

(別紙1)

## 論文内容の要旨

申請者氏名 西田 郁久

アミノ酸の一種であるプロリンは、タンパク質の構成分子や栄養素として用いられることに加え、細胞保護などの新規な機能を有することも知られている。本研究では、モデル生物として、また産業微生物として重要な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用い、プロリンによる細胞保護機能の発現に関与すると考えられている液胞およびプロリンの分解系酵素が局在するミトコンドリアに着目し、これらのオルガネラにおけるプロリンの輸送・代謝に関連する因子の同定と機能解析を目的として研究を行なった。

まず、プロリンにより誘導される新規因子の同定を目的として、細胞内プロリン含量の増加に伴い誘導される遺伝子を、DNA マイクロアレイ解析により調べた。その結果、プロリンの分解系酵素や細胞膜のプロリントランスポーターをコードする遺伝子に加え、液胞アミノ酸輸送に関わる *AVT* 遺伝子 (*AVT1-7*) の発現が上昇していた。そこで、各 *AVT* 遺伝子破壊株を用いて最少培地にプロリンを添加した際のプロリン含量を解析したところ、*AVT1* 破壊株では液胞画分におけるプロリンの割合が低下し、*AVT3* 破壊株では増加した。また *AVT1* の過剰発現は液胞画分におけるプロリンの割合を増加させたのに対し、*AVT3* の過剰発現は低下させた。これらのことから、Avt1 がプロリンの液胞への取り込み、Avt3 が排出に関与することが示唆された。次に、ミトコンドリアにおけるプロリン輸送の分子機構を明らかにするために、遺伝学的・生化学的手法によりミトコンドリアのトランスポーター遺伝子の探索を試みたが、最終的にその同定には至らなかった。特に単離ミトコンドリアを用いた実験から、トランスポーター非依存的な様式でプロリンが輸送されていることを示唆するデータが得られた。

そこで、*S. cerevisiae* におけるトランスポーター以外のプロリン代謝関連因子を明らかにするために、機能未知のミトコンドリア関連タンパク質遺伝子の破壊株について、表現型解析を行った。その結果、プロリンを単一の炭素源とする培地において、*FMP12* の破壊株では野生型株と比較して良好な生育が見られた。一方、*FMP12* の過剰発現によりプロリンの炭素源としての資化能が低下した。これらの結果から、*S. cerevisiae* において、プロリンを炭素源として利用することを抑制する未知の機構が存在し、その機構に $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼと相同性のある Fmp12 が関与していることが判明した。また、遺伝学的解析の結果、ミトコンドリアに局在するプロリン分解酵素 (Put1/2)、アラニントランスアミナーゼ Alt1、 $\alpha$ -ケトグルタル酸デヒドロゲナーゼ (KGDH) から成る経路がプロリンの炭素源としての利用に必須であることを *S. cerevisiae* で初めて見出し、Fmp12 がこの経路の抑制に関与することを明らかにした。

以上の結果から、酵母 *S. cerevisiae* のオルガネラ (液胞、ミトコンドリア) において、プロリンの輸送や代謝に関連する新規因子を同定し、プロリンの細胞内局在の生理的意義とそのメカニズムの解明に資する知見を得ることができた。

(別紙2)

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 西田 郁久

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* において、アミノ酸の一種であるプロリンは、窒素源として利用されるだけでなく、ストレス環境下における細胞保護物質としても機能する。それらの機能の発現には、液胞膜やミトコンドリア内膜におけるプロリンの輸送系が必要であることが示唆されているが、その分子機構の全容解明には至っていない。また、プロリンを窒素源として利用する以外の代謝経路については、ほとんど不明である。申請者は、*S. cerevisiae* におけるプロリンの細胞内輸送機構や新規な代謝制御機構の解明を目的として研究を展開し、以下に示す新たな結果や重要な知見を得た。

- 1) DNA マイクロアレイ解析の結果から、細胞外からのプロリン添加によりプロリン代謝・輸送に関する遺伝子の発現が変動し、中でも液胞膜トランスポーターをコードする *AVT* 遺伝子 (*AVT1-7*) の発現が誘導されることを示した。
- 2) *AVT* 遺伝子の破壊株や過剰発現株を用いて液胞におけるプロリンの局在解析を行ない、主に *Avt1* が液胞におけるプロリンの取り込みに、*Avt3* が液胞からのプロリンの排出にそれぞれ関与することを見出した。
- 3) ミトコンドリアにおけるプロリントランスポーターの同定には至らなかったが、生化学的解析により、単離ミトコンドリアにおけるトランスポーター非依存的なプロリン取り込み系の存在を示唆するデータを得た。
- 4) ミトコンドリア関連タンパク質をコードする機能未知遺伝子に着目したところ、プロリンを単一の炭素源とした時の資化能が *FMP12* 破壊株において増大し、*FMP12* 過剰発現株では逆に低下することを明らかにした。
- 5) *FMP12* 破壊株を用いた遺伝学的な解析より、プロリンを炭素源として利用する際に必要な代謝経路を同定することができた。

申請者は、本研究を通して *S. cerevisiae* の液胞におけるプロリン輸送系の存在を見出した。*AVT* 遺伝子のオルソログは植物や動物にも保存されており、高等真核生物の液胞 (リソソーム) におけるプロリン輸送経路とその意義の解明にも繋がると考えられる。また、*S. cerevisiae* においてアミノ酸を炭素源として利用する経路が存在することを明らかにし、その調節に関わる新規因子として、 $\alpha$ -ケトグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼと相同性のある *Fmp12* を同定した。*S. cerevisiae* は様々な有用物質の発酵生産のための宿主として広く用いられており、本研究で得られた知見が、従来の発酵産業における常識を打ち破る新たな発酵生産プロセスの確立のための端緒となることが期待できる。以上のように、本論文は *S. cerevisiae* において、プロリンの細胞内輸送経路やプロリンを炭素源として利用する経路の一端を明らかにした上で、新たな仮説を提唱したものであり、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。