

(続紙 1)

京都大学	博士（農学）	氏名	翟振宇
論文題目	Molecular characterization of transcriptional regulators Mpp1p and Mig1p in methanol-inducible gene expression in the yeast <i>Candida boidinii</i> (酵母 <i>Candida boidinii</i> 転写調節因子Mpp1p及びMig1pのメタノール誘導性遺伝子発現における分子特性の解明)		
（論文内容の要旨） 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メチロトロフ酵母は、強力なメタノール誘導性プロモーターを有していることから、異種遺伝子高発現のための宿主として、実験室レベルから工業レベルまで広く利用されている。本酵母におけるメタノール誘導性遺伝子の発現調節に関する分子機構の解明は、異種遺伝子発現系の高効率化、並びに未来型資源として注目されるメタノールを利用する次世代の資源循環型物質生産系構築のために重要な課題である。本論文では、<i>Candida boidinii</i>におけるメタノール誘導性遺伝子の発現調節に関わる2つの転写調節因子Mpp1p, Mig1pを新たに取得し、Mpp1pがメタノール特異的誘導に関与する転写活性化因子であること、Mig1pがメタノール誘導性遺伝子の発現を負に制御する因子であることを明らかにした。さらに、Mig1pの核外輸送に関わるMsn5pがメチロトロフ酵母のホルムアルデヒド耐性機構に関与することを明らかにするとともに、<i>MIG1</i>遺伝子破壊株が異種遺伝子発現に有利な宿主であることを示した。その主な内容は以下の通りである。 1) <i>C. boidinii</i> のドラフトゲノム情報を基に、Zn(II)₂Cys₆型転写活性化因子Mpp1pをコードする<i>MPPI</i>遺伝子を同定した。<i>MPPI</i>遺伝子破壊株 (<i>mpp1</i>Δ株) は、メタノールを単一炭素源とする培地にのみ生育不能であり、複数のメタノール誘導性プロモーターの転写活性が顕著に低下した。これらの結果から、Mpp1pがメタノール誘導性遺伝子の転写活性化に重要な役割を果たすことを明らかにした。 2) Mpp1pのC末端に蛍光タンパク質YFPを融合させたMpp1p-YFPを、<i>MPPI</i>プロモーター支配下で発現する<i>C. boidinii</i> 形質転換株を作製してMpp1pの細胞内局在を調べた結果、グルコース培養時にはMpp1p-YFPの蛍光が観察されなかったが、メタノール培養時にはMpp1p-YFPが発現し、核に局在することを明らかにした。またMpp1p自身の発現が、Trm1pおよびTrm2p依存的にメタノールにより誘導されることを明らかにした。以上の結果から、Mpp1pがメタノール特異的な遺伝子発現誘導に関わる転写活性化因子として機能していることを明らかにした。 3) 出芽酵母由来のグルコース抑制を司るC₂H₂型転写因子ScMig1pの<i>C. boidinii</i>ホモログとして<i>MIG1</i>遺伝子を同定した。<i>MIG1</i>遺伝子破壊株 (<i>mig1</i>Δ株) の各種炭素源を用いて培養した際の生育は野生株と同等であった。グルコース単一炭素源培地からメタノール単一炭素源培地にシフトした際のアアルコールオキシダーゼ遺伝子 (<i>AOD1</i>) プロモーター活性を野生株と<i>mig1</i>Δ株で比較したところ、メタノール誘導初期に<i>mig1</i>Δ株における<i>AOD1</i>プロモーター活性が野生株に比べて顕著に上昇し、野生株に比べて迅速に活性化されることを見いだした。以上の結果から、Mig1pがメタノール誘導性遺伝子を負に制御する因子であることを明らかにするとともに、<i>mig1</i>Δ株が異種遺伝子発			

現にとって有利な宿主であることを示した。

4) Mig1pのC末端にYFPを融合したMig1p-YFPを*MIG1*プロモーター支配下で発現する*C. boidinii*形質転換株を作製してMig1pの細胞内局在を調べた結果、Mig1p-YFPはグルコース培養時には核に局在し、メタノール、エタノール、グリセロールやオレイン酸といった非発酵性単一炭素源培地にシフトすると細胞質に拡散することを明らかにした。さらに、出芽酵母においてMig1pの核外輸送体である ScMsn5pの *C. boidinii*ホモログ Msn5pの遺伝子破壊株 (*msn5*Δ株) を作成し、Mig1p-YFPの細胞内局在を観察したところ、メタノール培養時においてもMig1pが核に局在しており、Mig1pがグルコース非存在下でMsn5p依存的に核外輸送されることを明らかにした。

5) メチロトロフ酵母のメタノール代謝では、ホルムアルデヒドと過酸化水素が生じる。これらの毒性化合物によるストレスへの応答におけるMsn5pの関与を調べた。*msn5*Δ株では、メタノールやメチルアミンなどホルムアルデヒドを代謝中間体として生じる化合物を含む培地での生育が野生株に比べて遅延することを見いだした。また、*msn5*Δ株では、野生株と比較してホルムアルデヒド感受性が高まったが、過酸化水素感受性については野生株と同等であった。さらに、YFPを付加したMsn5pの細胞内局在を観察したところ、高濃度ホルムアルデヒドまたはエタノール処理時にはMsn5pは細胞質に拡散するが、過酸化水素処理時には核に局在することを見いだした。以上の結果から、メタノール資化性酵母Msn5pは、過酸化水素耐性には関与しないが、ホルムアルデヒド耐性に関与することを明らかにした。

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)

メタノールを単一の炭素・エネルギー源として利用するメチロトロフ酵母は、異種遺伝子高発現のための宿主として、実験室レベルから工業レベルまで広く利用されており、本酵母のメタノール誘導性遺伝子の発現調節に関する分子機構の解明は、異種遺伝子発現系の高効率化、並びに未来型資源として注目されるメタノールを利用する次世代の物質生産系構築のために重要な課題である。本論文では、メチロトロフ酵母 *Candida boidinii* におけるメタノール誘導性遺伝子の発現調節に関わる 2 つの転写調節因子を新たに取得し、それぞれの生理機能を明らかにした。評価すべき点は以下の 6 点である。

1) *C. boidinii* におけるメタノール誘導性遺伝子の発現調節に関わる $\text{Zn(II)}_2\text{Cys}_6$ 型転写因子 Mpp1p と C_2H_2 型転写因子 Mig1p を新たに同定した。

2) Mpp1p がメタノール特異的誘導に関与する転写活性化因子であること、Mig1p がメタノール誘導性遺伝子の発現を負に制御する転写調節因子であることを明らかにした。

3) *MPP1* の発現が、Mpp1p がメタノール培養時に核に局在すること、Trm1p および Trm2p 依存的にメタノール誘導を受けることを明らかにした。

4) Mig1p はグルコース培養時には核に局在し、メタノール、エタノール等の非発酵性炭素源培地にシフトすると、Msn5p 依存的に細胞質に拡散することを示した。

5) *MIG1* 遺伝子破壊株で *AOD1* プロモーター活性が野生株に比べて早く活性化されることから、*MIG1* 遺伝子破壊株が異種遺伝子発現に有利な宿主であることを示した。

6) Mig1p の核外輸送に関わる Msn5p が、メチロトロフ酵母では、過酸化水素耐性には関与せず、ホルムアルデヒド耐性に関与することを明らかにした。

以上のように、本論文は、*C. boidinii* におけるメタノール誘導性遺伝子の発現調節に関わる 2 つの転写調節因子 Mpp1p, Mig1p の分子特性を初めて明らかにし、メタノール誘導性遺伝子発現の分子機構の解明に重要な知見を提供するとともに異種遺伝子発現への応用の可能性を示したものであり、制御発酵学、応用微生物学、分子細胞生物学に貢献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 24 年 4 月 12 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。

注) Web での即日公開を希望しない場合は、以下に公開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