

(別紙 1)

## 論文内容の要旨

申請者氏名 志賀 岳希

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、発酵産業において広く利用されている有用微生物であるが、実際の発酵生産環境には高濃度エタノールや高温などのストレスが複合的に存在しており、酵母の生育および発酵を阻害する要因となっている。そのため、発酵生産環境中のストレスに強い耐性を示し、発酵力の高い酵母の育種が望まれている。酵母のユビキチンリガーゼ Rsp5 は、細胞膜タンパク質をユビキチン化し、エンドサイトーシスを誘導することで、そのタンパク質の細胞膜上からの除去と、続く液胞での分解を促進している。酵母の細胞は、この仕組みを利用して、細胞膜タンパク質の品質管理 (Plasma Membrane Quality Control; PMQC) を行っていると報告されているが、詳細な分子機構、特に環境ストレス下における PMQC についての知見は乏しい。当研究室で単離した Rsp5 の機能低下型変異株 (*rsp5*<sup>A401E</sup> 株) では、アミノ酸パーミアーゼ Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスが抑制されるほか、様々なストレスに高い感受性を示すことが分かっている。したがって、Rsp5 による PMQC の分子機構を解明することは、酵母のストレス応答への理解が深まるとともに、ストレス耐性と発酵力の向上した酵母の育種にも繋がるため、基礎・応用の両面で重要な研究課題である。

本研究では、まず Rsp5 のモデル基質として Gap1 に着目し、エタノールストレス下における Gap1 のユビキチン化とエンドサイトーシスについて解析した。その結果、エタノールストレスによって Gap1 のユビキチン化が誘導されることが確認され、さらに、続くエンドサイトーシスの解析によって、未知のアダプタータンパク質が Rsp5 と Gap1 とを仲介していることを見出した。次に、ストレス下で Rsp5 と Gap1 とを仲介するアダプタータンパク質を探索したところ、Bul1, Bul2, Art1, Art3, Art6 の関与が明らかとなり、これらのアダプタータンパク質は機能的な冗長性と選択性を併せ持っていることが示された。また、本機構はエタノールに限らず、高温や酸化などのストレスによる Gap1 のエンドサイトーシス誘導にも関与していた。さらに、*rsp5*<sup>A401E</sup> 株では、Bul2 と Art1 が Rsp5 とほとんど相互作用しないことを見出した。この結果から、*rsp5*<sup>A401E</sup> 株における Rsp5 の機能不全は、基質認識能の異常に起因することが示された。

この PMQC の解析の過程で、*ART1* 遺伝子の単独破壊によって酵母のストレス耐性が低下する一方で、Gap1 のエンドサイトーシスには野生型株との差が見られないことから、Art1 が PMQC 以外のストレス応答にも関与している可能性を見出した。そこで、DNA マイクロアレイ解析を行い、*ART1* 破壊株において、エタノールストレス下で野生型株よりも発現が低下する遺伝子を同定した。その中には、細胞質中に存在する複数のストレス応答因子の遺伝子も含まれていた。これは *ART1* 破壊株のストレス耐性低下と同様、PMQC のみでは説明できない現象であった。以上の結果より、アダプタータンパク質 Art1 が PMQC 以外のストレス応答にも関与することが初めて示唆された。

(別紙2)

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 志賀 岳希

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* は、発酵産業において広く利用されている有用微生物であるが、実際の発酵生産環境では、高濃度エタノールや高温といったストレスによって、酵母の生育と発酵が阻害される。したがって、酵母のストレス応答機構の解明は、ストレス耐性の向上した酵母の育種技術の開発にも繋がり、基礎研究のみならず産業利用の観点でも重要である。申請者は、酵母のストレス耐性に深く関与しているユビキチンリガーゼ Rsp5 とそのアダプタータンパク質に着目し、未だ詳細な知見の乏しいストレス応答機構である「細胞膜タンパク質の品質管理 (Plasma Membrane Quality Control; PMQC)」について解析を行い、以下に示す新たな知見や重要な結果を得た。

- 1) アミノ酸パーミアーゼ Gap1 をモデル基質として用い、エタノールストレスによって、Rsp5 依存的に細胞膜タンパク質がユビキチン化されることを示した。
- 2) Gap1 を含む複数の細胞膜タンパク質が、エタノールストレス下でエンドサイトーシスによって細胞膜上から除去され、この仕組みが細胞膜タンパク質に共通したストレス応答機構であることが示唆された。
- 3) エタノールなどの各種ストレスによって Gap1 のエンドサイトーシスが誘導され、これには Rsp5 だけでなく、Art1 や Bul1, Bul2 といった Rsp5 のアダプタータンパク質の関与が重要であることを明らかにした。
- 4) Rsp5 のアダプタータンパク質には機能的な冗長性が存在する一方で、細胞内外の環境や状況に応じた選択性も存在することが判明した。
- 5) 機能低下型の変異型 Rsp5 (Rsp5<sup>A401E</sup>) では、Art1 や Bul2 といった一部のアダプタータンパク質との相互作用が著しく低下しており、その機能不全の原因が基質認識能の異常であることが初めて示された。
- 6) ART1 遺伝子の破壊株を用いた解析から、PMQC のみでは説明できないストレス耐性および遺伝子発現の低下が観察され、Art1 が PMQC 以外のストレス応答にも関与している可能性を初めて見出した。

これらの結果から、Rsp5 による PMQC の分子機構の詳細が明らかとなり、PMQC におけるアダプタータンパク質の重要性が示された。PMQC に関わる個別の因子の同定とその機能解析は、酵母のストレス応答を精密に制御することで、発酵力を効率的に向上させる技術の開発に繋がる可能性がある。また、Art1 の機能解析によって、Rsp5 とアダプタータンパク質による新規な細胞機能制御機構の発見も期待できる。

以上のように、本論文は Rsp5 とアダプタータンパク質の機能解析によって酵母における PMQC の詳細な分子機構を解明した上で、新たな研究領域を開拓したものであり、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。