Ballester, R. (1999) Characterization of the Wsc1 protein, a

- putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**: 1487-1499.
- Manjithaya, R., Jain, S., Farre, J.C. and Subramani, S. (2010) A yeast MAPK cascade regulates pexophagy but not other autophagy pathways. *J Cell Biol* **189**: 303-310.
- Mao, K., Wang, K., Zhao, M., Xu, T. and Klionsky, D.J. (2011) Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **193**: 755-767.
- Mattanovich, D., Branduardi, P., Dato, L., Gasser, B., Sauer, M. and Porro, D. (2012) Recombinant protein production in yeasts. *Methods Mol Biol* **824**: 329-358.
- Meijer, A.J. and Codogno, P. (2006) Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med* **27**: 411-425.
- Metz, B., Kersten, G.F., Baart, G.J., de Jong, A., Meiring, H., ten Hove, J., van Steenbergen, M.J., Hennink, W.E., Crommelin, D.J. and Jiskoot, W. (2006) Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with insulin. *Bioconjug Chem* **17**: 815-822.
- Metz, B., Kersten, G.F., Hoogerhout, P., Brugghe, H.F., Timmermans, H.A., de Jong, A., Meiring, H., ten Hove, J., Hennink, W.E., Crommelin, D.J. and Jiskoot, W. (2004) Identification of formaldehyde-induced modifications in proteins: reactions with model peptides. *J Biol Chem* **279**: 6235-6243.
- Motley, A.M., Nuttall, J.M. and Hettema, E.H. (2012) Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **31**: 2852-2868.
- Mukaiyama, H., Oku, M., Baba, M., Samizo, T., Hammond, A.T., Glick, B.S., Kato, N. and Sakai, Y. (2002) Paz2 and 13 other PAZ gene products regulate vacuolar engulfment of peroxisomes during micropexophagy. *Genes Cells* **7**: 75-90.
- Nash, T. (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem J* **55**: 416-421.
- Nazarko, T.Y., Farre, J.C. and Subramani, S. (2009) Peroxisome size provides insights into the

- function of autophagy-related proteins. *Mol Biol Cell* **20**: 3828-3839.
- Nazarko, T.Y., Ozeki, K., Till, A., Ramakrishnan, G., Lotfi, P., Yan, M. and Subramani, S. (2014) Peroxisomal Atg37 binds Atg30 or palmitoyl-CoA to regulate phagophore formation during pexophagy. *J Cell Biol* **204**: 541-557.
- Oda, S., Yurimoto, H., Nitta, N., Sasano, Y. and Sakai, Y. (2015) Molecular characterization of Hap complex components responsible for methanol-inducible gene expression in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Eukaryot Cell*. **14**: 278-285
- Ogata, K., Nishikawa, H. and Ohsugi, M. (1969) A Yeast Capable of Utilizing Methanol. *Agric Biol Chem* **33**: 1519-1520.
- Oh, C.S., Toke, D.A., Mandala, S. and Martin, C.E. (1997) *ELO2* and *ELO3*, homologues of the *Saccharomyces cerevisiae ELO1* gene, function in fatty acid elongation and are required for sphingolipid formation. *J Biol Chem* **272**: 17376-17384.
- Ohno, M., Okano, I., Watsuji, T., Kakinuma, T., Ueda, K. and Beppu, T. (1999) Establishing the Independent Culture of a Strictly Symbiotic Bacterium *Symbiobacterium thermophilum* from Its Supporting *Bacillus* Strain. *Biosci, Biotechnol, Biochem* **63**: 1083-1090.
- Ohsawa, S., Yurimoto, H. and Sakai, Y. (2017) Novel function of Wsc proteins as a methanol-sensing machinery in the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Microbiol*.
- Olson, D.K., Frohlich, F., Christiano, R., Hannibal-Bach, H.K., Ejsing, C.S. and Walther, T.C. (2015) Rom2-dependent phosphorylation of Elo2 controls the abundance of very long-chain fatty acids. *J Biol Chem* **290**: 4238-4247.
- Pietrocola, F., Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J.M., Madeo, F. and Kroemer, G. (2015) Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab* **21**: 805-821.
- Rodicio, R. and Heinisch, J.J. (2010) Together we are strong--cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast* **27**: 531-540.
- Sahu, U., Krishna Rao, K. and Rangarajan, P.N. (2014) Trm1p, a Zn(II)₂Cys₆-type transcription factor, is essential for the transcriptional activation of genes of methanol utilization

- pathway, in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun* **451**: 158-164.
- Sakai, Y., Koller, A., Rangell, L.K., Keller, G.A. and Subramani, S. (1998a) Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates. *J Cell Biol* **141**: 625-636.
- Sakai, Y., Nakagawa, T., Shimase, M. and Kato, N. (1998b) Regulation and physiological role of the *DASI* gene, encoding dihydroxyacetone synthase, in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *J Bacteriol* **180**: 5885-5890.
- Sakai, Y., Saiganji, A., Yurimoto, H., Takabe, K., Saiki, H. and Kato, N. (1996) The absence of Pmp47, a putative yeast peroxisomal transporter, causes a defect in transport and folding of a specific matrix enzyme. *J Cell Biol* **134**: 37-51.
- Sakai, Y., Tani, Y. and Kato, Y. (1999) Biotechnological application of cellular functions of the methylotrophic yeast. *J Mol Catalysis B: Enzymatic* **6**: 13.
- Sasano, Y., Yurimoto, H. and Sakai, Y. (2007) Gene-tagging mutagenesis in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *J Biosci Bioeng* **104**: 86-89.
- Sasano, Y., Yurimoto, H., Yanaka, M. and Sakai, Y. (2008) Trm1p, a Zn(II)₂Cys₆-type transcription factor, is a master regulator of methanol-specific gene activation in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Eukaryot Cell* **7**: 527-536.
- Sears, I.B., O'Connor, J., Rossanese, O.W. and Glick, B.S. (1998) A versatile set of vectors for constitutive and regulated gene expression in *Pichia pastoris*. *Yeast* **14**: 783-790.
- Serrano, R., Martin, H., Casamayor, A. and Arino, J. (2006) Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *J Biol Chem* **281**: 39785-39795.
- Shiraishi, K., Oku, M., Kawaguchi, K., Uchida, D., Yurimoto, H. and Sakai, Y. (2015) Yeast nitrogen utilization in the phyllosphere during plant lifespan under regulation of autophagy. *Sci Rep* **5**: 9719.
- Suzuki, K. (2013) Selective autophagy in budding yeast. *Cell Death Differ* **20**: 43-48.
- Takeshige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T. and Ohsumi, Y. (1992) Autophagy in yeast

- demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol* **119**: 301-311.
- Tamura, N., Oku, M., Ito, M., Noda, N.N., Inagaki, F. and Sakai, Y. (2013) Atg18 phosphoregulation controls organellar dynamics by modulating its phosphoinositide-binding activity. *J Cell Biol* **202**: 685-698.
- Tamura, N., Oku, M. and Sakai, Y. (2010) Atg8 regulates vacuolar membrane dynamics in a lipidation-independent manner in *Pichia pastoris*. *J Cell Sci* **123**: 4107-4116.
- Tanaka, C., Tan, L.J., Mochida, K., Kirisako, H., Koizumi, M., Asai, E., Sakoh-Nakatogawa, M., Ohsumi, Y. and Nakatogawa, H. (2014) Hrr25 triggers selective autophagy-related pathways by phosphorylating receptor proteins. *J Cell Biol* **207**: 91-105.
- Tuttle, D.L., Lewin, A.S. and Dunn, W.A., Jr. (1993) Selective autophagy of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *Eur J Cell Biol* **60**: 283-290.
- Vay, H.A., Philip, B. and Levin, D.E. (2004) Mutational analysis of the cytoplasmic domain of the Wsc1 cell wall stress sensor. *Microbiology* **150**: 3281-3288.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A. and Ballester, R. (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13804-13809.
- Vogl, T. and Glieder, A. (2013) Regulation of *Pichia pastoris* promoters and its consequences for protein production. *N Biotechnol* **30**: 385-404.
- Welter, E., Thumm, M. and Krick, R. (2010) Quantification of nonselective bulk autophagy in *S. cerevisiae* using Pgk1-GFP. *Autophagy* **6**: 794-797.
- Yoshikawa, K., Tanaka, T., Furusawa, C., Nagahisa, K., Hirasawa, T. and Shimizu, H. (2009) Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **9**: 32-44.
- Yurimoto, H. (2009) Molecular basis of methanol-inducible gene expression and its application in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biosci Biotechnol Biochem* **73**: 793-800.
- Yurimoto, H., Kato, N. and Sakai, Y. (2005) Assimilation, dissimilation, and detoxification of

- formaldehyde, a central metabolic intermediate of methylotrophic metabolism. *Chem Rec* **5**: 367-375.
- Yurimoto, H. and Sakai, Y. (2009) Methanol-inducible gene expression and heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Candida boidinii*. *Biotechnol Appl Biochem* **53**: 85-92.
- Zaffagnini, G. and Martens, S. (2016) Mechanisms of Selective Autophagy. *J Mol Biol* **428**: 1714-1724.
- Zimmermann, C., Santos, A., Gable, K., Epstein, S., Gururaj, C., Chymkowitch, P., Pultz, D., Rodkaer, S.V., Clay, L., Bjoras, M., Barral, Y., Chang, A., Faergeman, N.J., Dunn, T.M., Riezman, H. and Enserink, J.M. (2013) TORC1 inhibits GSK3-mediated Elo2 phosphorylation to regulate very long chain fatty acid synthesis and autophagy. *Cell Rep* **5**: 1036-1046.

謝辞

本研究を進めるにあたり、終始熱心なご指導ご鞭撻を頂きました 京都大学 農学研究科 応用生命科学専攻 阪井康能 教授に厚く御礼申し上げます。

研究を進めるにあたって、丁寧なご指導、有益なご助言を頂きました 京都大学農学研究科 応用生命科学専攻 由里本博也 准教授に心より感謝申し上げます。

様々な有益なご意見、温かいご助力を頂きました京都大学 農学研究科 応用生命科学専攻 寶関 淳 特任准教授、奥 公秀 助教に深く感謝いたします。

研究室生活全般において温かいご支援、ご協力を頂きました翟 振宇 博士、小田沙織氏、白石晃将 氏、磯田隆宏 氏、西田 晋 氏に感謝いたします。研究室生活において、お世話になりました京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻制御発酵学研究室の皆様へ感謝いたします。

最後に、学生生活を様々な形で支えていただいた家族や友人に感謝いたします。

業績リスト

1. **Ohsawa S**, Yurimoto H, Sakai Y.
“Novel function of Wsc proteins as a methanol-sensing machinery in the yeast *Pichia pastoris*”
Mol Microbiol, in press (2017). DOI:10.1111/mmi.13631
2. **Ohsawa S**, Nishida S, Yurimoto H, Sakai Y.
“Ethanol repression of methanol-inducible gene expression in the yeast *Pichia pastoris*”
In preparation.
3. **Ohsawa S**, Isoda T, Oku M, Yurimoto H, Sakai Y.
“Mpk1 represses pexophagy during peroxisome proliferation through phosphorylation of Atg30 in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*”
In preparation.