

(論文内容の要旨)

微生物をストレス環境下でも生体触媒として高い活性を維持したまま用いるためには、生育を阻害するストレスに対して耐性を持たせることが必要である。そこで、産業で用いられているが、溶媒ストレスへの耐性が問題となっている真核生物である酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に溶媒ストレス耐性を賦与することを目的とした。まず、世界で初めて取得した有機溶媒に強い耐性を持つ酵母の転写産物を網羅的に解析して、有機溶媒耐性に関わる遺伝子群を探索し、探索した遺伝子を基に有機溶媒耐性の再構築を試みた。さらに、極限環境下の微生物が細胞壁特性を改変して耐性を獲得しているという知見を生かし、酵母細胞表層工学を利用して酵母の細胞壁特性の改変を行い、酸溶媒耐性を賦与することも試みた。

1) 酵母の有機溶媒耐性に関与する遺伝子のスクリーニング

酵母の有機溶媒耐性に必要な遺伝子を明らかにするために、世界で初めて単離された有機溶媒に強い耐性を持つ二倍体酵母 *S. cerevisiae* KK-211 株およびその親株より mRNA を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて全遺伝子の発現レベルを網羅的に比較した。その結果、KK-211 株の有機溶媒耐性化に関与している 14 個の遺伝子を特定した。発現レベルの変化していた遺伝子群を見ると、KK-211 株において、細胞膜に局在するトランスポーターによる有害物質の排出機構が重要であることが示唆された。また、発現レベルの増加していた細胞表層に局在するタンパク質の多くが親水的であることが判明し、細胞表層が親水性タンパク質によって変化した結果、有機溶媒との接触相互作用が低減したと推定できた。

2) 有機溶媒耐性賦与分子の探索・同定と耐性の再構築

上述した 14 遺伝子のうち 6 遺伝子のプロモーター領域に Pleiotropic drug response element (PDRE) と呼ばれる、転写因子 Pdr1p によって制御される配列が共通して含まれていることが分かった。さらに、報告されている *PDR1* 変異株の DNA マイクロアレイ解析結果と発現パターンが類似していることも分かった。そこで、有機溶媒耐性株から *PDR1* 遺伝子を単離し、アミノ酸配列を調べたところ、KK-211 株特有の変異 (R821S) が発見できた。有機溶媒存在下では致死的である一倍体酵母 *S. cerevisiae* MT8-1 株に、この 1 アミノ酸変異 (*PDR1* R821S) を導入したところ、有機溶媒存在下でも良好に生育することが判明した。さらに、水／有機溶媒二相系での有用物質生産への適用も可能であったので有機溶媒耐性の再構築も実証できた。以上のことから、酵母の有機溶媒耐性には転写因子 Pdr1p が関与しており、このタンパク質の 1 アミノ酸変異 (R821S) によって、PDRE を制御領域に持つ排出トランスポーター遺伝子群が活性化されて有機溶媒耐性を獲得したと考えられた。

3) 酸溶媒耐性を賦与する新規分子の創出

酵母分子ディスプレイ法を利用して細胞表層をストレスに適した性質に改変し、溶媒ストレス耐性を賦与することを試みた。まず、25アミノ酸残基長のランダムペプチドをアルファ-アグルチニンの酵母細胞壁結合ドメインを介して酵母細胞表層にディスプレイさせるプラスミドライブラリーを設計・構築した。このライブラリーを酵母細胞に導入し、ペプチドにより細胞表層の性質がランダムに改変された酵母細胞ライブラリーを得た。このライブラリーから酸溶媒に対して耐性を示す株をスクリーニングしたところ、酸耐性株を得ることに成功した。この改変は、細胞表層にディスプレイした新規ペプチドによるものであることを実証確認した。また、熱に対する耐性も調べたところ、このペプチドは酸耐性だけでなく熱耐性も同時に賦与していることが分かった。このように、酵母細胞表層の性質を改変することで酸耐性および熱耐性を賦与できることが分かった。

4) ペプチドによる酸溶媒耐性賦与機構の推定

上述した新規ペプチドの等電点を調べたところ、9.98 であり、酸性環境下では細胞表層に局在して緩衝作用を持つことが考えられた。BLAST検索の結果、pH 0.7、60℃という極限環境下で生育する古細菌 *Picrophilus torridus* の膜タンパク質の一部と高い相同性があることが判明し、この古細菌の超酸性耐性に相同領域が寄与している可能性も示唆した。また、グルコースの蛍光誘導体を用いてグルコースの取り込み活性を調べたところ、ペプチドディスプレイによってグルコースの取り込みが活性化していることが分かった。このことから、ディスプレイしたペプチドによる酸耐性獲得機構と、よく知られている酵母での細胞内グルコース濃度の上昇によりキナーゼが細胞膜 H^+ -ATPaseを活性化し、 H^+ 排出を活性化する機構との関連が推定され、酵母に酸耐性を賦与するための新たな標的を見出した。

(論文審査の結果の要旨)

微生物への強い溶媒ストレス耐性の賦与は、ストレス環境下でも生体触媒としての活性を維持させ、効率的な生物変換を実現する手法であると期待されている。本論文では、強い溶媒ストレス耐性酵母の創出を目指し、耐性に関わる分子を探索・創製することを目的とした。まず、DNA マイクロアレイを用いた有機溶媒に強い耐性を持つ酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の転写レベルの網羅的な解析により、有機溶媒耐性に関わる分子の探索と同定を行った。さらに、極限環境下で生きる微生物における溶媒ストレス耐性機構の知見を生かして、酵母の細胞表層特性の改変により酸溶媒耐性を賦与する新規ペプチドの創製を行った。

評価される主な点は以下の通りである。

- 1) DNA マイクロアレイを用いて、有機溶媒耐性酵母 *S. cerevisiae* KK-211 株の転写レベルを網羅的に解析し、酵母の有機溶媒耐性に関連すると考えられる 14 個の遺伝子を特定した。この結果から、細胞膜の多くの排出トランスポーター遺伝子群や親水性の細胞表層タンパク質遺伝子群が活性化しており、有機溶媒耐性化には細胞外への排出機構の強化や細胞表層の親水化が重要であることを明らかにした。
- 2) KK-211 株の転写因子 Pdr1p に特有の変異 (R821S) があることを見出し、この 1 アミノ酸変異を野生株に導入するだけで酵母の有機溶媒耐性が再現できることが分かった。この変異転写因子により細胞膜の排出トランスポーター遺伝子群が活性化して有機溶媒耐性を獲得したものと考えられた。また、有機溶媒存在下での有用物質生産に利用できることも実証した。
- 3) 酵母分子ディスプレイ法により細胞表層を改変できるランダムペプチドライブラリーを取得し、酸耐性生育スクリーニングの結果、酸耐性を獲得した酵母 *S. cerevisiae* を得ることに成功した。得られたペプチドの物性を解析したところ、酸性環境を表層で緩衝している可能性を示唆した。さらに、獲得した酸耐性が細胞表層に局在するペプチドに依存することと共に、このペプチドが熱耐性も同時に賦与することを明らかにした。
- 4) ペプチドをディスプレイした細胞がグルコースの取り込みを促進していることをグルコースの蛍光誘導体の定量や各種条件での生育実験から明らかにした。このことから、ペプチド細胞表層ディスプレイによる酸耐性の獲得は、酵母で知られている細胞内グルコース濃度の上昇によりキナーゼが細胞膜 H^+ -ATPase を活性化し、 H^+ 排出を活性化するという機構によるものであると推定できた。

以上、本論文では、酵母 *S. cerevisiae* から得られたゲノム情報を活用することで、酵母の有機溶媒や酸溶媒に対するストレス応答に関連する分子を効果的に探索・創製できることを示した。このことは、高効率な生物変換を可能にする溶媒ストレス耐性酵母を創出するための新たな知見と方法論を与えるものであり、微生物育種学、産業微生物学、生体高分子化学に寄与するところが大い。

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21年2月10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。