

(別紙1)

論文内容の要旨

申請者氏名 Ariunzaya Tsolmonbaatar

パン酵母 (多くは *Saccharomyces cerevisiae* の二倍体株) は製パン過程において、乾燥、冷凍、高ショ糖などの製パン関連ストレスに曝されており、これらのストレスが長時間または複合的に負荷されると、パン酵母の生育は阻害され死に至る。そのため、パン酵母の有用機能 (炭酸ガス、味・風味成分の生成) が制限され、発酵力にも限界がある。したがって、パン酵母に優れたストレス耐性を付与することが重要である。

当研究室では、アミノ酸のプロリンが多くの植物や細菌と同様に、ストレスから酵母 *S. cerevisiae* の細胞を保護することを見出し、プロリンの代謝調節機構と生理的役割の解析を進めてきた。酵母において、プロリンは細胞質でおもにグルタミン酸から合成されるが、初発酵素である γ -グルタミルキナーゼ (GK) の活性がプロリンによるフィードバック阻害を受けることで、細胞内のプロリン合成が厳密に制御されている。本研究では、ストレス耐性の向上したパン酵母の育種を目的に、プロリンを細胞内に蓄積するパン酵母から GK の変異体を取得し、パン酵母における機能解析を行った。

エチルメタンサルホン酸処理によってパン酵母の二倍体株に突然変異を導入し、プロリンの毒性アナログであるアゼチジン-2-カルボン酸に耐性を示す変異株を単離した。得られた変異株の中から、親株より細胞内プロリン含量が最大で約 9 倍に増加した株を多数選抜し、さらにそれらの中から製パン関連ストレス (冷凍, 高ショ糖) に対し、親株より高い細胞生存率を示す株を複数取得した。次に、各株の製パン特性を評価したところ、冷凍生地および高ショ糖生地での発酵力が親株に比べて向上した株を複数取得した (最高で約 30% および約 60% それぞれ向上)。発酵力が向上した株の GK 遺伝子を解析した結果、2 株の GK 遺伝子に新規なアミノ酸置換 (Pro247Ser, Glu415Lys) を伴う変異を見出した。各 GK 変異体をパン酵母で発現させると、細胞内プロリン含量が親株の約 2 倍に増加し、冷凍後の細胞生存率も親株の約 2-3 倍に増加した。また、各 GK 変異体は野生型酵素に比べて反応速度定数が上昇し、プロリンによるフィードバック阻害感受性が低下することで、プロリン含量の増加に寄与すると結論づけた。

次に、さらなるプロリン含量の増加とストレス耐性の向上を目的に、当研究室で過去に得られた GK 変異体 (Ile150Thr, Asp154Asn) と今回得られた変異体 (Pro247Ser, Glu415Lys) を組み合わせた多重変異体を作製し、パン酵母の細胞内で発現させた。その結果、多くの GK 二重変異体ではプロリン含量やフィードバック阻害への相加効果が観察されたが、ストレス耐性は向上しなかった。また、GK の三重・四重変異体では、酵素特性、細胞内プロリン含量、ストレス耐性への効果はいずれも見られなかった。

本研究を通して、パン酵母のプロリン合成における GK の分子機能、及びストレス耐性には適切なプロリン含量がそれぞれ重要であることが示された。これらの知見は、パン酵母の育種への応用やプロリンの生理機能の理解に繋がることが期待される。

(別紙2)

論文審査結果の要旨

申請者氏名 Ariunzaya Tsolmonbaatar

パン酵母（多くは *Saccharomyces cerevisiae* の二倍体株）は製パン過程において、乾燥、冷凍、高シヨ糖などの製パン関連ストレスに曝されながら有用機能（炭酸ガス、味・風味成分の生成）を発揮しているが、過酷なストレス下では生育阻害や細胞死が引き起こされる。したがって、パン酵母のストレス耐性を向上させることで高い発酵力と多様な製パン法に対応可能なパン酵母の開発が可能になる。申請者が所属する研究室ではアミノ酸のプロリンが多くの植物や細菌と同様に、ストレスから酵母 *S. cerevisiae* の細胞を保護することを見出し、プロリンの代謝制御機構と生理機能の解析を進めている。申請者は、ストレス耐性の向上したパン酵母の育種を目的に、プロリン含量が増加したパン酵母の変異株から、プロリン合成系の初発酵素で、細胞内のプロリン含量を制御している γ -グルタミルキナーゼ（GK）の変異体を取得し、パン酵母における機能解析を行うことで、以下に示す新たな知見や重要な結果を得た。

- 1) プロリンの毒性アナログであるアゼチジン-2-カルボン酸（AZC）に耐性を示すパン酵母二倍体株の変異株の中から、親株より細胞内プロリン含量が著しく増加した株を多数選抜した。それらの中から、製パン関連ストレス（冷凍、高シヨ糖）に高い耐性を示すとともに、冷凍生地や高シヨ糖生地での発酵力が親株に比べて向上した株を複数取得した。以上の結果から、AZC 耐性変異株の取得がプロリン含量とストレス耐性の向上したパン酵母の育種に有効であることが実証できた。
- 2) 発酵力が向上した2株の GK 遺伝子に新規なアミノ酸置換（Pro247Ser, Glu415Lys）を伴う変異を見出した。各 GK 変異体を発現するパン酵母では、細胞内プロリン含量、冷凍後の細胞生存率が親株より有意に増加した。また、各 GK 変異体は野生型酵素に比べて反応速度定数が上昇するとともに、プロリンによるフィードバック阻害感受性が低下することで、プロリン含量の増加に寄与すると結論づけた。
- 3) さらにプロリン含量の増加とストレス耐性の向上を目的に、当研究室で過去に得られた GK 変異体（Ile150Thr, Asp154Asn）と今回得られた変異体（Pro247Ser, Glu415Lys）を組み合わせた多重変異体を作製し、パン酵母の細胞内で発現させた。その結果、多くの二重変異体ではプロリン含量やフィードバック阻害感受性への相加効果が観察されたが、ストレス耐性は向上しなかった。また、三重・四重変異体では、酵素特性、プロリン含量、ストレス耐性への効果は見られなかった。

以上の結果から、パン酵母のプロリン合成における GK の分子機能、及びストレス耐性におけるプロリン含量の重要性をそれぞれ明らかにするに至った。これらの知見は、パン酵母などの産業酵母の育種や酵母におけるプロリンの生理機能の理解に繋がる有用なものであり、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。