

論文内容の要旨

申請者氏名 灰谷 豊

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は発酵生産環境において、エタノール、浸透圧、冷凍、低温、乾燥、酸化、pH などのストレスを複合的に受けている。本来、細胞はストレスに応答し、ある程度適応する機構を備えているが、過酷なストレス下では、細胞内の多くのタンパク質は変性し、「異常タンパク質」として蓄積するため、酵母は致命的ダメージを受け、有用機能が制限されてしまう。申請者が所属する研究室では、変異株の解析から、酵母の HECT 型ユビキチンリガーゼの 1 つである Rsp5 の新しい機能として、ストレスで生じる異常タンパク質処理への関与を提唱している。一般に、細胞内に蓄積した異常タンパク質の処理には、分子シャペロンとして機能するストレスタンパク質による修復機構とユビキチン・プロテアソーム系を介した分解機構が存在する。

申請者はまず、異常タンパク質の修復機構に着目し、Rsp5 がストレスタンパク質の発現に及ぼす影響について解析した。ストレスタンパク質の遺伝子として、転写調節因子 Hsf1 が結合する HSE を有する *HSP42*、Msn2/4 が結合する STRE を有する *DDR2*、HSE と STRE を有する *HSP12* を用いた。野生株と Rsp5 変異株 (*rsp5*^{A401E}) をストレス培地 (高温、エタノール、ソルビトール) で培養すると、Rsp5 変異株ではこれら遺伝子の転写量が低下しており、マイクロアレイの結果と合わせて、Rsp5 がストレスタンパク質の転写に関与することが示された。また、これらを Rsp5 変異株で強制的に過剰発現させると、ストレス感受性を相補できた。次に、ストレスタンパク質遺伝子の転写調節因子 (Hsf1, Msn2/4) の発現について解析した。その結果、野生株と Rsp5 変異株ではこれら遺伝子 (*HSF1*, *MSN2/4*) の転写量に有意な差は見られなかったが、Rsp5 変異株では *HSF1*-mRNA, *MSN2/4*-mRNA や tRNA のほとんどが核外輸送されず核に蓄積しており、転写調節因子の存在量が野生株に比べて著しく減少していた。以上の結果から、Rsp5 が Hsf1 や Msn2/4 の転写後の制御 (RNA の核外輸送など) を介してストレスタンパク質の発現を調節し、異常タンパク質の修復に関与することが示された。

次に、ストレス耐性を向上させる変異型 Rsp5 を取得し、その機能を解析した。Rsp5 遺伝子のランダム変異導入ライブラリーで Rsp5 変異株を形質転換後、異常タンパク質を生成するアゼチジン-2-カルボン酸 (AZC) 含有培地で生育するクローンを分離した。その結果、Rsp5 変異株の様々なストレス感受性を相補する二重変異型 Rsp5 (T357A/K764E) を取得した。この変異型 Rsp5 は、AZC のような毒性アミノ酸アナログストレスでは野生型酵素よりも耐性を示した。ウェスタン解析の結果から、二重変異型 Rsp5 発現株ではアミノ酸アナログを取り込むパーミアーズ Gap1 が急速に分解されるため、強い耐性を獲得したと考えられた。T357 は基質を結合する WW ドメインに、K764 は触媒活性を有する HECT ドメインに存在し Rsp5 の高機能化に関わる可能性がある。以上の結果から、ストレスの種類により Rsp5 の基質は異なることが示唆された。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 灰谷 豊

真核生物のタンパク質品質管理機構に関与するユビキチンシステムにおいて、ユビキチンリガーゼは分解すべきタンパク質（基質）を認識し、ユビキチン化を行う重要な酵素である。酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の HECT 型ユビキチンリガーゼの1つで生育に必須である Rsp5 については、トランスポーターやレセプターを含む原形質膜のエンドサイトーシス、RNA ポリメラーゼ II の活性調節、不飽和脂肪酸合成遺伝子の転写調節因子の活性化、RNA 分子の核外輸送や成熟化、小胞体関連分解、胞子の形成や発芽など様々な細胞機能への関与が報告されているが、ミスフォールド化やアンフォールド化した異常タンパク質の選択的な認識や処理（修復、分解）に関する知見はほとんどない。申請者の所属する研究室では、高等生物のモデルとして、また発酵食品の製造において重要な酵母を材料に、酵母のストレス耐性機構を解析しており、Rsp5 の新しい機能としてストレスで生じる異常タンパク質処理への関与を提唱している。

申請者はストレスにおける Rsp5 の機能に着目し、1) Rsp5 が異常タンパク質修復に関与するストレスタンパク質の発現を制御する機構、2) ランダム変異導入により分離した変異型 Rsp5 がストレス耐性を向上させる機構を解析し、以下の成果をあげた。

- 1) Rsp5 が転写調節因子 (Hsf1, Msn2/4) の転写後制御 (mRNA の核外輸送など) を介してストレスタンパク質 (Hsp12, Hsp42, Ddr2 など) の発現を調節し、異常タンパク質の修復に関与することを示した。Rsp5 が高温ストレスにおいて RNA 分子の核外輸送に関与することはすでに報告されているが、申請者は Rsp5 が Hsf1 や Msn2/4 の mRNA の核外輸送に選択的に関与すること、およびエタノールストレスにおいても、Rsp5 が mRNA や tRNA の核外輸送に必須であることを見出し、核外輸送に関わる標的タンパク質の同定を含む Rsp5 を介した RNA 分子の核外輸送機構の解明に向けた重要な知見を得た。
- 2) ストレスのモデルとしてアミノ酸アナログを用いたスクリーニング法を確立し、ランダム変異ライブラリーからストレス耐性の向上した変異型 Rsp5 を分離し、その機能を解析した。得られた二重変異型 Rsp5 (T357A/K764E) 発現株では、パーミアーズ Gap1 が急速に分解されるため、アミノ酸アナログストレス耐性が向上したことを明らかにし、ストレスの種類により Rsp5 の基質は異なることも示した。

以上のように、本論文は酵母のユビキチンリガーゼ Rsp5 がストレスタンパク質の発現制御を介して異常タンパク質修復に関与することを明らかにするとともに、異常タンパク質分解能力を高めた変異型 Rsp5 の創製により、ストレス耐性の向上した実用酵母が育種できる可能性を示したものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士（バイオサイエンス）の学位論文として価値あるものと認めた。